

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



EFFECTO DE UN BIOESTIMULANTE A BASE DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y
RHIZOBACTERIAS EN LA CALIDAD DE FRESA (*Fragaria x anannasa*) Y
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.)

Tesis

Que presenta SIMEÓN MARTÍNEZ DE LA CRUZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA

Saltillo, Coahuila

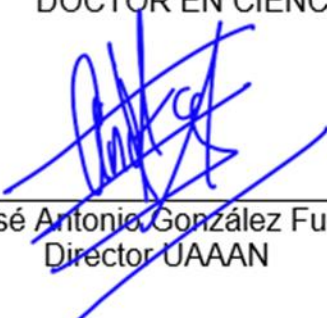
Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



EFFECTO DE UN BIOESTIMULANTE A BASE DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y
RHIZOBACTERIAS EN LA CALIDAD DE FRESA (*Fragaria x anannasa*) Y
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.)

Que presenta SIMEÓN MARTÍNEZ DE LA CRUZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA



Dr. José Antonio González Fuentes
Director UAAAN




Dra. Miriam Desiree Dávila Medina
Director Externo


EFFECTO DE UN BIOESTIMULANTE A BASE DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y
RHIZOBACTERIAS EN LA CALIDAD DE FRESA (*Fragaria x anannasa*) Y
FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.)

Tesis

Elaborada por SIMEÓN MARTÍNEZ DE LA CRUZ como requisito parcial para
obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA
con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría




Dr. José Antonio González Fuentes
Asesor Principal




Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor




Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor



Dr. Armando Hernández Pérez
Asesor



Dra. Miriam Desiree Dávila Medina
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Junio 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado el apoyo económico en la realización de la maestría.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por abrirme sus puertas en la formación como profesionista en sus programas de posgrado.

A la Dr. José Antonio González Fuentes por la dirección y apoyo en este trabajo de investigación; por sus conocimientos aportados, sugerencias, dedicación en la revisión y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal por la contribución y conocimientos aportados a esta investigación, la revisión del documento y su tiempo brindado en este trabajo.

Al Dr. Armando Robledo Olivo por el apoyo brindado durante la investigación, así como las sugerencias aportadas en este trabajo, las facilidades otorgadas para culminar el trabajo de investigación.

Al Dr. Armando Hernandez Pérez por ser parte de este equipo de trabajo, por las sugerencias realizadas y por el apoyo otorgado durante el establecimiento y terminación de la investigación.

A la Dra. Miriam Desireé Dávila Medina por todo el tiempo, paciencia y conocimientos aportados en esta investigación, así como las facilidades brindadas en el laboratorio, que sirvieron para mejorar los resultados obtenidos.

A todos los profesores, técnicos, laboratoristas y personal administrativo del Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida.

Un reconocimiento al personal del área de posgrado por el apoyo y facilidades otorgadas para la finalización del trabajo de investigación

DEDICATORIAS

A mis padres:

Jesús Martínez Cortes y Catalina de la Cruz Hernández, por brindarme el apoyo incondicional, por estar siempre conmigo, siendo una parte importante en mi vida, gracias por sus consejos y cariño brindado.

A mis hermanos:

Lázaro, Jesús, Sergio y Rosario, por su apoyo y amistad brindada, por todos los momentos compartidos con cada uno de ustedes, siempre agradecido porque están a mi lado.

A mis sobrinos:

Alejandro, Isabel por los momentos compartidos y la convivencia con cada uno de ellos a lo largo de todo este tiempo, gracias por su compañía.

A mis compañeros:

Agradecido con mis compañeros de generación, por todo el apoyo y conocimientos aportados, por su amistad brindada durante mi estancia en el posgrado.

CARTAS DE ACEPTACIÓN DE LOS ARTÍCULOS

← [NBHA] Editor Decision - Article Published

ⓘ Marca para seguimiento.

🌐 Traducir mensaje a: Español | No traducir nunca de: Inglés



Roxana L. STOIAN <editor3@notulaebotanicae.ro>

Para: Usted; José A. GONZÁLEZ-FUENTES; Armando ROBLEDO-OLIVO; Rosalinda MENDOZA-VILLARREAL y 3 más



Mié 09/02/2022 12:05 PM

Dear Simeón MARTÍNEZ-DE LA CRUZ, José A. GONZÁLEZ-FUENTES, Armando ROBLEDO-OLIVO, Rosalinda MENDOZA-VILLARREAL, Armando HERNÁNDEZ-PÉREZ, Miriam D. DÁVILA-MEDINA, Daniela ALVARADO-CAMARILLO,

It is a great pleasure to inform you that your paper entitled "Humic substances and rhizobacteria enhance the yield, physiology and quality of strawberries", was published in Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca , please see journal web-page ([Online First](#)).

If you notice possible inaccuracies (information on e-platform, indexing metadata, title and author/s in issue content, article etc.), please inform us **URGENT** (no more than two days!). If the co-author(s) have questions or requests please send these via the principal / corresponding author as a single point of contact to ensure that no conflicting instructions are received.

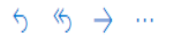
Congratulation on your achievement and thank you for your contribution to our journal!

← [ERA] Acuse de recibo de envío



Dr. Efraín de la Cruz Lázaro <editorera1@ujat.mx>

Sáb 09/04/2022 08:55 PM



Para: Usted

SIMEON MARTINEZ:

Gracias por enviar el manuscrito "DETERMINACIÓN DE MINERALES EN CULTIVO DE FRESA CON APLICACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y RIZOBACTERIAS" a Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial.

URL del manuscrito: <https://era.ujat.mx/index.php/rera/authorDashboard/submission/3341>

Nombre de usuario/a: martinez12

En caso de dudas, contacte conmigo. Gracias por elegir esta revista para publicar su trabajo.

Dr. Efraín de la Cruz Lázaro

_____ Ecosistemas y Recursos Agropecuarios <http://era.ujat.mx>

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS-----	iii
DEDICATORIAS-----	iv
INTRODUCCIÓN-----	1
REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
Importancia del cultivo de fresa y frambuesa-----	3
Problemática de producción-----	3
Bioestimulantes-----	4
Sustancias húmicas-----	5
Ácidos húmicos-----	5
Ácidos fúlvicos-----	6
Rizobacterias-----	7
Genero <i>Azospirillum</i> -----	7
Genero <i>Pseudomonas</i> -----	8
CONCLUSIONES GENERALES-----	115
REFERENCIAS-----	117

INTRODUCCIÓN

La producción de berries como fresa y frambuesa son de gran importancia en la creación de empleo y genera ingresos a los productores por ventas en el mercado nacional y por exportaciones frutícolas (Ávila y González 2012). La intensificación de la agricultura convencional ocasiona contaminación por el uso de productos sintéticos, pérdida de la fertilidad del suelo y disminución de la biodiversidad, los impactos negativos de esta actividad están resultando ahora en un cambio irreversible para el medio ambiente (Olivares *et al.*, 2017). La producción enfrenta una problemática en lo que respecta a la nutrición del cultivo, que es un factor determinante para el desarrollo de la planta que le permite obtener un producto de calidad, es necesario que el cultivo disponga de todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (Avitia *et al.* 2014).

Se necesitan nuevas tecnologías de producción para disminuir los daños ocasionados a nuestros ecosistemas y al mismo tiempo que sean amigables con el medio ambiente, estas alternativas incluyen el uso de bioestimulantes en la agricultura (Agbodjato *et al.*, 2021). Existen diversos tipos de bioestimulantes y entre ellos se encuentran los extractos de algas, quitosano, hidrolizados de proteínas, las sustancias húmicas que incluyen los ácidos húmicos y fúlvicos, así como hongos micorrízicos y rizobacterias (Veobides y Vázquez, 2018).

El uso de bioestimulantes se está convirtiendo en una práctica común en los sistemas de producción, debido a su capacidad para cambiar los procesos fisiológicos de las plantas, relacionados con el crecimiento, la producción y la mitigación del estrés (Afonso *et al.*, 2022). Las sustancias húmicas (SH), son los constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo, resultantes de la descomposición de los residuos de la planta, animales y microbianos (Canellas y Olivares, 2014). Estas sustancias tienen efectos considerables sobre la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos debido a sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas únicas, juegan un papel vital en establecer

interacciones bióticas y abióticas dentro de la rizosfera vegetal (Shah *et al.*, 2018).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden interactuar con las plantas directamente aumentando la disponibilidad de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, hierro, la producción y regulación de compuestos involucrados en el crecimiento de las plantas como fitohormonas (Oleńska *et al.*, 2020). Los inoculantes a base de rizobacterias son una alternativa biotecnológica en la agricultura sustentable, que permite incrementar el rendimiento, disminuyendo los costos de producción en la práctica agrícola (Velasco *et al.*, 2020). Las rizobacterias simbióticas como *Rhizobium*, de vida libre como *Azotobacter* y *Azospirillum* han sido utilizadas ampliamente como bioestimulantes para aumentar la disponibilidad de nitrógeno en cultivos agrícolas (Luna *et al.* 2013). Los géneros bacterianos con capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfato se tienen a *Pseudomonas*, *Rhizobium*, y *Agrobacterium* (Paredes y Espinosa 2010).

El mecanismo de las sustancias húmicas que afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas se explique por su conexión con los microorganismos de la rizosfera y su activación por las secreciones de las raíces de las plantas tratadas con preparaciones húmicas (Bezuglova y Klimenko, 2022). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y las sustancias húmicas (HS) son opciones prometedoras para reducir el uso de pesticidas y fertilizantes minerales (Da Silva *et al.*, 2021). Las sustancias húmicas incrementan la exudación de ácidos orgánicos en la raíz, favoreciendo la interacción de la planta con microorganismos benéficos permitiendo incrementar la absorción y transporte de nutrientes minerales (Olivares *et al.* 2017, Nardi *et al.* 2021). Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un bioestimulante a base de sustancias húmicas y rizobacterias, en variables agronómicas y calidad en cultivo de fresa y frambuesa.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del cultivo de fresa y frambuesa

El cultivo de fresa en México se inició a mediados del siglo pasado en el estado de Guanajuato, sin embargo, no fue hasta 1950 que cobró mayor importancia por la creciente demanda de los EE. UU., originando que el cultivo de esta fruta se extendiera a Michoacán, pasando de cubrir las necesidades del mercado local hasta ser el mayor productor de fresa a nivel nacional (Ávila y González 2012). La fresa es una planta de alta producción por su precocidad y su fruto es muy apetecido en el mercado extranjero y nacional por su color, textura y alto valor nutricional, la producción de fresa tiene importancia socioeconómica para México, por su gran demanda de mano de obra y porque genera una proporción considerable de los ingresos por exportaciones frutícolas (González *et al.*, 2019). La frambuesa es una frutilla de gran importancia en algunos países, así como en México, pertenece a la familia Rosácea, es un arbusto del grupo de los berries se cultiva en algunos estados como Jalisco, Michoacán y Baja California (SIAP, 2020). El mercado de la frambuesa y berries en general, presenta condiciones en el crecimiento de la demanda; se busca desarrollar tecnologías innovadoras que aumenten la calidad, rendimiento (García y Sommerfeld, 2016). La competitividad y rentabilidad de la industria de berries en México, en el futuro, dependerá de la adopción de mejores técnicas de cultivo, la mayor problemática que enfrentan los productores se centra en aspectos de calidad, nutrición, fitosanidad, inocuidad, uso de nuevas tecnologías y comercialización del producto (León *et al.*, 2014).

Problemática de producción

Actualmente, la agricultura se enfrenta al desafío de satisfacer una mayor y creciente demanda de alimentos inocuos y de calidad, incluido su valor nutricional, el uso extensivo de fertilizantes químicos plantea serios problemas como la contaminación ambiental, desarrolla la resistencia a plagas, las investigaciones centradas en la aplicación de fertilizantes orgánicos en las

plantas pueden reemplazar de manera parcial el uso de fertilizantes químicos (Ye *et al.*, 2020). La sociedad enfrenta el desafío no solo de aumentar la producción agrícola en medio del cambio climático global, que amenaza con disminuir las cosechas en muchas áreas del mundo, así también desarrollar tecnologías innovadoras que aumenten los rendimientos agrícolas, minimicen los insumos y disminuyan la contaminación ambiental (García y Sommerfeld, 2016). Estos desafíos han llevado a la agricultura convencional a adoptar distintas y diversas prácticas, como el uso de fertilizantes y plaguicidas. Los bioestimulantes ofrecen un potencial para mejorar la producción y calidad de las cosechas, estos productos pueden reducir el uso de fertilizantes y mejorar la resistencia de las plantas al estrés (Quintero *et al.*, 2018).

Bioestimulantes

La función y aplicación de bioestimulantes ha despertado un gran interés debido a su potencial como recurso ambiental sostenible para la producción agrícola. Se han creado varios proyectos nacionales e internacionales sobre bioestimulantes en el marco de la economía circular (Xu y Geelen, 2018). Un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o las características de calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes (Du Jardin, 2015). Calvo *et al.*, (2014) menciona algunas categorías de bioestimulantes vegetales como los inoculantes microbianos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, hidrolizados de proteínas, aminoácidos y extractos de algas marinas. Los microorganismos incluyen bacterias beneficiosas, principalmente PGPR, y hongos beneficiosos como las micorrizas, pueden ser de vida libre, rizosférica o endosimbiótica (Halpern *et al.*, 2015). El uso de bioestimulantes se está convirtiendo en una práctica común en los sistemas de producción, debido a su capacidad de cambiar los procesos fisiológicos de las plantas, relacionados con el crecimiento, la producción y la mitigación del estrés (Afonso *et al.*, 2022).

Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas (SH) son el componente principal de la materia orgánica natural, es una mezcla compleja de compuestos orgánicos que se encuentran naturalmente en los suelos, el agua y los sedimentos (Stevenson, 1994). El uso actual de la definición operativa de fracciones de SH, aunque originalmente se aplicó estrictamente al suelo, se ha aplicado a una variedad de fuentes diferentes (Weber *et al.*, 2018). Las propiedades bioestimulantes de SH han sido reconocidas gradualmente por el sector agrícola que contribuyó a empujar el mercado hacia una tendencia al alza (Monda *et al.*, 2021).

Los cambios anatómicos y bioquímicos de la planta en el sistema de raíces por Sustancias húmicas (SH) son los principales factores responsables del aumento de la absorción de nutrientes, aunque el aumento en la disponibilidad de nutrientes a través de la quelación es otra contribución de SH al crecimiento de las plantas (Jindo *et al.*, 2020). Las SH se clasifican en ácidos húmicos (HA), ácidos fúlvicos (FA) y huminas según su solubilidad en agua, soluciones ácidas o alcalinas (De Melo *et al.*, 2016). Las fracciones HA y FA porque son capaces de mejorar la fertilidad y la salud del suelo en plazos cortos, son químicamente reactivas y capaces de resistir las reacciones microbianas, por lo que desempeñan funciones beneficiosas en los suelos y las plantas (Billingham, 2012). Los mecanismos por los cuales las sustancias húmicas mejoran el crecimiento de las plantas se atribuyen a la mayor capacidad de regular la permeabilidad de la membrana y la señalización intracelular, aumentando así el crecimiento de las raíces, incrementando las concentraciones de clorofila, la actividad fotosintética y activando el metabolismo del carbono y el nitrógeno (Jannin *et al.*, 2012).

Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos (AH) son moléculas orgánicas que juegan un papel esencial en la mejora de las propiedades del suelo, el crecimiento de las plantas y los parámetros agronómicos, las fuentes de AH incluyen carbón, lignito, suelos y

materiales orgánicos, los productos a base de ácido húmico se han utilizado en la producción de cultivos en los últimos años para garantizar la sostenibilidad de la producción agrícola (Ampong *et al.*, 2022).

Los Ácidos húmicos contiene alrededor del 60% de carbono orgánico, que juega un papel importante en el crecimiento de los microorganismos del suelo, además de Carbono, también contiene nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y azufre (Sible *et al.*, 2021). El ácido húmico es un tipo de materia orgánica macromolecular producida por fermentación aeróbica de residuos vegetales, tiene muchas estructuras aromáticas, estructuras de hidroxilo fenólico y estructuras de carboxilo, que hacen que el ácido húmico sea ligeramente ácido y muestra solubilidad, electrificación, capacidad de adsorción, intercambio iónico y propiedades quelantes (Guo *et al.*, 2022). Los AH desempeñan varias funciones importantes, como: aumentar las actividades físicas y bioquímicas del suelo al mejorar la estructura, la textura, la capacidad de retención de agua y la población microbiana (Nardi *et al.*, 2017).

Ácidos fúlvicos

Los ácidos fúlvicos son una parte de las sustancias húmicas del suelo basadas en la solubilidad en soluciones de ácidos y bases fuertes (Ahmad *et al.*, 2018). Los ácidos fúlvicos consisten en un grupo de compuestos orgánicos solubles ampliamente distribuidos en la naturaleza y son uno de los componentes críticos de las sustancias orgánicas del suelo (Shah *et al.*, 2018). Estos compuestos orgánicos contienen muchos grupos funcionales activos, como carbonilo, carboxilo, hidroxilo, hidroxilo fenólico y quinona, y estos son capaces de quelar e intercambiar aniones o iones (Zhang *et al.*, 2020).

Además, los ácidos fúlvicos bioquímicos abarcan aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y hormonas, todos estos compuestos pueden estimular la división celular, el crecimiento de las raíces, la absorción de nutrientes y mejorar la capacidad antiestrés de las plantas, por lo tanto, promover el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Qin y Leskovar, 2020).

Rizobacterias

El término 'rizobacteria' representa bacterias en la rizósfera, que colonizan los alrededores de la raíz, las rizobacterias son importantes para mantener la riqueza del suelo, ya que son especialistas fundamentales en la reutilización de los suplementos del suelo (Backer *et al.*, 2018).

Los microorganismos más utilizados en la agricultura son las rizobacterias pertenecientes a los géneros, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* y *Pseudomonas* (Kamou *et al.*, 2015; Piña *et al.*, 2016).

Genero *Azospirillum*

El género *Azospirillum* pertenece a los microorganismos del suelo que pueden ser útiles en la agricultura sostenible, son bacterias gram negativas fijadoras de nitrógeno de vida libre agrupadas en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Hernaández *et al.*, 2020). La inoculación con *Azospirillum* estimula cambios importantes en la morfología de las raíces de las plantas, muy probablemente debido a la producción bacteriana de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal como auxina y giberelinas (Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han identificado quince especies del género *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadiana*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis* y *A. tífilo*. De estos, los más investigados son *A. lipoferum* y *A. brasilense*, ambos de los cuales son comunes en pastos y forrajes tropicales (Hungria *et al.*, 2016).

Azospirillum brasilense influye en el desarrollo y la productividad de las plantas que incluyen: fijación de nitrógeno atmosférico que contribuye al nitrógeno de la planta, efectos hormonales que alteran el crecimiento y metabolismo de la planta, incrementos del desarrollo, en general, del sistema radical que provoca un aumento en la toma de minerales y agua, actividad nitrato reductasa bacteriana en la raíz, que incrementa la acumulación de nitrato en plantas inoculadas (Parra y Cuevas, 2002).

Genero *Pseudomonas*

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más complejos y actualmente es el género de bacterias Gram negativas con el mayor número de especies, entre las que cabe destacar *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*, algunos miembros del género son capaces de vivir a bajas temperaturas, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes (Gomila *et al.*, 2015).

Pseudomonas fluorescens. Esta especie bacteriana habita la rizósfera, promueve el crecimiento vegetal y exhibe una gran capacidad de adaptación y colonización a diferentes tipos de suelos, por lo que se asocia a una gran variedad de especies vegetales; ofrece efectos directos e indirectos en la interacción con plantas, entre los efectos directos se encuentran la síntesis de fitohormonas, producción de sideróforos, solubilización de minerales y síntesis de una gran cantidad de compuestos volátiles. Los efectos indirectos incluyen la inhibición de hongos fitopatógenos que estén interactuando en el mismo ambiente rizosférico (Álvarez *et al.*, 2020). Se ha demostrado que ciertos miembros de *P. fluorescens* son agentes potenciales para el biocontrol que suprimen las enfermedades de las plantas protegiendo las semillas y las raíces por la infección de hongos. Se sabe que mejoran la promoción del crecimiento de las plantas y reducen la gravedad de muchas enfermedades fúngicas (Kumar *et al.*, 2019).

Pseudomonas fluorescens en el suelo promueve la solubilidad de las sales, especialmente los cloruros; promueve significativamente la disponibilidad de Cu y P y favorece la biomasa microbiana, aumenta el N total del suelo y las concentraciones intercambiables de Na, Mg y K. En tejidos vegetales de plantas *P. fluorescens* promueve la absorción de Mn, N, Zn y P, aumenta el tamaño y peso del fruto (Martínez *et al.*, 2019). *P. fluorescens* son muy utilizadas en diversos cultivos para colonizar las raíces, promueven el crecimiento y previenen el establecimiento de patógenos, favorecen la capacidad de absorción de agua y nutrientes, lo que permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas.

La especie *Pseudomonas putida* coloniza rápidamente la rizosfera de las plantas, superando así a los patógenos vegetales, debido a que ayuda a promover el desarrollo vegetal, es utilizada como bioestimulante y bioplaguicida mejorando la salud de las plantas. Coloniza las raíces de las plantas ayuda una relación mutua entre la planta y la bacteria, permite que las bacterias prosperen a partir de los nutrientes de la raíz (Cheng *et al.*, 2012).

Pseudomonas putida es una bacteria muy estudiada por sus capacidades de llevar a cabo la degradación de compuestos tóxicos y su alta tolerancia a compuestos aromáticos, es capaz de usar estos compuestos como fuente de carbono y tolerar contaminantes. Ayuda a tolerar el estrés ambiental debido a su control diverso de proteínas, incluida la secreción de proteínas y péptidos (Molina *et al.*, 2017). *Pseudomonas putida* muestra un enorme potencial como agente de control biológico (BCA) no solo porque está bien informado para controlar una serie de enfermedades relevantes de los cultivos, coloniza las plantas y su entorno, ejerce su actividad BCA a través de una variedad de diferentes mecanismos, y promueve el crecimiento de las plantas (Oliver *et al.*, 2019).

PRIMER ARTÍCULO

HUMIC SUBSTANCES AND RHIZOBACTERIA ENHANCE THE
YIELD, PHYSIOLOGY AND QUALITY OF STRAWBERRIES



Research
 Article

Humic substances and rhizobacteria enhance the yield, physiology and quality of strawberries

Simeón MARTÍNEZ-DE LA CRUZ¹, José A. GONZÁLEZ-FUENTES^{1*}, Armando ROBLEDO-OLIVO², Rosalinda MENDOZA-VILLARREAL¹, Armando HERNÁNDEZ-PÉREZ¹,
 Miriam D. DÁVILA-MEDINA³, Daniela ALVARADO-CAMARILLO²

¹Antonio Narro Autonomous Agrarian University, Department of Horticulture, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico; sime642@hotmail.com, jagf252001@gmail.com, rosalindamendoza@hotmail.com, hernandez865@hotmail.com, daniela.alvaradoc@uaaan.edu.mx
 (*corresponding author)

²Antonio Narro Autonomous Agrarian University, Department of Food Science and Technology, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, Mexico; armando.robledo@outlook.com

³Autonomous University of Coahuila, Faculty of Chemical Sciences. Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280 Saltillo, Coahuila, Mexico; desireedavila@uadec.edu.mx

Abstract

The strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch.) is appreciated for its aroma, color, texture and nutritional value. In conventional agriculture, the use of fertilizers damages the environment since it causes loss of soil fertility, salinity and its erosion, hence production alternatives, without harming the environment, are sought. The objective of this study was to evaluate the effect of a biostimulant based on humic substances and rhizobacteria, on the production and quality of the strawberry cultivar 'San Andreas'. Strawberry plants cultivar 'San Andreas' were treated with fulvic acids + mixture of microorganisms, humic acids +

Pseudomonas fluorescens, fulvic acids + *Azospirillum brasilense*, fulvic acids + *Pseudomonas fluorescens* and the mixture AH and AF + *Azospirillum brasilense* with two doses (d1, d2) in total 10 treatments were applied plus the control. Humic substances were applied every 15 days and rhizobacteria every 30 days. The results showed that the AFyAzoz d1 increased over control plants, the number of leaves in 38.3%, root volume in 42.6%, the fresh weight in 130% and dry weight in 63.8%, the number of fruits 50.0% and the yield in 59.5%. The AFyPF d1 favored Photosynthesis in 127.3%; AFyPF d1 increased TSS in 25%, AFyPF d2 vitamin C in 17.1% and MHyF+ Azoz d1 increased in 20% the content of Phenols. Humic substances plus rhizobacteria are an ecological alternative to be used as biostimulant in the production and quality of strawberry plants.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch; fulvic acids; humic acids; microorganisms

Received: 30 Nov 2021. Received in revised form: 15 Dec 2021. Accepted: 27 Jan 2022. Published online: 09 Feb 2022.

From Volume 49, Issue 1, 2021, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca journal uses article numbers in place of the traditional method of continuous pagination through the volume. The journal will continue to appear quarterly, as before, with four annual numbers.

Introduction

Strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) is appreciated for its nutritional value and its cultivation is one of the productive options for farmers (Medina *et al.*, 2016). The intensification of conventional agriculture causes pollution due to the use of synthetic products, loss of soil fertility and a decrease in biodiversity, the negative impacts of this activity are now resulting in an irreversible change for the

environment (Olivares *et al.*, 2017). New production technologies are needed to reduce the damage caused to our ecosystems and at the same time they are required to be friendly to the environment, these alternatives include the use of biostimulants in agriculture (Agbodjato *et al.*, 2021).

A plant biostimulant includes organic materials and microorganisms that are supplied to plants in order to improve the absorption of nutrients, stimulate growth, improve stress tolerance and their quality (Du Jardin, 2015). There are various types of biostimulants and among them, in addition to algae extracts, it is reported chitosan, protein hydrolysates, humic substances that include humic and fulvic acids, as well as mycorrhizal fungi and rhizobacteria (Veobides *et al.*, 2018).

The use of humic substances as biostimulant in agriculture, emerges as a sustainable technology to make agricultural methods more profitable and competent, with less destructive effects on ecosystems (Canellas *et al.*, 2015). Humic and fulvic substances are the main organic elements of lignites, soil and peat, they are produced by natural decomposition of organic matter (Van Oosten *et al.*, 2017). One of the main effects of humic substances on plant growth is the reinforcement of nutrient absorption and the lengthening of root growth (Jindo *et al.*, 2020). In a study carried out by Kirschbaum *et al.* (2019), when evaluating the effect of humic and fulvic acids, the applications improved the yield and number of fruits per plant of strawberry crop. Similarly, Aghaeifard *et al.* (2015), when applying humic acids by foliar application, in strawberry cultivar 'Camarosa', reported an increase in yield, higher concentration of soluble solids,

titratable acidity and vitamin C.

The use of rhizobacteria in crops reduces the negative environmental impact due to the use of fertilizers and pesticides, being an extraordinary option for producers to face the new competences of agriculture (DosSantos *et al.*, 2020). The action of rhizobacteria improves soil fertility by mobilizing minerals, increases crop yield through the fixation of N₂, induces the production of siderophores, the activity of phytohormones, solubilization of phosphorus and minerals (Naik *et al.*, 2019). The use of rhizobacteria is of consideration, particularly in the occurrence of abiotic stress since they help plants to tolerate it as well as help in the remediation of the soil by pollutants (Oleńska *et al.*, 2020).

The microorganisms most used as biostimulants are rhizobacteria belonging to the genera, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Pseudomonas*; the genus *Azospirillum*, applied to plants, is the most studied (Piña *et al.*, 2016). It helps in the production of crops with the increase of aerial shoot growth and root system that causes an increase in the intake of minerals and water, colonizes the rhizosphere and uses different sources of nitrogen (Fernandes *et al.*, 2020). In a strawberry cultivation investigation by Marcondes *et al.* (2019), when performing inoculations of *Azospirillum brasilense* strains in combination with nitrogen, they responded significantly by increasing the length of the root, the dry weight of the root, the length of the aerial shoots, the dry weight of the aerial part, the number of leaves and total dry weight.

The rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* exert a productive result, through the synthesis of phytohormones and vitamins, stimulate the

germination of seeds and emergence of seedlings, solubilize phosphorus and give systemic resistance to pathogens (Cano, 2011). In an experiment carried out by Haggag and Abo (2012), when using a strain of *Pseudomonas fluorescens* and being applied to the strawberry crop, significant increases were observed in growth parameters, as well as dry weight and yield.

Humic substances and rhizobacteria are among the most infallible procedures that use natural, biologically active and ecological substances that favor plant growth (Ekin, 2019). An alternative to make efficient the use of nutrients in crops, is the combination of humic substances as a vehicle and carbon source for rhizobacteria, resulting in an increase in crop yield (Olivares *et al.*, 2017). Based on the above, the objective of this study was to evaluate the effect of a biostimulant based on humic substances and rhizobacteria, on the production and quality of the strawberry cultivar 'San Andreas'.

Materials and Methods

Study area

The research work was carried out in a tunnel-type greenhouse in the Horticulture Department at the Antonio Narro Autonomous Agrarian University, in Saltillo, Coahuila, Mexico, which is located between the geographic coordinates of 25° 22' north latitude and 101° 02' west longitude and at an altitude of 1742 meters above sea level, with semi-dry climate with hot summer, rains in summer, annual average temperatures of 12 to 18 °C.

Genetic material and plantation

Two months old strawberry plants of the San Andreas cultivar, with a neutral

photoperiod, were planted on July 25th, 2020. In the plantation, 3 beds of soil with 12 m in length and 1 m wide and 80 cm between beds were used, the roots of the plants before transplantation were submerged in Captan® solution at a rate of 1 g/L. The distances between plants were 30 cm and a drip irrigation system was used with drippers separated 20 cm. The physical and chemical characteristics of the soil used were: pH 8.01, electrical conductivity 1.84 (dS/m), organic matter 4.4%, cation exchange capacity 20.4 (Meq/100 g), loamy soil texture and the mineral elements available in the soil are shown in Table 1.

Table 1. Mineral elements reported from the soil analysis

Elements	K	Ca	NO ₃	Na	Mg	Fe	Zn	Mn	B
Value (ppm)	909	2968	95.8	143	320	41.11	15.5	5.88	3.21

Extraction of humic substances and separation of humic acids and fulvic acids

The humic substances were extracted from Leonardite, this mineral organic compound was provided by the DHD Company of México, located in Sabinas, Coahuila. To extract these humic substances the methodology reported by López *et al.* (2014) was used, for this, 5 grams (g) of Leonardite were weighed and placed in a 250 mL flask and 100 mL of 1N potassium hydroxide were added, it was left in a "water bath" at 60

°C for two hours and allowed to cool down. For the separation of humic and fulvic acids, 25 mL of humic substances obtained in the extraction were taken and 50 mL of acetic acid were added in order to lower the pH to 4, it was heated on a laboratory grill for 5 minutes at 70 °C and left it to rest for three days at room temperature. After this period of time humic and fulvic acids were obtained, the

latter remained in the upperpart with a golden yellow color, while humic acids were left precipitated at the bottom of the container with the appearance of soil and a dark brown color.

Obtaining and preparing bacterial strains

Rhizobacteria of *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* were obtained by the strains provided by the National Collection of Microbial Strains and Cell Cultures, of the Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (IPN). The rhizobacteria *Azospirillum brasilense* was reactivated in NRCB culture medium (yeast extract 1 g, mannitol 5 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, bacteriological agar 15 g, distilled water 1 L, pH, 7.0-7.2), the *Pseudomonas* species were seeded in King B medium (peptone 20 g, purified agar 12 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄·7 H₂O 1.5 g, glycerol 15 ml, distilled water 1 L). In the preparation of the bacteria, they were cultivated in nutritive broth (with 5 g peptone and 3 g meat extract), and they were placed in constant agitation at 150 rpm for 48 hours at 25±5 °C, the bacterial growth was evidenced by the turbidity in the medium. The bacterial cell concentration was 10⁹ cells / ml according to the McFarland turbidity scale (McFarland, 1907).

Treatments

Five different mixtures with 2 doses were applied, resulting in 10 treatments plus a control with 7 repetitions each were applied in a completely randomized design (Table 2). Dose 1 used was: 3 ml of humic substances (humic

and / or fulvic acids) plus 5 mL of a mixture of microorganisms (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Azospirillum brasilense*) or microorganisms alone as indicated from treatment 3 onwards. Dose 2: 3.5 mL of humic and / or fulvic acids and 4 ml of a mixture of microorganisms or microorganisms alone as indicated from treatment 3 onwards. Steiner nutrient solution (Steiner, 1961) was applied for control plants. The humic substances were applied every 15 days and the rhizobacteria every 30 days, the treatments were placed directly in the soil at the base of the roots of the plant. A total of 7 strawberry plants were used for each treatment including the control.

Table 2. Treatments applied to the San Andreas variety strawberry crop

Treatments	Dose	Keys
1. Fulvic Acids (3 mL) + Mixture of Microorganisms (5 mL)	Dose 1	AFyMM d1
2. Fulvic Acids (3.5 mL) + Mixture of Microorganisms (4 mL)	Dose 2	AFyMM d2
3. Humic Acids (3 mL) + <i>Pseudomonas fluorescens</i> (5 mL)	Dose 1	AHyPF d1
4. Humic Acids (3.5 mL) + <i>Pseudomonas fluorescens</i> (4 mL)	Dose 2	AHyPF d2
5. Fulvic Acids (3 mL) + <i>Azospirillum brasilense</i> (5 mL)	Dose 1	AFyAzoz d1
6. Fulvic Acids (3.5 mL) + <i>Azospirillum brasilense</i> (4 mL)	Dose 2	AFyAzoz d2
7. Fulvic Acids (3 mL) + <i>Pseudomonas fluorescens</i> (5 mL)	Dose 1	AFyPF d1
8. Fulvic Acids (3.5 mL) + <i>Pseudomonas fluorescens</i> (4 mL)	Dose 2	AFyF d2
9. Mix of Humic and Fulvic acids (3 mL) + <i>Azospirillum brasilense</i> (5 mL)	Dose 1	MHyF+Azoz d1
10. Mix of Humic and Fulvic acids (3.5 mL) + <i>Azospirillum brasilense</i> (4 mL)	Dose 2	MHyF+Azoz d2
11. Control (Steiner Solution)		Control

Agronomic variables evaluated

At the end of the cultivation cycle, 240 days after transplantation, the height of the plant was measured with an 30 cm aluminum Ruler (Arly 3006) from the neck of the plant to the apex of the highest leaf, the number of leaves and number of crowns were evaluated manually by counting one by one , root volume was determined by volume displacement with a natural color plastic cylinder (Kimax 25301) with a capacity of 1 L, fresh weight of aerial part (leaves, petioles, crowns)

and roots was obtained on a digital scale (OHAUS model CS-5000). To obtain dry weight of aerial part and root, the samples were placed in drying oven (Yamato model DX-602) at a temperature of 60 °C for 48 h or until constant weight was reached, finally weight was recorded in grams.

Physiological variables such as gas exchange parameters, including stomatal conductance (g_s), net CO₂ assimilation rate (AN), transpiration (E) along with instantaneous water use efficiency (WUE) expressed as AN / E (Yinn *et al.*, 2006) were determined with a Li-6800 portable open gas exchange system (Li-Cor Inc., Lincoln NE) between 12:00 and 13:00 hours of the day, totally sunny, on the most recent fully expanded leaf of the well exposed upper canopy. For the measurements, the light saturation was maintained at 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with the Li-6800 LED lamp, the CO₂ concentration was set at 390 ppm, the leaf temperature at 25 °C and the relative humidity it was 55-65%. The midday stem water potential (SWP) was measured in two leaves covered by the lower canopy with a pump pressure chamber (PMS Instrument Company, Albany, OR) as described by Fulton *et al.* (2001). Chlorophyll was measured on the fully expanded leaf at 8:00 a.m. with a Konica Minolta brand SPAD-502.

Polar diameter of the fruit and the equatorial diameter of the fruit were measured with a digital calliper (STEREN model HER-411), the weight of the fruit was recorded with a digital scale (TJ model MH-500), the number of fruits was recorded per plant and the total yield of fruits per plant was reported in g / plant.

Total soluble solids content (TSS) was assessed by placing a drop of fruit juice on the lens of digital refractometer (Hanna Instruments model 96-801), the

readings were expressed in brix degrees (°B). Firmness was evaluated with a manual penetrometer, (WAGNER Instruments, model FDK) applying the force in the central part of the fruit. The strawberry fruit was macerated and the pH was evaluated with a digital potentiometer (Hanna Instruments, model HI98130).

Fruit vitamin C determination was achieved using the methodology reported by Padayatt *et al.* (2001), where 20 g of fresh fruit were macerated using a porcelain mortar with 10 mL of HCl at 2%, then 100 ml of deionized water were added and filtered with an absorbent gauze placed in a funnel over a flask, then a proportion of 10 mL was taken from the total volume of the filtrate and the titration was achieved with 2,6-dichlorophenolindophenol with the help from a glass burette (EISCO, CH0240G), until a constant pink color was observed. Vitamin C (mg 100 g FW) = (mL 2,6-dichlorophenolindophenol) (0.088) (total volume) (100) / (aliquot volume) (sample weight).

Titrateable acidity was determined by colorimetry according to the AOAC, (2000), for this, 10 g of fresh strawberry fruit were weighed, it was macerated homogeneously and then 100 mL of deionized water was added and filtered, from the total volume of the filtrate 10 mL were taken and added 2-3 drops of phenolphthalein were added and it was titrated with NaOH (0.1N) until obtaining a pink color. Titrable acidity was expressed as % citric acid. Where: V_{NaOH} = Spent volume of NaOH to titrate, N_{NaOH} = NaOH Normality, Meq citric acid = 0.064

$$\% \text{ acid} = (V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times \text{Meq citric acid} \times 100) / \text{sample volume}$$

The content of total phenols was determined with the methodology reported by Yu and Dahlgren (2000), with modifications, 2 g of fresh strawberry fruit were weighed and 5 mL of solution water: acetone (1:1) were added, then it was centrifuged at 15,000 revolutions per minute for 15 min, the supernatant was extracted, stored at 4 °C in the dark, then a 50 µL aliquot of the extract was taken and added 200 µL of Folin- Ciocalteu reagent, 500 µL of 20 sodium carbonate and 5 mL of distilled water, then samples were placed in a water bath at 45 °C for 30 minutes, finally the absorbance was read at 750 nm in a Bio-145025 BIOMATE 5 Thermo Electron Corporation spectrophotometer. A calibration curve made with gallic acid was used for quantification. The results were expressed in mg EQ of Gallic Acid * 100 g of PF-1.

Statistical analysis

All data obtained were analyzed by one way ANOVA with the statistical package Infostat version (2020). The Fisher's Least Significant Difference (LSD) test ($P \leq 0.05$) was used for mean separation.

Results and Discussion

Agronomic variables in strawberry cultivation

Biostimulants are substances that, when applied to plants through the soil, cause changes in vital and structural processes to contribute to the development of plants (Feitosa and Garófalo, 2019). The use of humic substances increased the number of leaves (NL) that showed significant differences between treatments (Table 3). With applications of AFyAzoz d1 it increased by 38.3% with respect to the control that showed less leaf development. With the AHyPF d2 treatment,

although the number of leaves increased by 15% more than the control, it was not significantly different. The rest of the treatments were all statistically equal to the control. Rätsep *et al.* (2015), when using humic acids to increase plant development and productivity of strawberry plants, reported that they obtained an increase of 5% with respect to their control. The increase found in our study was higher than that informed by Rätsep *et al.* (2015), and this may be due to the fact that the doses used in our experiment were higher than those applied by them.

In plant height (PH) no differences were observed among treatments (Table 3). Our results coincide with those reported by Shehata *et al.* (2011), where they used humic acids and compost in strawberry plants, they did not find significant differences in plant height with the applied treatments. In contrast, our findings differ from those registered by Álvarez *et al.* (2018), who evaluated the effect of beneficial microorganisms of the genus *Bacillus* on the growth of plants in strawberry and reported significant differences in plant height with an increase of 43% with respect to the control plants. This can possibly be attributed to the fact that the bacterial strain they used in their experiment adapted more efficiently to the prevailing conditions at the experiment site such as the nature of the soil and environmental conditions.

The number of crowns (NC) of the strawberry plants increased significantly by 38% with the application of AFyAzoz d1, followed by the plants treated with AFyMM d1 which increased it by 28.5% compared to the control plants. The other treatments behaved statistically equal as the control plants.

Table 3. Agronomic variables in strawberry cultivation with application of humic substances and rhizobacteria

Treatments	NL	PH (cm)	NC	RV (cm ³)	FWAP (g)	DWAP (g)	FWR (g)	DWR (g)
AFyMM d1	48.7b	21.0a	5.4ab	41.7f	200de	57.7fg	50.0f	9.7e
AFyMM d2	55.5b	21.9a	5.1abc	57.0bc	285b	74.7bc	72.0ab	14.2bc
AHyPF d1	57.2b	21.7a	5.1abc	54.0cd	282b	72.2bcd	62.7bcde	11.7de
AHyPF d2	60.4ab	21.9a	5.2abc	55.0cd	273bc	80.5ab	63.5bcd	14.2bc
AFyAzoz d1	72.2a	21.7a	5.8a	64.2a	359a	87.7a	76.2a	16.7a
AFyAzoz d2	53.4b	19.8a	4.2bc	46.2ef	246bcd	64.5def	57.2def	10.7de
AFyPF d1	56.7b	20.7a	4.7bc	46.2ef	205cde	65.5def	58.5cdef	12.7cd
AFyF d2	54.2b	19.0a	4.7abc	62.0ab	240bcd	68.5cde	68.5abc	16.2ab
MHyF+Azoz d1	51.0b	20.8a	4.2bc	49.5de	186de	60.5def	55.7def	11.2de
MHyF+Azoz d2	53.7b	19.8a	5.0abc	63.7a	224bcd	63.7efg	71.2ab	16.5ab
Control	52.2b	18.0a	4.2c	45.0ef	136e	52.0g	53.0ef	11.7de
MSD	13.03	2.9	1.03	14.9	90.9	22.9	19.4	4.8
ANVA ($P \leq$)	0.0499	0.1701	0.0492	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

NL= Number of leaves, PH= Plant height, NC = Number of crowns, RV = Root volume, FWAP = Fresh weight of aerial part, PSPA = Dry weight of aerial part, FWR = Fresh weight of root, DWR = Dry weight of root. Values with the same letter within columns are statistically equal (LSD test, $P \leq 0.05$). MSD = Minimum significant difference. ANVA= Variance analysis

These results suggest that fulvic acids positively influenced the increase in the number of crowns since, as mentioned by Aminifard *et al.* (2012a), fulvic acid influences the growth and plant development of plants by increasing the rate of cell division. The increase in NC was possibly due to the fact that by applying *Azospirillum brasilense* and the mixture of rhizobacteria in combination with fulvic acids, plant growth in the strawberry plant was enhanced, help improve the availability of plant nutrients. Root Volume (RV) increased significantly with applications of AFyAzoz d1 in 42.6%, MHyF + Azoz d2 in 41.5% and with AFyF d2 in 37.7% followed by the treatments with AFyMM d2, AHyPF d2 and AHyPF d1 with 26.6, 22.2 and 20% more in VR compared to control plants. The rest of the treatments were not different from the control, except for the plants treated with AFyMM d1 in which a statistically lower value of 7.3% than the control plants was obtained. The

greatest increase in RV was favored with the applications of fulvic acids in combination with the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*, coinciding with Marcondes *et al.* (2019) who reported that inoculations with strains of *Azospirillum brasilense* significantly increased the size of the roots and therefore its volume. Likewise, it coincides with that mentioned by Saidimoradi *et al.* (2019), who applied humic substances to reduce salinity stress in strawberry cultivation, and reported an increase of 41.0% in root volume with respect to the control. In contrast, these results differ with a study effected out by Ortiz *et al.* (2016), where they obtained only a 1.8% increase in root volume in strawberry plants with respect to their control when used phosphorus solubilizing rhizobacteria such as *Pseudomonas tolassi*, *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*. This suggests that for increasing the volume of the root *Azospirillum brasilense* in combination with humic substances is more efficient than the phosphorus-solubilizing rhizobacteria. The plants treated with AFyMM d1 that produced a statistically lower 7.9% in RV when compared to the control plants, could be associated with the fact that the inoculum of microorganisms at certain concentrations inhibits the development and growth of roots and therefore the volume (Bashan, 1990).

The fresh weight of the aerial part (FWAP) including crown, petiole and lamina, increased significantly in 163% with the application of AFyAzoz d1 followed by the treatments AFyMM d2, AHyPF d1 and d2, AFyAzoz d2, AFyF d2 and MHyF + Azoz with an increase of 109, 107, 100, 80, 76.4 and 64.7% respectively with respect to the control, while the other treatments were not different from the control. The dry weight of the aerial part (DWAP) had a similar behavior to the fresh

weight of the aerial part and increased significantly with applications of AFyAzoz d1 in 67.6% and with the treatment of AHyPF d2 in 54.8% followed by AFyMM d2, AHyPF d1, AFyF d2, AFyAzoz d2 and MHyF + Azoz d1 with 43.6, 38.8, 31.7, 25.9, 24 and 16.3% more respectively, this compared to the control plants. These effects coincide with that found by Haggag *et al.* (2012), who applied a strain of *Pseudomonas fluorescens*, in strawberry cultivation to optimize nutritional conditions and biomass production, they obtained an increase of 25% and 28.5% in fresh and dry weight respectively with respect to the control. With the treatments applied in our experiment, the differences found were greater than that reported by these authors, which could be due to the fact that in addition to *Pseudomonas fluorescens*, humic substances were applied; also, one possibility is that the strawberry varieties were different.

The fresh weight of root (FWR) increased significantly with the application of AFyAzoz d1 in 43.7%, being the highest value, followed by the treatments AFyMM d2, MHyF + Azoz d2, AFyF d2 and AHyPF d2 with 35.8, 34.3, 29.2 and 19.8% respectively with respect to the control. Likewise, the dry weight of root (DWR), increased mostly with the AFyAzoz d1 treatment in 42.7%, being the treatment that caused the highest dry weight, followed by the MHyF + Azoz d2, AFyPF d2, AFyMM d2 and AHyPF d2 treatments in 41, 38.4, 21.3 and 21.3% respectively compared to the control plants. The other treatments were not different from the control, however, the plants treated with AFyMM d1 obtained a lower value than the control in 7.3% FWR and 17% less in DWR. The FWR and DWR were favored with fulvic acids plus the rhizobacteria *azospirillum brasilense*, this

coincides with Pedraza *et al.*, (2010), who reported an increase in strawberry roots due to the effect of *Azospirillum*. In other crops such as tomato, Ribaudó *et al.* (2006) informed an increase in root hair length and root fresh weight. However, it is different from that reported by Castañeda-Saucedo *et al.* (2013), who applied a strain of *Azospirillum brasilense* on strawberry Albión and did not find significant differences between treatments in root dry weight, this could be due to the fact that in this particular study the authors applied the rhizobacteria alone without chemical fertilization. Naiman *et al.*, (2009) in other crops such as wheat, when using plant growth promoting bacteria (PGPB) alone, did not find significant statistical differences and in our study the treated plants were fertilized and also humic substances were added as a carbon source, which suggests that the combination of them applied in our study favored and caused a greater root increase. With respect to the plants treated with AFyMM d1 that caused a lower value than the control in 7.3% in PFR and 17% less in PSR, could be caused by an over dose of microorganisms as indicated by Bashan, (1990), who reported that when the inoculum of microorganisms is $> \log 8$ at $\log 10$ CFU / ml, they inhibit root development and growth. In our study, this particular treatment included the three Rhizobacteria, so it could have that high concentration when applied and caused the inhibition of roots and consequently the decreases reported in this study compared to the control plants.

Physiological variables

Even though, it has been found that biostimulants are effective to improve

the resistance of plants to adverse effects caused by stress from environmental conditions, in this study the stomatal conductance values were not significantly affected by any treatment applied (Table 4). These effects are different from those found by Arıkan *et al.* (2020), who applied in calcareous soil a strain of the genus *Pseudomonas* to evaluate the effects of salinity in strawberry plants, they obtained an increase of 162% in stomatal conductance in comparison to the control plants; the increase could be caused due to the fact that control plants were possibly affected by salinity and by calcareous soil conditions, a situation of stress; these authors reported that the strains of the genus *Pseudomonas* can be used for situations of stress due to salinity and calcareous soil conditions in strawberry cultivation.

Table 4. Physiological variables in strawberry cultivation with application of humic substances and rhizobacteria

Treatments	Stomatal conductance (gs) (mmoles/m ² s ⁻¹)	Trans p.(E) (mol m ⁻² s ⁻¹)	CO ₂ (AN) (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Intrinsic efficiency (AN/E)	Stem water potential (MPa)	Chl (SPAD)
AFyMM d1	407.7a	2.1cd	11.2ef	7.3a	-0.82a	52.0a
AFyMM d2	483.7a	1.9d	10.0fg	5.4abcd	-0.80abc	52.3a
AHyPF d1	347.a	2.3bcd	13.4cde	5.9abc	-0.66abc	52.5a
AHyPF d2	350.6a	4.2a	15.3bc	3.6cd	-0.71abc	52.3a
AFyAzoz d1	405.7a	2.5bcd	15.6bc	5.4abcd	-0.61c	51.5a
AFyAzoz d2	448.8a	1.9d	16.6ab	4.3bcd	-0.62bc	51.8a
AFyPF d1	493.2a	2.1bcd	18.9a	6.8ab	-0.69abc	49.6a
AFyF d2	401.2a	3.2abc	12.8de	2.9d	-0.80ab	48.7a
MHyF+Azoz d1	332.7a	3.2abc	15.3bcd	4.9abcd	-0.84a	49.9a
MHyF+Azoz d2	412.6a	3.3ab	15.8bc	3.6cd	-0.80ab	50.8a
Control	357.2a	2.0cd	8.3g	4.2bcd	-0.71abc	50.6a
MSD	120.02	1.14	2.47	2.7	0.160	2.94
ANVA (P≤)	0.1785	0.0033	0.0001	0.0384	0.0460	0.1599

Transp= Transpiration, CO₂ = CO₂ assimilation rate, Intrinsic efficiency= Intrinsic efficiency of the water, Chl=Chlorophyll. Values with the same letter within columns are statistically equal (LSD test, P≤0.05). MSD = Minimum significant difference. ANVA= Variance analysis

Transpiration increased significantly in plants treated with AHyPF d2,

MHyF + Azoz d2 by 110 and 65% respectively compared to the control, the rest of the treatments were statistically equal to the control. Humic acids caused an increase of transpiration in strawberry plants. These results coincide with an experiment carried out by Soppelsa *et al.* (2019), who applied biostimulants to improve production and yield in strawberry, when using humic acids (HA), they reported an increase in the transpiration rate by 25%. However, the increase found in our experiment was higher than that reported by Soppelsa *et al.* (2019), which can possibly be attributed to the fact that they used humic acids alone and, in our experiment, they were used in combination with microorganisms and also the doses of these were higher. In contrast, the results found in our study were different from those reported by Reina and Peluzio (2017), who inoculated with the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in soybean cultivation and did not obtain any significant increase in the transpiration rate.

The CO₂ assimilation rate (AN) increased significantly with the application of AFyPF d1 and AFyAzoz d2 in 127 and 100% respectively, in relation to the Control plants. Other treatments that increased AN with respect to the control were MHyF + Azoz d2, AFyAzoz d1, MHyF + Azoz d1, AHyPF d1, AFyPF d2, AHyPF d2, and AFyMM d1 and the increase was 90.3, 87.9, 84.3, 84.3, 61.4, 54.2 and 39.2% respectively, the AFyMMd2 treatment behaved statistically the same as the control. In an experiment carried out by Gamboa *et al.* (2019), found similar results when applied treatments with nitrogen fixing rhizobacteria such as *Azospirillum* in strawberry plants, reporting an increase in gas exchange by 76.9%.

However, Soppelsa *et al.* (2019), found lower values in AN for plants treated with humic acids applied 57 days after transplantation, they reported a 33.3% increase, this could be due to the fact that the doses used by these authors were smaller.

The intrinsic efficiency of the water in the plant increased significantly with the application of AFyMM d1 with an increase of 73.5% with respect to the control plants, the rest of the treatments used were statistically equal to the control. In a study carried out by Bulegon *et al.* (2016) where they used a strain of *Azospirillum brasilense* in soybean plants, the inoculations increased the intrinsic efficiency by 22.9% compared to the control. The increase in our experiment could be due to the use of a mixture of microorganisms (*Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* and *putida*) that helped strawberry plants to have a better water use efficiency. As mentioned by Medrano *et al.* (2007) that plant water use efficiency can be understood as the volume of water that plants need to consume (transpiration) to incorporate a certain amount of carbon into their biomass (photosynthesis).

Regarding water potential, the treatments applied did not affect strawberry plants as the values reported in a range from -0.61 to -0.84 MPa were all statistically equal to the control (Table 4), however, numerically the treatments AHyPF d1, AFyAzoz d1 and d2 and the treatment AFyPF d1 showed averages values of -0.66, -0.61, -0.62 and -0.69 MPa which were a little lower than control plants which had an average value of -0.71 MPa. According to Klamkowski and Treder

(2006), in a study to examine water deficiency in growth and physiological responses in strawberry plants, they reported water potential values for well-watered unstressed plants in a range similar to the ones reported here and for stressed plants they reported values from -1.58 to -1.81 MPa. In another study by Jensen *et al.* (2009) when making measurements of water potential in strawberry plants, he obtained averages of -0.58 MPa throughout the experiment indicating that the plants grew under low levels of stress. In an investigation effected out by Saeed *et al.* (2016) they reported significant differences between their treatments when applying an *Azospirillum* strain in the canola crop, with an increase of 11% compared to the control, this increase reported by these authors could be due to the fact that They used a control without inoculation with the rhizobacteria (-11.1 MPa) and plants exposed to drought (-10.0 MPa), while in our work no drought stress was used in the control and all the plants were under the same irrigation conditions.

For the SPAD units, no significant differences were observed with the application of treatments to strawberry plants. These results coincide with Palencia *et al.* (2016), in a study carried out to evaluate the quality in strawberry cultivation, when measured the plants, there were no significant differences in SPAD readings among their treatments. However, these results differ from what was found by Lovaisa *et al.* (2015), using strawberry plants cultivar Fortuna, which were inoculated with *Azospirillum brasilense*, when evaluating the chlorophyll content in SPAD units, a positive effect was observed in leaves from inoculated

plants; they reported a 32% increase compared to the non-inoculated control. It is also different from that reported by Erdogan *et al.* (2016), when using rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *putida* to moderate the impacts of drought stress in strawberry plants, they observed an increase of chlorophyll in SPAD readings, of 24.5 and 22.7% respectively, compared to the control. In the same way Karlidag *et al.* (2013) with the application of plant growth promoting bacteria (PGPB) in strawberry plants under saline field conditions, the chlorophyll content in SPAD units increased significantly with the use of rhizobacteria compared to the non inoculated control; the increase observed by these authors may be due to the fact that they used both drought and salt stress that interfered in the plants cell function, ionic imbalance and disorders in metabolic activities.

Strawberry production and yield variables

The Polar diameter of fruit (PDF) increased statistically with the application of MHyF + Azoz d1 and d2 in 6.6 and 6.1% respectively compared to the control (Table 5) the rest of the treatments were statistically equal to control plants. The Equatorial diameter of fruit (EDF) increased with the application of MHyF + Azoz d1 in 5.5% with respect to the control, while the other treatments behaved statistically the same as the control. Castañeda *et al.* (2013) who inoculated with *Azospirillum brasilense* strawberry plants and reported values of DPF and EDF by 4 and 2% respectively than the control. In other crops such as tomato, Andrade *et al.*, (2020) with applications of *Azospirillum brasilense* did not find any significant differences between treatments when evaluating PDF and EDF. In

contrast, Aghaeifard *et al.* (2015) with the utilization of humic acids in the strawberry crop they reported increases in PDF and EDF by 36 and 60.6% respectively, this increase was possibly due to the different doses of humic acids they applied in their experiment compared to ours.

Fruit weight was favored by the AFyAzoz d1 treatment with an increase of 12.8% compared to the control, while the rest of the treatments applied were statistically equal to the control. However, these results differ from those registered by Castañeda *et al.* (2013) who inoculated strawberry plants with *Azospirillum brasilense* and obtained a fruit weight decrease of 8.3% with respect to the control. In orange crop Samra *et al.* (2017) applied fulvic acids alone and in combination with humic acids and they did not find significant differences between the applied treatments. In corn crop Kumar *et al.* (2005), applied fulvic acids derived from different sources of organic matter and obtained a significant increase of 0.4% in grain weight with respect to the control. The increase found in our experiment could be due to the fact that the Fulvic acids used, extracted from Leonardite, were combined with a rhizobacteria to potentiate its benefits.

The number of fruits increased with the application of AFyMM d2, AFyAzoz d1, AFyAzoz d2 and AFyMM d2 in 51.0, 40.2 and 38.5 33.1% respectively, the rest of the treatments were statistically equal to the control. These results were different from those reported by Kirschbaum *et al.* (2019), who applied humic and fulvic acids in strawberry San Andreas, and obtained an increase of 6.3% in number of fruits compared to their control. Suh *et al.* (2014), found similar results when applying fulvic acids via foliar spray in tomato crop reporting an

increase of 58% in the number of fruits compared to the control. In contrast, Castañeda *et al.* (2013) inoculated with *Azospirillum brasilense* and did not find any significant differences for the number of fruits per plant with any of the treatments applied. The increase in our study can be possibly attributed to the fact that rhizobacteria were used in combination with humic and fulvic substances.

Table 5. Production variables in strawberry cultivation with application of humic substances and rhizobacteria

Treatments	PDF (mm)	EDF (mm)	Fruit weight (g)	Number of fruits	Yield (g / plant)
AFyMM d1	41.6abc	30.6bcd	16.0abcd	24.5ab	394.4ab
AFyMM d2	41.3abc	31.1abcd	16.1abcd	27.8a	448.1a
AHyPF d1	40.3c	30.9abcd	15.6bcd	24.1abc	378.7abc
AHyPF d2	40.5c	29.9d	15.0d	23.4abc	352.9abc
AFyAzoz d1	42.4abc	31.9ab	17.6a	25.8ab	454.6a
AFyAzoz d2	42.6abc	31.3abcd	17.3ab	25.5ab	440.2a
AFyPF d1	42.1abc	31.5abc	16.9ab	23.8abc	412.9ab
AFyF d2	40.7bc	30.3cd	14.8d	21.4bc	322.7bc
MHyF+Azoz d1	43.0ab	32.2a	17.9a	20.1bc	360.7abc
MHyF+Azoz d2	43.2a	31.3abcd	16.7abcd	18.5c	309.6bc
Control	40.5c	30.5bcd	15.6bcd	18.4c	285.0c
MSD	2.3	1.4	1.9	5.7	106.8
ANVA ($P \leq$)	0.0322	0.0393	0.0252	0.0268	0.0206

PDF = Polar diameter of fruit, EDF = Equatorial diameter of fruit. Values with the same letter within columns are statistically equal (LSD test, $P \leq 0.05$). MSD = Minimum significant difference. ANVA= Variance analysis

The fruit yield (Table 5) increased significantly with the application of AFyAzoz d1, AFyMM d2, AFyAzoz d2, AFyPF d1 and the treatment AFyMM d1 in 59.5, 57.2, 54.4, 44.8 and 38.3% respectively compared to the control, while the rest of the treatments were significantly equal to the control. The yield was favored with fulvic acids, and the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomona fluorescens*, the results were slightly similar to that reported by Pirlak and Kose (2009), where they used rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* in

the cultivation of strawberry variety 'Selva' and reported an increase by 25.7% with respect to the control. In an investigation carried out by Xudan (1986) in wheat crop where they applied fulvic acids, the yield increased by 96% with respect to the control, this could possibly be due to the fact that the applications of the fulvic acids were in foliar form. Bocanegra *et al.* (2006), mentioned that fulvic acids via foliar spray increased the mobilization and absorption of nutrients and accelerated the metabolic processes of plants that manifested themselves with an increase in yield. Turan *et al.* (2021), when applying a commercial product with fulvic and humic acids plus microorganisms, the yield significantly increased in cherry tomato.

Quality variables in strawberry cultivation

Total soluble solids (TSS) measured in °Brix are shown in Figure 1A, the treatment AFyPF d1 and MHyF + Azoz d1 significantly increased the TSS in 25.8 and 19.0 % respectively compared to control. The rest of the treatments applied to the plants were statistically equal to the control. TSS were favored with fulvic and humic acids as well as *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*, these results agree to the ones reported by Aghaeifard *et al.* (2015), where they assessed the impact of humic acid alone applied to strawberry plants and obtained an increase in SST of 13.9%. In a study by Hosseini *et al.* (2013), when using humic acids alone in strawberry cultivation, TSS increased by 6.7% compared to the control. In addition, Ortiz *et al.* (2016), when using rhizobacteria alone of the genus *Pseudomonas*, they reported increases in TSS of 1.2% in the strawberry fruit. The increase registered in our experiment in the total content

of TSS with the application of rhizobacteria and humic substances may be possibly attributed to the fact that they were used in combination. Tripathi *et al.* (2016) mentioned that the application of these biostimulants accelerates the metabolic process of starch in soluble compounds due to the enzymatic activity and increase the transport of sugars from the leaves to the strawberry fruits.

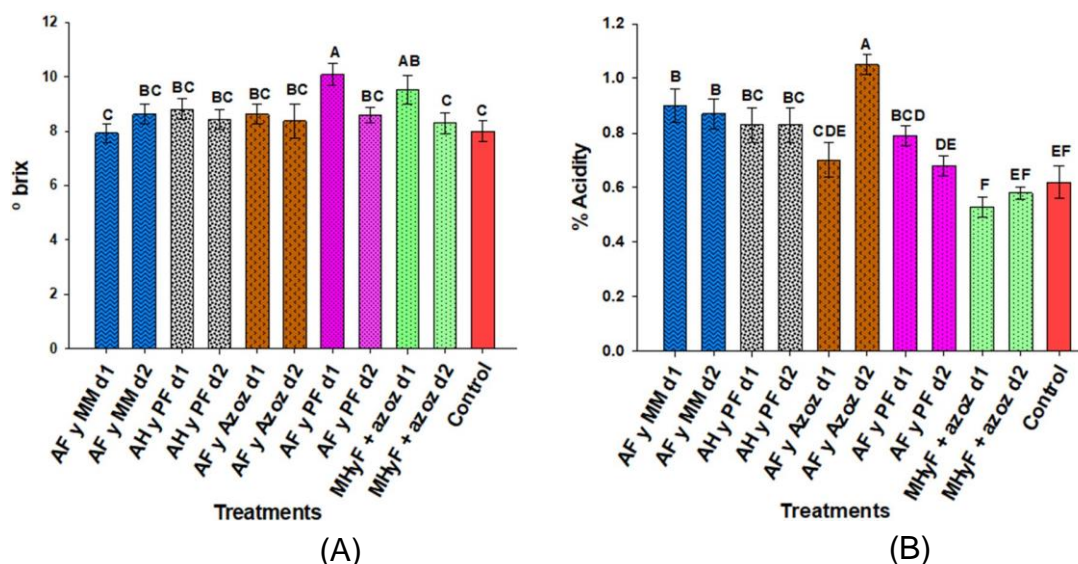


Figure 1. Effect of applications of humic substances and rhizobacteria in (A) Total Soluble Solids (TSS) and (B) Titratable Acidity of strawberry fruit 'San Andreas' variety

For the titratable acidity of the fruit (Figure 1B), the treatments AFyAzoz d2, AFyMM d1 and d2, AHyPF d1 and d2 and the AFyPF d1 significantly increased the acidity in 69.3, 45.1, 40.3, 33.8, 33.8 and 27.4 % compared to the control, the other treatments were statistically equal to the control. These results coincide with the ones reported by Aghaeifard *et al.* (2015) when using humic acids in strawberry cultivation, they reported an increase of 58.4% with respect to the control. However, it is different from results found by Ullah *et al.* (2017), where they

studied the influence of humic acid on the growth and yield of strawberry 'Chandler', they reported a 2.3 % lower titratable acidity than the control. In a study carried out by Todeschini *et al.* (2018), where they used strains of the genus *Pseudomonas* in combination with mycorrhizal fungi, they found a 2.2% increase in titratable acidity in strawberry fruits with respect to control plants. While in other plants, González *et al.* (2018), when applying *Pseudomonas lini* in tomato cultivation, the acidity of the fruit increased by 18.9% with respect to the control without inoculation. The increase in titratable acidity in strawberry fruits observed in our work, could possibly be due to the fact that different concentrations and doses of humic substances were used. Organic acids are used during fruit respiration, being essential components in the respiratory cycle of tricarboxylic acids (Kays, 2004). Hence, they contribute greatly to flavor, in a typical relationship between sugars and acids in different fruit species such as strawberry (Wills *et al.*, 1998).

Fruit pH (Figure 2A), increased with applications of in MHyF + Azoz d1, AFyMM d1, AFyPF d2, AFyMM d2, MHyF + Azoz d2 and AFyAzoz d2 in 10.3, 8.0, 7.7, 5.0, 3.8 and 3.3% respectively compared to the control, the other treatments were statistically equal to the control. The fruit pH increased with *azospirillum* and *pseudomonas*, this coincides with what was reported by Castañeda *et al.* (2013) where they inoculated with *Azospirillum brasilense* and found an increase of 3.3% in strawberry fruit pH compared to the control. However, Pirlak and Kose (2009), did not find significant differences in fruit Ph when applying rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* in strawberry cultivation. In another study carried out by Zhang *et al.* (2021) when applying fulvic acids in the tomato crop via

foliar spray, the pH of the fruit increased by 1%. These increases in fruit pH found in this research are possibly explained by what Rodríguez *et al.* (2004) reported, indicating that, the pH increases as the fruit reaches maturity, thus providing the characteristic flavor of the fruit, according to the species. In this research, the fruits of then treatments indicated above with higher pH were harvested earlier than the fruits of control plants, as mentioned by Torres *et al.* (2012), that the increase in pH is influenced by the increase in the state of maturity in certain fruits.

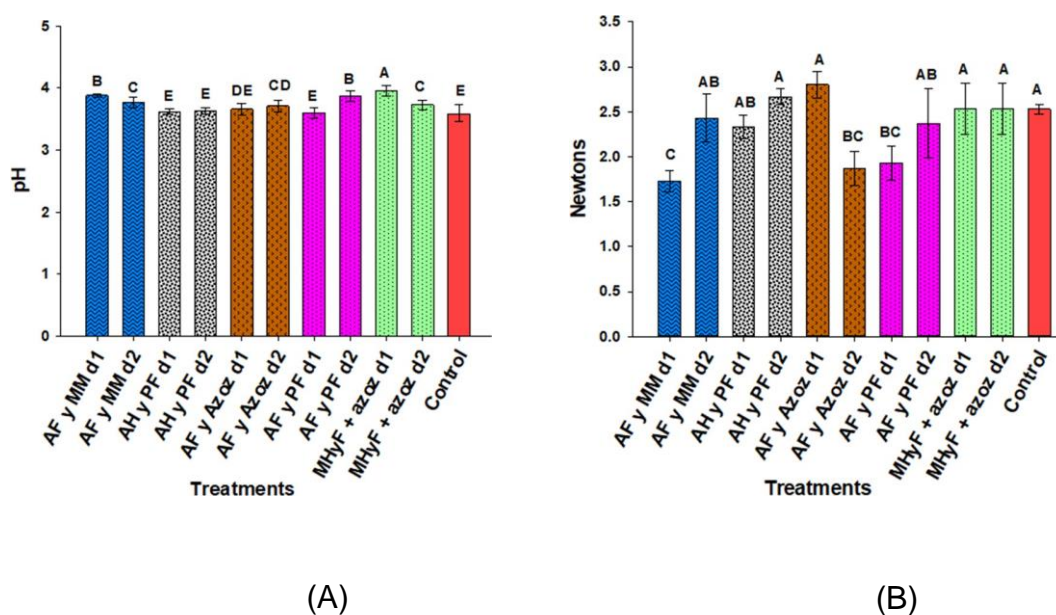


Figure 2. Effect of applications of humic substances and rhizobacteria in (A) pH and Firmness (B) of strawberry fruit 'San Andreas' variety

For fruit firmness (Figure 2B) the treatments AFyMM d1, AFyAzoz d2, and AFyPF d2, were statistically lower than the control, in 43.0, 35.2 and 31.0%, the other treatments behaved significantly the same as the control. The results are different from those found by Pii *et al.* (2018), when applying the rhizobacteria

Azospirillum brasilense they reported an increase in firmness by 16.7% with respect to the control. Esitken *et al.* (2010), in a study carried out with rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* did not find significant differences between their treatments when evaluating the firmness of the fruit, this could be due to the fact that in their experiment when applying the rhizobacteria *Pseudomonas* and *Bacillus* they did not obtain either significant difference in Calcium (Ca) with respect to the control. Rincón and Martínez (2015) indicated that Ca fulfills the function of firming agent, due to the fact that calcium ions act on the pectin chains to form bridges between these, increasing the strength of the cell wall and the firmness in fruits and vegetables. Although we did not study the concentration of Ca, this could be the reason why the firmness decreased with the aforementioned treatments, coinciding with Pilanal and Kaplan (2003), when applying humic acids in high concentrations of 400 kg/ha decreased the concentration calcium in strawberry. Dominguez *et al.* (2012), in an experiment with the application of *Azospirillum brasilense* in mesquite seedlings, reported a decrease in Ca concentration compared to the control without inoculation.

Vitamin C (Figure 3A), increased significantly with the application of AFyPF d2, AFyAzoz d2 and MHyF + Azoz d1 in 17.1, 14.8 and 10.3% compared to the control, the rest of the treatments were equal to the control. These results are different from those reported by Pirlak and Kose (2009), where the increase in Vitamin C was 1.9% compared to the control when using rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* applied to strawberry cultivation. Aminifard *et al.* (2012b), with applications of fulvic acids to the pepper

crop, did not observe differences between treatments when evaluating Vitamin C. However, Eshghi and Garazhian, (2015) using humic acids in applications to the soil via drench in strawberry cultivation increased Vitamin C by 45% with respect to the control, this increase could possibly be attributed to the fact that they used different doses of humic acids.

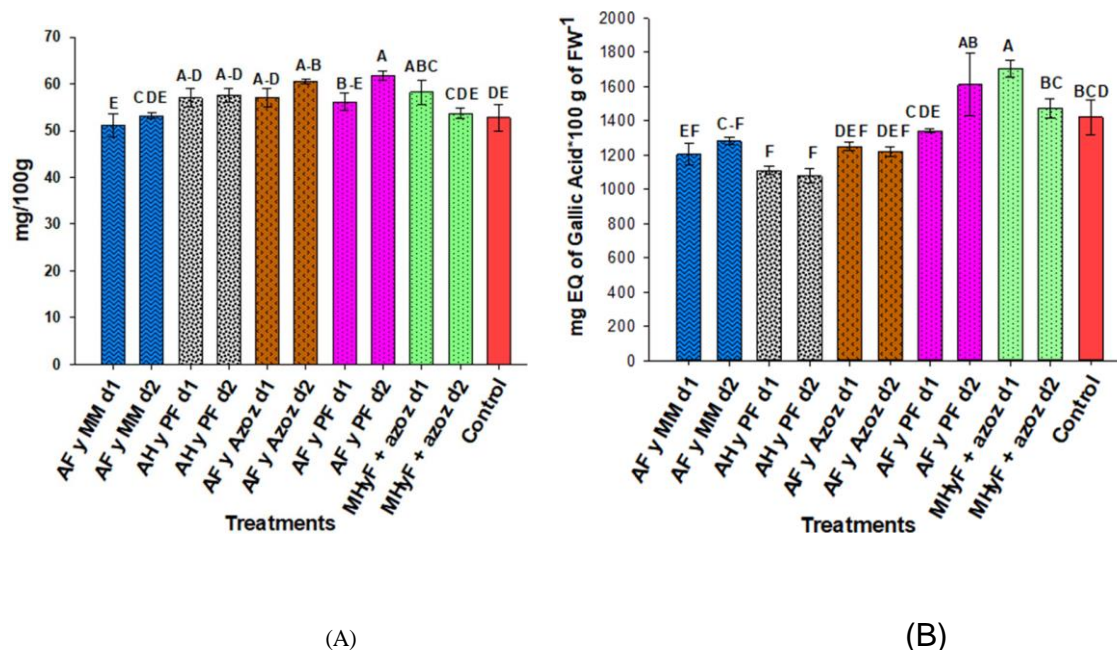


Figure 3. Effect of applications of humic substances and rhizobacteria in Vitamin C (A) and Total Phenols (B) of strawberry fruit 'San Andreas' variety. Values with the same letter within columns are statistically equal Fisher's (LSD) test ($P \leq 0.05$).

The total phenols (Figure 3B), increased significantly in the strawberry fruit with the MHyF + Azoz d1 treatment by 20% compared to the control, however, the AFyMM d1, AHyPF d1 and d2 treatments obtained a decrease of 17.8, 27.9 and 31.7% compared to the control, the rest of the treatments were statistically equal to the control. Soppelsa *et al.* (2019), used humic acids applied to the

strawberry crop, reporting an increase in total phenols of 6.5% compared to the control. Andrade *et al.* (2020) when applying the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* in the tomato crop they obtained an increase of 19.8% compared to the control. The treatments AFyMM d1, AHyPF d1 and d2 that decreased in total phenols with respect to the control, coincides with that reported by Aminifard *et al.* (2012b) where the applications of humic acids at high concentrations decreased on average the total phenols in cultivation of pepper with respect to the control.

Conclusions

The biostimulants based on humic substances and rhizobacteria applied to the strawberry crop increased agronomic variables such as the number of leaves with humic acids + *Pseudomonas Fluorescens* d2, the root volume with fulvic acids + *Azospirillum brasilense* d1, fulvic acids + *Pseudomonas Fluorescens* d2 and mix of humic and fulvic + *Azospirillum brasilense* d2; in physiological variables, the CO₂ assimilation rate increased with fulvic acids + *Pseudomonas Fluorescens* d1 and with fulvic acids + *Azospirillum brasilense* d1; in production variables, fruit weight increased with applications of fulvic acids + *Azospirillum brasilense* d1 and mix of humic and fulvic + *Azospirillum brasilense* d1 and the yield with fulvic acids + *Azospirillum brasilense* d1 and d2, fulvic acids and mixture of microorganisms d2; in quality variables, TSS were increased with fulvic acids + *Pseudomonas Fluorescens* d1 and the mix of humic and fulvic + *Azospirillum brasilense* d1, vitamin C with fulvic acids + *Pseudomonas Fluorescens* d2, fulvic acids + *Azospirillum brasilense* with the

mix of humic and fulvic d2 + *Azospirillum brasilense* d1. Biostimulants made with humic substances combined with rhizobacteria are an ecological option instead of chemical fertilizers, with its inherent reduction in soil and environmental contamination, in addition to favoring strawberry fruit production and quality.

Authors' Contributions

Investigation: SMC, JAGF, MDDM; Methodology: MDDM, RMV, SMC; Resources: JAGF, MDDM, ARO, AHP; Supervision: JAGF, MDDM, RMV; Validation: JAGF, MDDM, DAC; Drafting: SMC, JAGF, RMV Review and editing: JAGF, MDDM. All authors read and approved the final manuscript.

Ethical approval (for researches involving animals or humans) Not applicable.

Acknowledgements

Simeón Martínez de la Cruz acknowledges the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the scholarship granted to carry out Postgraduate studies.

Conflict of Interests

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

References

Agbodjato NA, Adoko MY, Babalola OO, Amogou O, Badé FT, Noumavo PA, Adjanohoun A, Baba-Moussa L (2021). Efficacy of biostimulants

- formulated with *Pseudomonas putida* and clay, peat, clay-peat binders on maize productivity in a farming environment in Southern Benin. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5:666718. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.666718>.
- Aghaeifard F, Babalar M, Fallahi E, Ahmadi A (2015). Influence of humic acid and salicylic acid on yield, fruit quality, and leaf mineral elements of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) Cv. Camarosa. *Journal of Plant Nutrition* 39(13):1821-1829. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1088023>.
- Álvarez M, Tucta F, Quispe E, Meza V (2018). Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp). *Scientia Agropecuaria* 9(1):33-42. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.04>
- Aminifard MH, Aroiee H, Nemati H, Azizi M, Jaafar ZE (2012a). Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. *African Journal of Biotechnology* 11:13179-13185. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1507>
- Aminifard MH, Aroiee H, Azizi M, Nemati H, Hawa ZE, Jaafar (2012b). Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 18(4):360- 369. <http://dx.doi.org/10.1080/10496475.2012.71390>
- Andrade A, Fortis M, Preciado P, Orozco JA, Yescas P, Rueda EA (2020). *Azospirillum brasilense* and solarized manure on the production and phytochemical quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomy* 10:12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121956>
- AOAC (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods, Assoc. Off. Anal. Chem. Int. (AOAC), Arlington, VA, USA.
- Arikan S, Esitken A, Pırlak L, Dönmez MF, Turan M (2020). Plant growth promoting rhizobacteria mitigate deleterious combined effects of salinity and lime in soil in strawberry plants. *Journal of Plant Nutrition* 12. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1766073>
- Bashan Y (1990). Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation

enhanced proton efflux of intact wheat roots.

Canadian Journal of Microbiology 36:419-425. <https://doi.org/10.1139/m90-073>

Bocanegra MP, Lobartini JC, Orioli GA (2006). Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights. Communications in Soil Science and Plant Analysis 37:239- 248. <https://doi.org/10.1080/00103620500408779>

Bulegon LG, Guimarães VF, Egewarth VA, Santos MG, Heling AL, Ferreira SD, Wengrat APGS, Battistus AG (2016). Growth and gaseous changes in the vegetative period of soybean inoculated with diazotrophic bacteria. Nativa 4(5):277-286. <http://dx.doi.org/10.14583/2318-7670.v04n05a03>.

Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, Piccolo A (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. Scientia Horticulturae 196:15-27 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>

Cano MA (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. [Interaction of beneficial microorganisms in plants: mycorrhizae, *trichoderma* spp. and *pseudomonas* spp. A review]. Una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica 14(2):15-31.

Castañeda-Saucedo MC, Gómez-González G, Tapia-Campos E, Núñez-Maciel O, Barajas-Pérez JS, Rujano-Silva ML (2013). Efecto de *Azospirillum brasilense* y fertilización química sobre el crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de fruto de fresa (*fragaria x ananassa* Duch) [Effect of *azospirillum brasilense* and chemical fertilization on the growth, development, yield and fruit quality of strawberry (*fragaria x ananassa* Duch)]. Revista Interciencia 38(10):737-744. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33929482008>

Domínguez JA, Muñoz D, Planelles R, Grau JM, Artero F, Anriquez A, Albanesi A (2012). Inoculation with *Azospirillum brasilense* enhances the quality of mesquite *Prosopis juliflora* seedlings. Forest Systems 21(3):364- 372.

<https://doi.org/10.5424/fs/2012213-02135>

- Dos Santos RM, Díaz PAE, Lobo LLB and Rigobelo EC (2020). Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: characteristics and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4:136. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>
- Du Jardin P (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196:3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Esitken A, Yildiz HE, Ercisli S, Figen Donmez M, Turan M, Gunes A (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae* 124(1):62-66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>
- Ekin Z (2019). Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. *Sustainability* 11(12):341711. <https://doi.org/10.3390/su11123417>
- Erdogan U, Cakmakci R, Varmazyari A, Turan M, Erdogan Y, Kıtır N (2016). Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberries under water deficit stress. *Zemdirbyste-Agriculture* 103(1):67-76. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.009>
- Eshghi S, Garazhian M (2015). Improving growth, yield and fruit quality of strawberry by foliar and soil drench applications of humic acid. *Iran Agricultural* 34(1):14-20. <https://doi.org/10.22099/IAR.2015.3031>
- Feitosa AC, Garófalo LH (2019). Biostimulants and their role in improving plant growth under abiotic stresses. *Biostimulants in Plant Science* 14. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88829>
- Fernandes C, Cecato U, Trento T, Mamédio D, Galbeiro S (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. [Azospirillum spp. in grasses and forages. Review]. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 11(1):223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>

- Fulton A, Buchner R, Olson B, Schwankl L, Gilles C, Bertagna N, Walton J, Shackel K (2001). Rapid equilibration of leaf and stem water potential under field conditions in almonds, walnuts and prunes. *HortTechnology* 11:609-615. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.11.4.609>
- Gamboa AP, Delgadillo J, Almaraz JJ, Robledo A, Alarcón A (2019). Respuesta de *Fragaria mexicana* y comunidades microbianas rizosféricas al aumento de temperatura. [Response of *Fragaria mexicana* and communities rhizospheric microbial cells to temperature increase]. *Revista Biologica Tropical* 67(1):94-106.
- González G, Espinosa B, Cano P, Moreno A, Leos L, Sánchez H, Sáenz J (2018). Influence of rhizobacteria in production and nutraceutical quality of tomato fruits under greenhouse condition. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9 (2):367-379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1078>
- Haggag W, Abo M (2012). Production and optimization of *Pseudomonas fluorescens* biomass and metabolites for biocontrol of strawberry grey mould. *American Journal of Plant Sciences* 3:836-845. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.37101>
- Hosseini Farahi M, Aboutalebi A, Eshghi S, Dastyaran M, Yosefi F (2013). Foliar application of humic acid on quantitative and qualitative characteristics of 'Aromas' strawberry in soilless culture. *Agricultural Communications* 1(1):13-16.
- InfoStat, Versión (2020). Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=36>
- Jensen NL, Jensen CR, Liu F (2009). Water relations and abscisic acid in pot-grown strawberry plants under limited irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134(5):574-580. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.5.574>
- Jindo K, Olivares FL, Malcher DJ, Sánchez MA, Kempenaar C, Canellas LP (2020). From lab to field: role of humic substances under open-field and

- greenhouse conditions as biostimulant and biocontrol agent. *Frontiers Plant Science* 11:426. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00426>
- Kays SJ, Paull RE (2004). *Postharvest biology*. Exon Press, Athens, GA, USA, pp 568
- Klamkowski K, Trede W (2006). Morphological and physiological responses of strawberry plants to water stress. *Agriculturae Conspectus Scientific* 71(4):159-165.
- Kirschbaum DS, Heredia AM, Funes CF, Quiroga RJ (2019). Effects of biostimulant applications on strawberry crop yield and quality. *Horticultura Argentina* 38(95):25-40.
- Kumar R, Goyal V, Kuhad MS (2005). Influence of fertility–salinity interactions on growth, water status and yield of Indian mustard (*Brassica juncea*). *Indian Journal of Plant Physiology* 10:139-144. <https://doi.org/10.3390/molecules24081535>
- López R, González G, Vázquez RE, Olivares E, Vidales JA, Carranza R, Ortega M (2014). Metodología para obtener ácidos húmicos y fúlvicos y su caracterización mediante espectrofotometría infrarroja. [Humic and fulvic acid extraction method and characterization by infrared spectrophotometry]. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:1397-1407.
- Lovaisa NC, Guerrero MF, Delaporte PGA, Salazar SM (2015). Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. *Rev Agron Noroeste Argent* 35(1):33-36.
- McFarland J (1907) Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 14:1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001>
- Marcondes F, de Assis T, Pereira T, Sales PH, Martinsc AD, Freitas R, Moacir Pasqualc M, Dóriac J (2019). Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. *Microbiological Research* 223(225):120-

128. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>

- Medina JM, Pinzón EH, Cely GE (2016). Efecto de sustratos orgánicos en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) cv 'Albion' bajo condiciones de campo. [Organic substrates effect in strawberry cv 'Albion' (*Fragaria* sp.) plants, under field conditions]. *Revista Ciencia y Agricultura* 13(2):19-28.
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. [Efficiency in the use of water by plants]. *Investigaciones Geográficas* 43:63-84.
<https://doi.org/10.14198/INGEO2007.43.04>
- Naik K, Mishra S, Srichandan H, Kumar P, Kumar P (2019). Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21:12.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>
- Naiman DA, Latrónico A, García DSIE (2009) Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology* 45:44-51. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.11.001>
- Oleńska E, Małek W, Wójcik M (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment* 743:54. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>
- Olivares F, Galba J, Alessandra M, Da Silva L, Oliveira N, Pasqualoto L (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4(30):13. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>
- Ortiz JA, Delgadillo J, Rodríguez MN, Calderón G (2016). Inoculación bacteriana en el crecimiento y calidad del fruto de cinco variedades de fresa en suelos con pH contrastante. [Bacterial inoculation in the growth and quality of the fruit of five strawberry varieties in soils with contrasting pH]. *Terra Latinoamericana* 34(2):177-185.

- Padayatt SJ, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song J, Koh WS, Levine M (2001). Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. In: Handbook of antioxidants. CRC Press, pp 136-165.
- Palencia P, Martinez F, Burducea M, Oliveira JA, Giralde I (2016). Efectos del enriquecimiento con SeLENIO en SPAD, calidad de la fruta y parámetros de crecimiento de plantas de fresa en un sistema de cultivo sin suelo. [Effects of Selenio enrichment on SPAD, fruit quality and growth parameters of strawberry plants in soilless growing system]. Revista Brasileira de Fruticultura 3(1):202-212. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-294/14>
- Pedraza RO, Motok J, Salazar SM, Ragout AL, Mentel MI, Tortora ML, ... Díaz-Ricci JC (2010). Growth promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:265-272. <https://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0169-1>
- Pii Y, Graf H, Valentinuzzi F, Cesco S, Mimmo T (2018). The effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth and quality of strawberries. Acta Horticulturae 1217:231-238 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1217.29>
- Pilanal N, Kaplan M (2003). Investigation of effects on nutrient uptake of humic acid applications of different forms to strawberry plant. Journal of Plant Nutrition 26(4):835-843 <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-120018568>
- Piña J, García V, Herrera H, Flores JA (2016). Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. como promotoras de crecimiento vegetal. [Rating wild strains of *Azospirillum* sp. and *Gluconacetobacter* sp. as promoters of plant growth]. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(7):1613- 1623. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i7.154>
- Pırlak L, Köse M (2009). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on yield and some fruit properties of strawberry. Journal of Plant Nutrition 32(7):1173-1184. <https://doi.org/10.1080/01904160902943197>
- Rätsep R, Karp K, Vool E (2015). Effect of post-harvest mowing on strawberry

- 'darselect' growth and yield grown on plastic mulch. *Research for Rural Development* 1:51-57.
- Reina E, Peluzio JM (2017). Water use efficiency in soybean crop after inoculation with *Azospirillum brasiliense* in the Cerrado of Tocantins State, Brazil. *African Journal of Biotechnology* 16(39):1922-1928. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16152>
- Ribaudo MC, Krumpholz ME, Cassa DF, Bottini R, Cantore LM, Cura A (2006). *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:175-185. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0128-5>
- Rincón A, Martínez E (2015). Funciones del calcio en la calidad poscosecha de frutas y hortalizas: una revisión. [Functions of calcium in the postharvest quality of fruits and vegetables: a review]. *Revista Alimentos* 24(34):23-25.
- Rodríguez DA, Patiño MP, Miranda D, Fischer G, Galvis JA (2005). Efecto de dos índices de madurez y dos temperaturas de almacenamiento sobre el comportamiento en almacenamiento sobre el comportamiento en poscosecha poscosecha poscosecha de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.). [Effect of two maturity indices and two storage temperatures on postharvest behavior of yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.)]. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 58(2):2837-285.
- Saeed M, Ilyas N, Mazhar R, Bibi F, Batool N (2016). Drought mitigation potential of *Azospirillum* inoculation in canola (*Brassica napus*). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 278:270-278. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2016.089.035>
- Samra NR, EL-Kady MI, Hikal AR, Ghanem MSH (2017). Effect of organic fertilization on fruit Set, dropping, yield and fruit quality of Washington Navel Orange. *Journal of Plant Production* 8(8):853-858.
- Saidimoradi D, Ghaderia N, Javadia T (2019). Salinity stress mitigation by humic acid application in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia*

- Horticulturae 256:15 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108594>
- Shehata SA, Gharib AA, Mohamed M, Abdel Gawad KF, Emad A (2011). Influence of compost, amino and humic acids on the growth, yield and chemical parameters of strawberries. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11):2304- 2308.
- Soppelsa S, Kelderer M, Casera C, Bassi M, Robatscher R, Matteazzi A, Andreotti C (2019). Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. *Agronomy* 9(9):483. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090483>
- Steiner AA (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil* 15:134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Suh HY, Yoo KS, Suh SG (2014). Effect of foliar application of fulvic acid on plant growth and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 55:455-461 <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0004-y>
- Todeschini V, Ait Lahmidi N, Mazzucco E, Marsano F, Gosetti F, Robotti E, ... Lingua G (2018). Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatilome. *Frontiers in Plant Science* 9:1611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01611>
- Torres R, Montes EJ, Pérez OA, Andrade RD (2013). Relación del color y del estado de madurez con las propiedades fisicoquímicas de frutas tropicales. [Relationship of color and maturity stage with the physicochemical properties of tropical fruits]. *Información Tecnológica* 24(3):51-56. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000300007>
- Turan M, Yıldırım E, Ekinçi M, Argin S (2021). Effect of biostimulants on yield and quality of cherry tomatoes grown in fertile and stressed soils. *Hortscience* 56(4):414-423 <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15568-20>.
- Tripathi VK, Kumar N, Shukla HS, Mishra AN (2016). Influence of *Azotobacter*, *Azospirillum* and PSB on growth, yield and quality of strawberry cv.

Chandler. Progressive Horticulture 48(1):49-53.

<http://dx.doi.org/10.5958/2249-5258.2016.00009.9>

Ullah I, Sajid M, Shah ST, Khan S, Iqbal Z, Wahid F, Hassan E, Ahmad SH, Khan R (2017). Influence of humic acid on growth and yield of strawberry cv. Chandler. Pure Applied Biology 6(4):1171-1176.

<http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2017.600125>

Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 4(5):12.

<http://dx.doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>

Veobides H, Guridi F, Vázquez V (2018). Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. [Humic substances as plants biostimulants under environmental stress conditions]. Cultivos Tropicales 39(4):102-109.

Wills R, McGlasson B, Graham D, Joyce D (1998). Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. CAB International, New York, pp 262.

Xudan X (1986). The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and yield in wheat. Australian Journal of Agricultural Research 37(4):343. <https://doi.org/10.1071/ar9860343>

Yin CY, Berninger F, Li CY (2006). Photosynthetic responses of *Populus przewalski* subjected to drought stress.

Photosynthetica 44:62-68. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0159-y>

Yu Z, Dahlgren RA (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. Chemical Ecology 26:2119-2140.

<https://doi.org/10.1023/A:1005568416040>

Zhang P, Zhang H, Wu G, Chen X, Gruda N, Li X, Dong J, Duan Z (2021). Dose-dependent application of straw-derived fulvic acid on yield and quality of tomato plants grown in a greenhouse. Frontiers in Plant Science 12:736613. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.736613>



The journal offers free, immediate, and unrestricted access to peer-reviewed research and scholarly work. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the author.

License - Articles published in *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* are Open-Access, distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) License.

© Articles by the authors; UASVM, Cluj-Napoca, Romania. The journal allows the author(s) to hold the copyright/to retain publishing rights without restriction.

SEGUNDO ARTÍCULO

DETERMINACIÓN DE MINERALES EN CULTIVO DE FRESA CON
APLICACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y RIZOBACTERIAS

**DETERMINACIÓN DE MINERALES EN CULTIVO DE FRESA CON
APLICACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y RIZOBACTERIAS**

DETERMINATION OF MINERALS IN STRAWBERRY CULTIVATION WITH
APPLICATION OF HUMIC SUBSTANCES AND RHIZOBACTERIA

Simeón Martínez de la Cruz¹, José Antonio González Fuentes^{1*}, Armando
Robledo Olivo², Rosalinda Mendoza Villarreal¹, Armando Hernández Pérez¹,
Miriam Desireé Dávila Medina ⁴ José Alfredo Hernández Maruri³

¹ Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila.

² Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma
Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo,
Coahuila.

³ Departamento de Ciencias del Suelo, Universidad Autónoma Agraria Antonio
Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila.

⁴ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Ing. J.
Cárdenas Valdez S/N, República, 25280 Saltillo, Coahuila.

(*Autor de correspondencia: jagf252001@gmail.com)

RESUMEN

México se convirtió en uno de los principales productores de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), esta actividad agrícola genera empleo y deja ingresos considerables a los productores, el cultivo además de enfrentar una problemática en lo que respecta a la nutrición de las plantas, el mercado actual exige frutos ricos en minerales que es un factor importante para obtener fresa de calidad. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto bioestimulante de sustancias húmicas y rizobacterias, en la concentración y contenido mineral en cultivo de

fresa cultivar San Andreas. Los tratamientos aplicados fueron los Ácidos Fúlvicos y Mezcla de Microorganismos, Ácidos Húmicos y *Pseudomonas fluorescens*; Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum brasilense*, Ácidos Fúlvicos y *Pseudomonas fluorescens* y la Mezcla AH y AF + *Azospirillum brasilense*, con dos tipos de dosis (d1 y d2), en total fueron 10 tratamientos más el control. Los AFyAzoz d1 incrementaron el N foliar (41.3 %), la MHyF+Azoz d1 el N en fruto (35.2 %), el P hoja y fruto incrementó con AFyPF d1 (14.6 %) y (11.3 %), el K en hoja aumentó con MHyF+Azoz d1 (38.9 %), Ca en hoja se favoreció con AFyMM d1 (39.1 %), Ca en fruto con AHyPF d2 (60.3 %), Mg en hoja incrementó con AFyAzoz d1 (83.3 %), el Mg en raíz con AFyPF d2 (75.0 %), Fe en fruto incrementó con AHyPF d2 (33.6 %). Los bioestimulantes con rizobacterias y sustancias húmicas son una alternativa ecológica para mejorar el contenido mineral en el cultivo de fresa.

Palabras clave: *Fragaria x ananassa* Duch, minerales, sustancias húmicas, rizobacterias.

ABSTRACT

Mexico became one of the main producers of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.), this agricultural activity generates employment and leaves considerable income to the producers, the crop in addition to facing a problem regarding the nutrition of the plants, The current market demands fruits rich in minerals, which is an important factor to obtain quality strawberries. The objective of this research was to evaluate the biostimulant effect of humic substances and rhizobacteria, in the concentration and mineral content in strawberry cultivation, cultivar San Andreas. The treatments applied were Fulvic Acids and Mixture of

Microorganisms, Humic Acids and *Pseudomonas fluorescens*; Fulvic Acids and *Azospirillum brasilense*, Fulvic Acids and *Pseudomonas fluorescens* and the Mixture AH and AF + *Azospirillum brasilense*, with two types of doses (d1 and d2), in total there were 10 treatments plus the control. The AFyAzoz d1 increased the foliar N (41.3 %), the MHyF+Azoz d1 the N in fruit (35.2 %), the P leaf and fruit increased with AFyPF d1 (14.6 %) and (11.3 %), the K in leaf increased with MHyF+Azoz d1 (38.9%), Ca in leaf was favored with AFyMM d1 (39.1%), Ca in fruit with AHyPF d2 (60.3%), Mg in leaf increased with AFyAzoz d1 (83.3%), Mg in root with AFyPF d2 (75.0 %), Fe in fruit increased with AHyPF d2 (33.6 %). Biostimulants with rhizobacteria and humic substances are an ecological alternative to improve the mineral content in strawberry crops.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch, minerals, humic substances, rhizobacteria.

INTRODUCCIÓN

México se convirtió en el mayor exportador de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en el 2020, desplazando a España, quien ocupó esa posición en las últimas décadas, los principales productores de fresa en México son el estado de Michoacán con una producción 329,183.5 toneladas y Baja California con 105,403.4 toneladas con una participación en la producción nacional de 71 y 23 % respectivamente (SIAP 2020). La producción de fresa es de gran importancia en la creación de empleo y genera ingresos a los productores por ventas en el mercado nacional y por exportaciones frutícolas principalmente al mercado de EE. UU. (Ávila y González 2012). Sin embargo, la producción enfrenta una

problemática en lo que respecta a la nutrición del cultivo, que es un factor determinante para el desarrollo de la planta que le permite obtener un producto de calidad, es necesario que el cultivo disponga de todos los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Avitia *et al.* 2014). Se tienen alternativas ecológicas como los bioestimulantes que de acuerdo a Du Jardin (2015), son sustancias o microorganismos que al suministrarse a las plantas ayudan en la absorción y asimilación de nutrientes.

Los bioestimulantes como las sustancias húmicas (SH), mejoran las características físicas, químicas y biológicas del suelo, a través de la retención de agua y nutrientes, incrementan la biodiversidad de microorganismos benéficos y la formación de minerales por el aumento de la capacidad de intercambio catiónico (Veobides *et al.* 2018). Las SH se obtienen principalmente a través de la extracción de depósitos naturales ricos en carbono, como leonardita, turba y composta (Yang *et al.* 2020). Se han clasificado en ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas en función de su diferente solubilidad a pH ácido y alcalino (Trevisan *et al.* 2010).

La presencia de sustancias húmicas en el suelo estimula el crecimiento de raíces y brotes al mejorar la nutrición mineral de la planta, mediante el refuerzo en la absorción de macronutrientes y micronutrientes (Ekin 2019, Jindo *et al.* 2020). Favorecen la biodisponibilidad de los nutrientes por su capacidad para formar complejos con iones metálicos, mejoran la absorción de micronutrientes como zinc, cobre y hierro y macronutrientes como fósforo especialmente cuando estos nutrientes son escasos en el suelo (García *et al.* 2016). En una investigación por

Aghaeifard *et al.* (2015), al aplicar ácidos húmicos, en cultivo de fresa reportaron el aumento de minerales como potasio (K), fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg). Karakas y Dikilitas (2021) con la utilización de ácidos húmicos en suelo salino en plantas de fresa, incrementaron en promedio minerales como N, P, Ca y Mg. En un estudio por Zhang *et al.* (2021), al aplicar ácidos fúlvicos aumentaron la concentración de mineral de Ca, Fe y Zn en tomate.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal habitan en el suelo, tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular, están directa o indirectamente involucradas en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas (Ahemad y Kibret 2013). Las rizobacterias como bioestimulantes incrementan los efectos benéficos en los cultivos, a través de mecanismos que sintetizan metabolitos que facilitan a las plantas la disponibilidad de nutrientes, ayudan a la fijación de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas, vitaminas, la solubilización de fósforo y el incremento en la permeabilidad de la raíz (Moreno *et al.* 2018).

Las rizobacterias simbióticas como *Rhizobium*, de vida libre como *Azotobacter* y *Azospirillum* han sido utilizadas ampliamente como bioestimulantes para aumentar la disponibilidad de nitrógeno en cultivos agrícolas (Luna *et al.* 2013). Los géneros bacterianos con capacidad de producir ácidos orgánicos que solubilizan fosfato se tienen a *Pseudomonas*, *Rhizobium*, y *Agrobacterium* (Paredes y Espinosa 2010). En un estudio por Guerrero *et al.* (2014) al realizar inoculaciones de *Azospirillum brasilense* en plantas de fresa incremento el fósforo en hoja y raíz. Con aplicaciones de la rizobacteria *Azospirillum brasilense*

por Boleta *et al.* (2020) incremento micronutrientes como B, Fe y Mn en el cultivo de trigo. En un experimento por Besen *et al.* (2020) incrementaron el Ca y Mg en plantas de trigo con inoculaciones es de *Azospirillum brasilense*. Martinez *et al.*, (2019) sugieren que la rizobacteria *Pseudomona fluorescens* promueve la absorción de Mn, N, Zn y P en el cultivo de melon. En un estudio por Gupta *et al.* (2018) con la aplicación de una cepa del genero *Pseudomonas*, en el cultivo de tomate incremento la absorción de N, P y acumulación de Fe.

Las rizobacterias y las sustancias húmicas son una excelente alternativa para reducir la fertilización química y el uso de pesticidas para no dañar el medio ambiente sin afectar los rendimientos de los cultivos (Da Silva *et al.* 2021). Las sustancias húmicas incrementan la exudación de ácidos orgánicos en la raíz, favoreciendo la interacción de la planta con microorganismos benéficos permitiendo incrementar la absorción y transporte de nutrientes minerales (Olivares *et al.* 2017, Nardi *et al.* 2021). De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de un bioestimulante a base de sustancias húmicas y rizobacterias, en la concentración y contenido mineral en el cultivo de fresa cultivar San Andreas.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio. La investigación se realizó en un invernadero tipo túnel del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicado en Saltillo, Coahuila, México, que se localiza entre las coordenadas geográficas 25° 22' de latitud norte y 101° 02' longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm. El experimento se llevó a cabo de los meses de julio

de 2020 a marzo de 2021, se utilizaron plantas de fresa Cultivar San Andreas, fueron plantadas a una edad de 2 meses. Las características físico-químicas del suelo utilizado fueron: Ph 7.01, Conductividad eléctrica 2.84 (ds/m), Materia orgánica 4.4 %, Capacidad de intercambio catiónico 20.4 (Meq/100g), Textura: Franco, los elementos minerales disponibles en el suelo expresados en ppm son K 909, Ca 2968, NO₃ 95.8, Na 143, Mg 320, Fe 41.1, Zn 15.5, Mn 5.88, B 3.2.

Extracción y separación de ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF). Las sustancias húmicas y fúlvicas se extrajeron de Leonardita que es un compuesto orgánico mineral, se recolectó en la empresa minera DHD de México ubicada en Sabinas, Coahuila. La extracción se realizó con la metodología de López *et al.* (2014), donde se utilizó hidróxido de potasio (KOH) 1 N, y para la separación se utilizó ácido acético con la finalidad de bajar el pH a 4, se obtuvieron los ácidos fúlvicos con una coloración amarilla dorada, los ácidos húmicos con apariencia de suelo y color café oscuro.

Determinación de ácidos húmicos y fúlvicos. Para esta medición se utilizó la metodología de retroceso con permanganato de potasio descrita por López *et al.* (2014). Para la medición de fúlvicos (Tabla 1), se tomaron dos muestras de 25 ml de ácidos fúlvicos, se pesó y se aplicaron 5 gotas de rojo de metilo, se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) hasta obtener la coloración amarillo dorada inicial de la muestra.

A la segunda muestra se agregaron 25 ml de agua bidestilada y 25 ml de permanganato de potasio 1 Normal (N). La muestra hirvió durante 10-15 minutos hasta que se perdió el color rojizo del permanganato y se tornó color café, esto

debido a que el permanganato oxida la materia orgánica contenida en la muestra. Una vez que la temperatura descendió hasta temperatura ambiente se tituló a retroceso con permanganato potásico 1 N, hasta que la muestra conserve el color rojizo al menos durante 1 minuto.

En la medición de húmicos (Tabla 1), se tomaron 25 ml de ácidos húmicos, se pesaron y se agregaron entre 3 y 5 ml de hidróxido de potasio 1 N para disolver, se agregó 25 ml de agua bidestilada, 25 ml de permanganato potásico 1 N y se puso a hervir durante 10-15 minutos o hasta que pierda el color rojizo oxidando la materia orgánica, se dejó enfriar y se agregó 25 ml de ácido sulfúrico 7 N y 25 ml de oxalato de amonio, esto eliminó el color café de la muestra dejándola totalmente transparente. Se tituló a retroceso con permanganato potásico 1 N hasta que la muestra conserve el color rojizo al menos durante 1 minuto, esto nos dará como dato los carbonos oxidados. La medición de húmicos y fúlvicos se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\begin{aligned} \% \text{ Acido humico o fulvico} &= \frac{1.02 (25 f1 - 25f2 + Vf1) * 100}{1000 * p} \\ &= (Vf1 + 25 (f1 - f2)) \frac{0.102}{P} \end{aligned}$$

Dónde: Cada ml de Permanganato de potasio (MnO_4K) 0.1N gastado en la valoración corresponde a 1.02 mg de ácido húmico o fúlvico, por lo tanto: V= volumen de solución de MnO_4K 0.1N con factor f1 empleado en la valoración final de los ácidos húmicos o fúlvicos, f2= factor de la solución de oxalato amónico. P= peso de la muestra correspondiente a la alícuota valorada.

Tabla 1. Porcentaje de ácidos húmicos y fúlvicos obtenidos de leonardita

% Ácidos húmicos	% Ácidos fúlvicos
18.5	38.5

Material microbiológico. Los microorganismos utilizados fueron rizobacterias como *Azospirillum brasilense*, que se caracteriza por presentar forma de varilla o bacilar, clasificada como Gram negativa (Bashan y Holguin 1997) con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Tarrand *et al.* 1978, Fukami *et al.* 2018). Se utilizó también *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales tienen forma de bacilos rectos o ligeramente curvados y son Gram negativos movilizan fosforo del suelo a través de la solubilización (Alori *et al.* 2017). Estas rizobacterias fueron proporcionadas por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. La rizobacteria *Azospirillum brasilense* se reactivó en medio de cultivo NRCB, las *Pseudomonas* se sembraron en medio King B. El procedimiento en la preparación de las bacterias fue cultivando en caldo nutritivo y colocando en agitación constante a 150 rpm durante 48 horas a $25^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$, y se observó el crecimiento bacteriano evidenciado por la turbidez en el medio. La concentración celular bacteriana fue de 10^9 cel/ml de la escala de turbidez de McFarland (McFarland 1907).

Diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos más el Control, con 7 repeticiones por tratamiento, con 2 dosis de aplicación. La dosis 1 (d1): 3 ml de sustancias húmicas (Ácidos húmicos y/o

fúlvicos) mas 5 ml de mezcla de microorganismos (Rizobacterias *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona putida* y *Azospirillum brasilense*) y/o microorganismos solos. La dosis 2 (d2): 3.5 ml de ácidos húmicos y/o fúlvicos y 4 ml de mezcla de microorganismos y/o microorganismos solos. Los tratamientos fueron: T1. Ácidos Fúlvicos + Mezcla de microorganismos (AFyMM d1), T2. Ácidos Fúlvicos + Mezcla de microorganismos (AFyMM d2), T3. Ácidos Húmicos + *Pseudomona fluorescens* (AHyPF d1), T4. Ácidos Húmicos + *Pseudomona fluorescens* (AHyPF d2), T5. Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasilense* (AFyAzoz d1), T6. Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasilense* (AFyAzoz d2), T7. Ácidos Fúlvicos + *Pseudomona fluorescens* (AFyPF d1), T8. Ácidos Fúlvicos + *Pseudomona fluorescens* (AFyPF d1), T9. Mezcla AH y AF + *Azospirillum brasilense* (MHyF+Azoz d1), T10. Mezcla AH y AF + *Azospirillum brasilense* (MHyF+Azoz d2), T11. Control (Solución Steiner). Las sustancias húmicas fueron aplicadas cada 15 días y las rizobacterias cada 30 días, los tratamientos fueron puestos directamente en el suelo en la base de las raíces de la planta. Se utilizaron 7 plantas de fresa para cada tratamiento incluido el testigo.

Variables evaluadas.

El Nitrógeno se cuantificó por el método micro Kjeldahl (A.O.A.C. 1980) se pesó una muestra de 0.05 g de material vegetal seco molido (Hoja, raíz y fruto de fresa), se colocaron en un matraz de digestión, donde se agregaron 5 ml de mezcla digestora y después se colocó en el digestor a una temperatura de 350 °C dentro de una campana extractora hasta que la muestra alcanzo un color verde limón, para después dejarse enfriar y llevarla al destilador micro Kjeldahl.

Una vez que se obtuvo el destilado se titula con H₂SO₄ a 0.025 N hasta viraje de verde a rosa, para la obtención del % de Nitrógeno en el tejido vegetal se realiza el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{(mL \text{ gastados de } H_2SO_4 - mL \text{ gastado del blanco})(100)(0.014)(N)}{\text{Peso de la muestra}}$$

Donde *N*= Normalidad del ácido sulfúrico

Para la determinación de Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Potasio (K) y Hierro (Fe), se utilizó el método de digestión por vía seca, se deshidrató el material vegetal (hoja, raíz y fruto de fresa) en una estufa de secado (marca Mapsa modelo HDP 334), se molió y se tomó una muestra de 0.5 g, dicha muestra se sometió a calcinación a una temperatura de 650 °C durante tres horas en una mufla hasta obtener ceniza blanca, después a la muestra calcinada se le agregaron 5 ml de HCl al 20%, se filtró y aforó con agua desionizada a 50 ml. Se leyó la muestra en un espectrofotómetro de absorción atómica (marca PERKIN ELMER modelo 2380 (Shirin *et al.* 2008). En los cálculos se utiliza la siguiente fórmula: Donde: C= concentración del elemento dada por el equipo, V= Volumen de la digestión en mL, W= Peso de la muestra en gramos.md. f.= Factor de dilución

$$\text{Elemento} \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \frac{(C)(V)(d.f.)}{(W)}$$

Para la determinación de Fósforo se empleó el método colorimétrico (Bray Y Kurtz 1945), se deshidrató el material vegetal (hoja, raíz y fruto de fresa), se ocuparon con 0.5 g de muestra y se sometió a calcinación a una temperatura de

650°C durante tres horas en una mufla. después a la muestra calcinada se le agregaron 5 mL de HCl al 20%, se filtró y aforó con agua desionizada a 50 ml. Posteriormente se tomó una alícuota de 1ml en un tubo de ensayo se le agrego 5ml de molibdato de amonio y 2ml de reactivo Aminonatosulfonico (ANSA) se agito el tubo y se dejó reposar durante 20 minutos. Se leyó la muestra en un espectrofotómetro UV.VIS a una longitud de onda de 640nm. La absorbancia obtenida se utiliza para realizar el cálculo de acuerdo a la siguiente fórmula: Donde: Dilución = Peso de muestra / Volumen de aforación.

$$\frac{mg}{g} = \frac{(Lectura\ de\ espectrofotómetro) (10^{-3})}{(g)(dilución)}$$

Análisis estadístico. Las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron con un análisis de varianza (ANOVA) y la separación de medias se realizó con la prueba de LSD de Fisher ($P \leq 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Infostat versión (2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Minerales en hoja y raíz de fresa. Se evaluó la concentración de Nitrógeno (N) en hoja y raíz en el cultivo de fresa (Figura 1), de los elementos nutricionales el Nitrógeno es requerido en mayores cantidades, su disponibilidad y concentración interna afectan su acumulación en la biomasa de raíces y brotes (Bown *et al.* 2010). La concentración de N en la hoja presentó diferencias significativas entre los tratamientos, donde la aplicación de AFyAzoz d1 y la MHyF+Azoz d1, incrementaron el Nitrógeno en 41.3 y 38.1 % con respecto al Control, el resto de los tratamientos estudiados se comportaron estadísticamente iguales al testigo,

estos resultados son parecidos con lo realizado por Kumar *et al.* (2019), al utilizar ácidos fúlvicos que fueron aplicadas al cultivo de maíz incrementaron el Nitrógeno en 36.0 % con respecto al control.

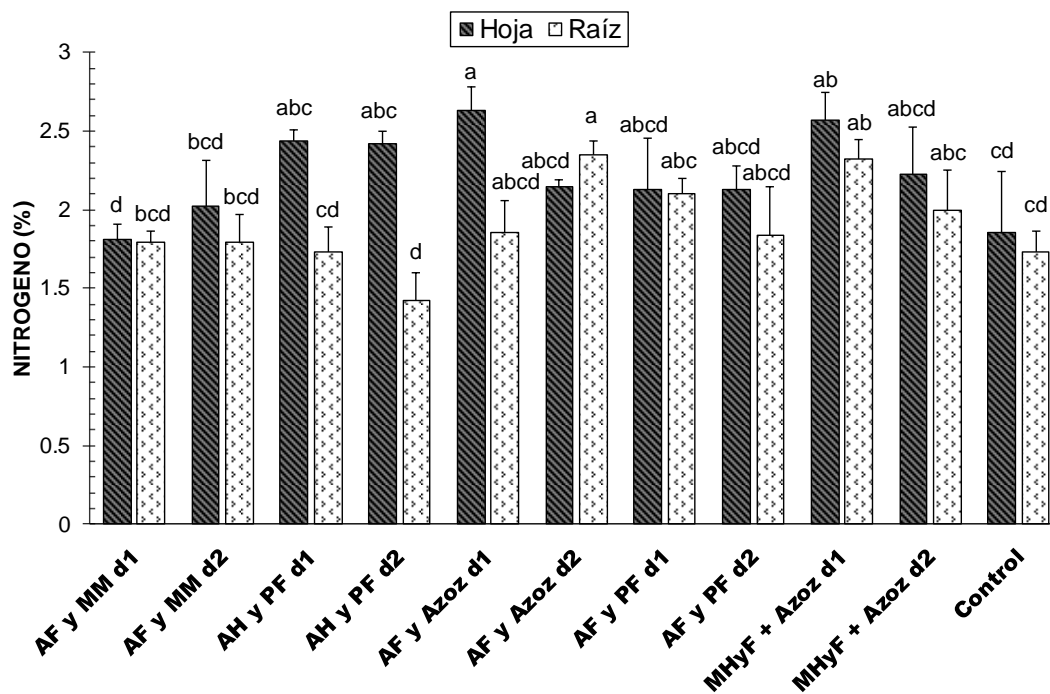


Figura 1. Concentración de Nitrógeno en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

En un estudio por Filho *et al.* (2018) al aplicar fuentes de Nitrógeno con la inoculación de *Azospirillum brasilense* incrementaron el nitrógeno en el cultivo de trigo, las cepas de *Azospirillum* son capaces de fijar nitrógeno atmosférico eficientemente y se observa en un incremento en el contenido total de nitrógeno en hojas y granos de plantas inoculadas (Bashan *et al.* 1990).

En un experimento realizado por Leite *et al.* (2020), con adición de ácidos húmicos más urea incrementaron el nitrógeno foliar en caña de azúcar en 6 %.

El incremento de N en hojas observado en nuestro estudio se debe posiblemente a la combinación sustancias húmicas con cepas de rizobacterias eficientes en la absorción de nitrógeno.

La concentración de Nitrógeno en la raíz (Figura 1) se incrementó con la aplicación de AFyAzoz d2 en 35.8 % y con la MHyF+Azoz d1 en 34.1 %, el resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales al control. En un estudio por Guerrero *et al.* (2014) al usar una cepa de *Azospirillum brasilense* y aplicada a plantas de fresa, al evaluar el nitrógeno en raíz encontraron diferencias estadísticas entre las aplicaciones de la rizobacteria en comparación con testigo sin inocular. Las cepas de *Azospirillum* colonizan principalmente los tejidos de la raíz producen un efecto importante al aumentar el área de la raíz y mejoran la nutrición de las plantas (Bashan y de Bashan 2010). La concentración de Fosforo (P) en hoja y raíz de plantas de fresa se observan en la Figura 2, el fósforo es un macronutriente esencial que influye en el desarrollo de las raíces, el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos (Shen *et al.* 2011).

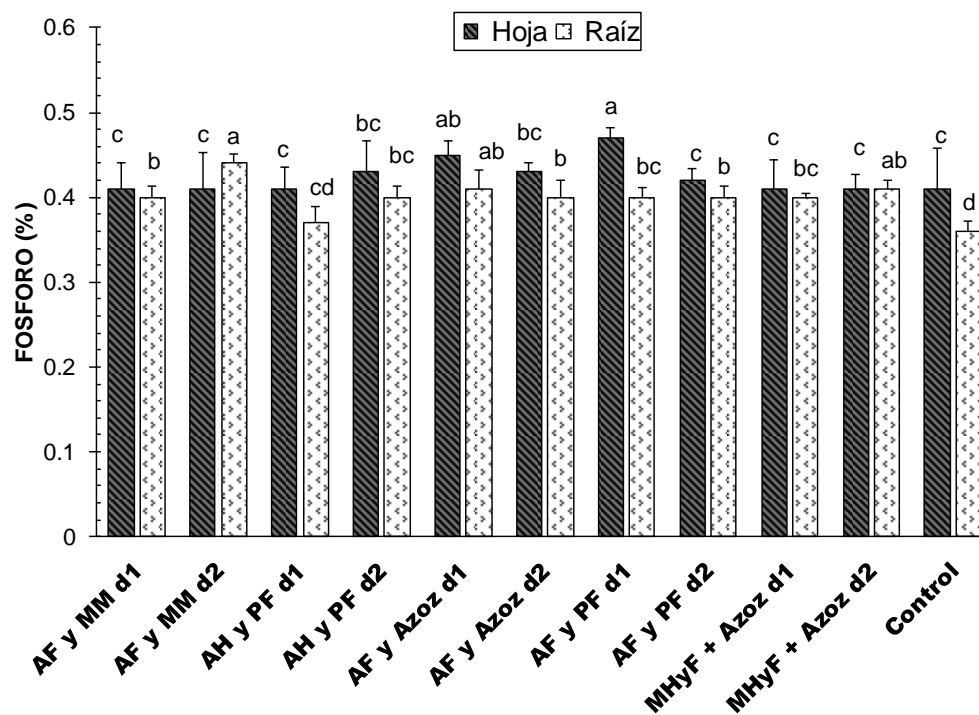


Figura 2. Concentración de Fosforo en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

El P es un componente crucial de las biomoléculas, incluida la adenosin trifosfato (ATP), ácidos nucleicos y fosfolípidos (Mogollón *et al.* 2008). La concentración de fosforo en hoja se favoreció con la aplicación de AFyPF d1 y los AFyAzoz d1 con un incremento de 14.6 y 9.7 % respectivamente en comparación con el testigo, estos resultados coinciden con lo reportado por Galindo *et al.* (2016) al realizar inoculaciones de *Azospirillum brasilense* en cultivo de maíz incremento el fosforo foliar en 8.7 % en comparación con el testigo sin inoculación. Sin embargo, Arıkan *et al.* (2020) al aplicar rizobacterias del genero *Pseudomonas* en plantas de fresa incrementaron el fosforo en 30.6 % comparado con el control. Ortiz *et al.* (2016)

al utilizar cuatro cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal se utilizaron por su capacidad de solubilización de fosfatos (*Pseudomonas tolaasi* A46 y P61, *Paenibacillus polymyxa* BPS1.1 y *Bacillus pumilus* R-44) al aplicarlas en plantas de fresa variedad CP-LE-7, incrementaron el fósforo en parte aérea de la planta en 26.9 % en comparación con el testigo sin inoculación.

La concentración de Fósforo en raíz (Figura 2) se benefició con la mayoría de los tratamientos, el incremento respecto al control fue de AFyMM d2 en (22.0 %), los AFyAzoz d1 y los MHyF+Azoz d2 en (13.8 %), con los AFyMM d1, AHyPF d2, AFyAzoz d2, AFyPF d1, d2 y la MHyF+Azoz d1 el incremento fue del (11.1 %), el tratamiento AHyPF d1 estadísticamente fue igual al control. En un experimento realizado por Turan *et al.* (2021) al utilizar ácidos fúlvicos en combinación con rizobacterias al ser aplicados en el cultivo de tomate cherry incremento en 90 % la concentración de fósforo en raíz, este incremento elevado podría deberse a que el consorcio de microorganismos aplicados en su estudio fue mayor en número de cepas bacterianas a las que se utilizaron en nuestro estudio, las rizobacterias utilizadas por estos autores posiblemente incrementó la absorción de fósforo en la raíz.

El potasio (K) en hoja de fresa se incrementó con la aplicación de MHyF+Azoz d1, AFyMM d2 y los AFyAzoz d2 en 38.9, 32.2, 29.8 % respectivamente en comparación al control, el resto de los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales al testigo (Figura 3). En un estudio por Hernández *et al.* (2019) evaluaron la efectividad de *Azospirillum* spp, sobre el contenido nutricional de moringa donde obtuvieron un incremento en potasio de 55.5 %

con respecto al tratamiento sin inoculación. Soppelsa *et al.* (2019) con aplicaciones de bioestimulantes como los ácidos húmicos incrementaron en 7.9 % la concentración de potasio en hoja, este incremento inferior podría deberse a que estos autores utilizaron los ácidos húmicos solos y no se potencializó la absorción de K con la ayuda de rizobacterias.

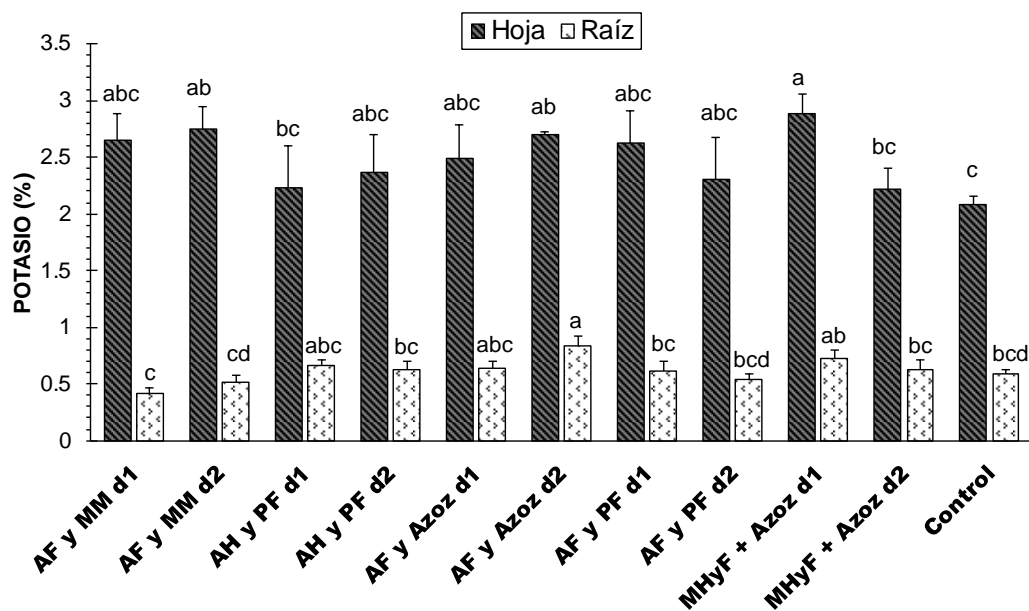


Figura 3. Concentración de Potasio en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

La concentración de potasio en raíz de fresa (Figura 3), se benefició con la aplicación de AFyAzoz d2 con un incremento de 40.6 % en comparación con el testigo, el tratamiento MHyF+Azoz d1 incremento el Potasio en 23.7 % sin embargo estadísticamente se comportó igual al testigo, así como el resto de los tratamientos, estos resultados son diferentes a lo encontrado por Guerrero *et al.*

(2014), al realizar el análisis de la composición mineral de la raíz de la fresa inoculada con *Azospirillum brasilense* y un control sin inoculación, al evaluar el potasio no observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

La evaluación de calcio (Ca) en hoja y raíz en fresa se observa en la Figura 4, el calcio es un nutriente vegetal esencial, como catión divalente (Ca^{2+}), es necesario para funciones estructurales en la pared celular de las membranas y como mensajero intracelular en el citosol (White y Broadley, 2003). La concentración de Ca en hoja se favoreció con los tratamientos AFyMM d2 y los AFyMM d1 mostrando un incremento de 39.1 y 27.0 % respectivamente en comparación con el control, los demás tratamientos aplicados se comportaron iguales al testigo, estos resultados son parecidos a lo reportado por Husein y Hassan (2016) al aplicar ácidos fúlvicos en el cultivo de tomate incrementaron el calcio en 40 %. Sin embargo, Suh *et al.* (2014) al evaluar los ácidos fúlvicos aplicados en forma foliar al cultivo de tomate incremento en 9% la concentración de calcio en hojas, el incremento observado en nuestro experimento podría deberse a que se utilizaron diferentes dosis de ácidos fúlvicos y otra vía de aplicación.

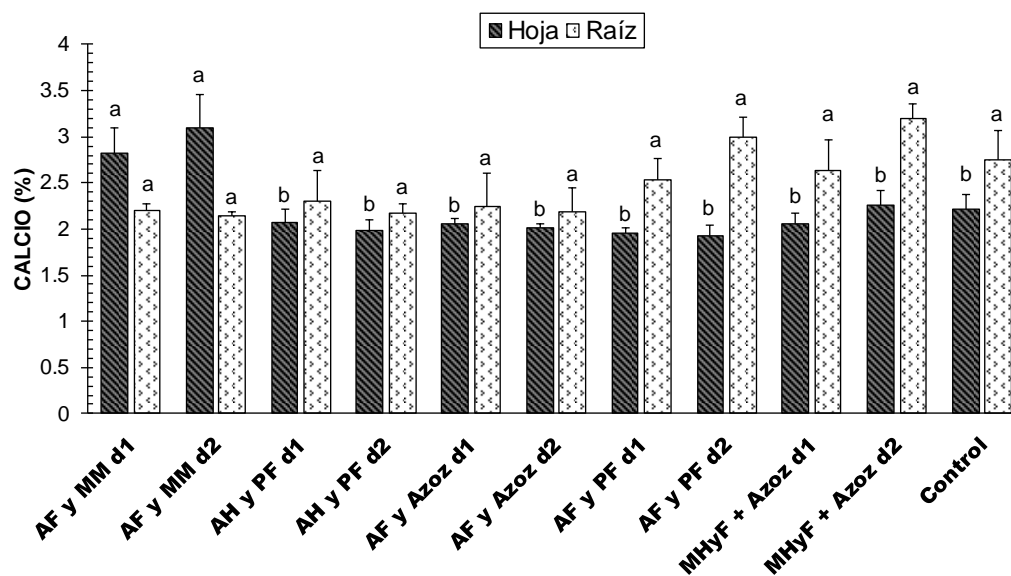


Figura 4. Concentración de Calcio en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

Las plantas que crecen con Ca adecuado en sus hábitats naturales tienen concentraciones de Ca en los brotes entre 0.1 y 5% (Hirschi, 2004). Esta concentración de Ca pudo observarse en el experimento al realizar en el análisis mineral. El calcio en raíz de plantas de fresa no demostró diferencias significativas entre los tratamientos, esto coincide con Galindo *et al.* (2016), al realizar inoculaciones *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz al evaluar el calcio no encontraron diferencias entre los tratamientos en comparación con el tratamiento sin inocular, de igual manera Zhang *et al.* (2021), al aplicar ácidos fúlvicos en cultivo de tomate no observo diferencias entre tratamientos.

El Magnesio (Mg) fue evaluado en hoja y raíz en el cultivo de fresa (Figura 5), el Mg es un nutriente esencial para el desarrollo de las plantas, constituye el núcleo

de la molécula de clorofila, pigmento de las hojas que se necesita para realizar la fotosíntesis (Gerendás y Führs, 2013). El Mg en hoja se incrementó con la aplicación de AFyAzoz d1 en 83.3 % en comparación con el control, los AHyPF d2 incrementaron en 63.8% sin embargo estadísticamente fue igual al control como el resto de los tratamientos, los resultados fueron parecidos a Aghaeifard *et al.*, (2015), en una investigación donde estudiaron la influencia de diferentes niveles de ácidos húmicos en el cultivo de fresa incrementaron el Mg en hoja con 56%. Sin embargo, es diferente a lo reportado por Soppelsa *et al.* (2019), al aplicar ácidos húmicos como bioestimulante en cultivo de fresa incremento el Magnesio en hoja en 2.6% en comparación con el control. En una investigación por Zhang *et al.* (2021), al utilizar ácidos fúlvicos y aplicados a diferentes concentraciones en el cultivo de tomate al evaluar el Mg en hoja no encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos.

El magnesio en raíz de fresa se favoreció con la aplicación de AFyPF d2 y los AHyPF d2 con un incremento de 75.0 y 62.5 % respectivamente comparados con el control, los demás tratamientos se comportaron significativamente iguales al testigo. Estos resultados son parecidos Türkmen *et al.* (2004) con aplicaciones de ácidos húmicos influyeron significativamente en el contenido de Mg en raíces de plántulas de tomate en 56 % con respecto al control.

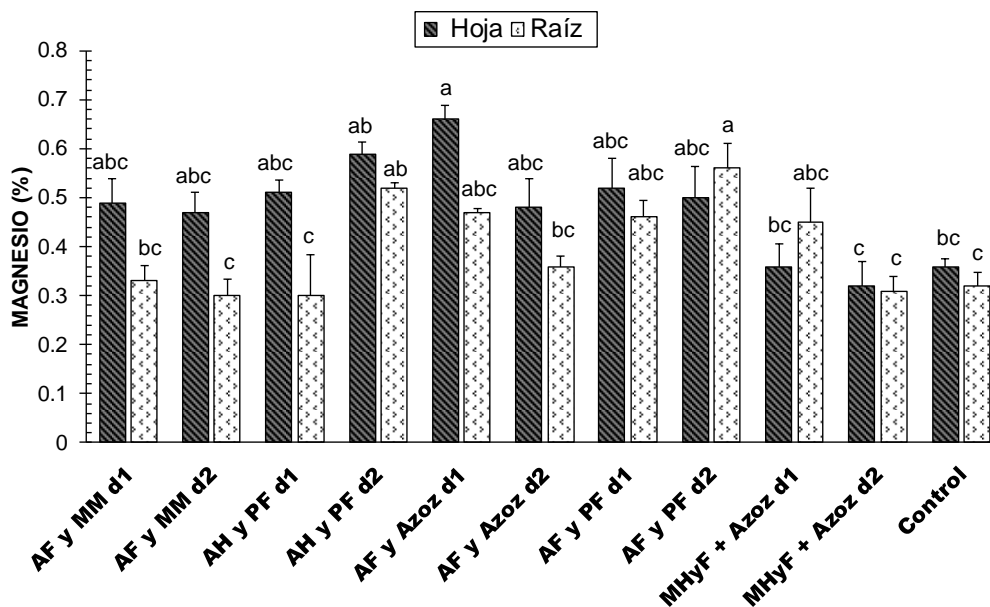


Figura 5. Concentración de Magnesio en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

El Hierro (Fe) en hoja y raíz en plantas de fresa se muestra en la Figura 6, en las plantas el Fe es necesario para la fotosíntesis y la síntesis de clorofila, el Fe es un componente central de las cadenas de electrones y un cofactor de muchas enzimas vitales (Kroh y Pilon 2020). El Fe en hoja se incrementó con la aplicación de AFyMM d2 y d1 con 105 y 70 % con respecto al control, el resto de los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales al testigo. El Fe en hoja se incrementó con la aplicación de ácidos fúlvicos y la mezcla de microorganismos de los cuales se encuentran las *Pseudomonas fluorescens* y *putida*, esto coincide con un estudio por Sah *et al.* (2017) al aplicar una rizobacteria del genero *pseudomonas* en el cultivo de maíz, incremento el Fe en hoja en 130 % en

comparación con el control sin inocular. La rizobacteria *Pseudomonas* produce sideróforos que solubilizan Fe en el suelo, actúan como quelatos y transportan Fe a raíces de las plantas que ayudan en su crecimiento (Sharma y Johri 2003). El Fe en raíz fue favorecido con la aplicación de AFyMM d1 y los AFyAzoz d1 con incremento de 29.7 y 28.5 % en comparación con el control, los demás tratamientos fueron iguales al testigo. En un estudio por Abros *et al.* (2015) al evaluar el aporte de hierro con ácidos húmicos en plantas de trigo, incrementaron el hierro en raíz en 68.3 % en comparación con el control. Sin embargo, fue diferente a lo reportado por Suh *et al.* (2014) al evaluar el hierro en hoja de tomate, aplicando los ácidos fúlvicos no encontraron diferencias entre tratamientos.

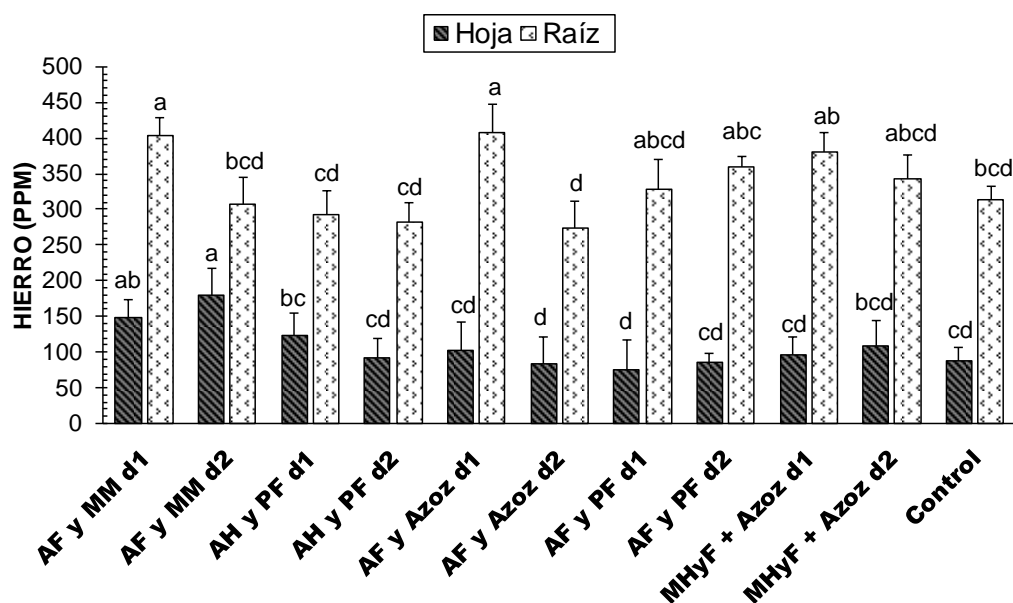


Figura 6. Concentración de Hierro en hoja y raíz de fresa variedad San Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. La barra en cada columna representa el error estándar y los valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

Minerales en fruto de fresa. El contenido mineral de fruto de fresa se observa en la Tabla 2, el Nitrógeno se favoreció con aplicaciones de MHyF+Azoz d1, d2, AHyPF d1, AFyAzoz d1 y con los AFyMM d1 el incremento fue de 35.2, 23.5, 23.5, 23.5 y 17.6 % respectivamente en comparación con el control, el resto de los tratamientos estadísticamente fueron iguales al control. Estos resultados son parecidos a lo reportado por Turan *et al.* (2021) con el uso de ácidos fúlvicos más rizobacterias del genero *Azotobacter*, *Azospirillum* y *bacillus* aplicados al cultivo de tomate incrementaron en 32 % el nitrógeno en fruto. También coincide con Türkmen *et al.* (2004), al determinar los efectos de ácidos húmicos en combinación con aplicaciones de nitrógeno sobre el contenido de nutrientes en lechuga, incrementaron la concentración de nitrógeno en 23% con respecto al control.

El fosforo se incrementó con los tratamientos AFyPF d1 y con los AHyPF d2 en 11.3 y 7.5 % comparado con el testigo, los demás tratamientos evaluados se comportaron estadísticamente iguales al testigo. Abdel *et al.* (2019), con aplicación de ácidos fúlvicos en el cultivo de haba incrementaron el contenido de fosforo en 50%. De igual manera Husein *et al.* (2015), al aplicar ácidos húmicos más fúlvicos en tomate, incrementó el fósforo en 118% con respecto al testigo, este incremento posiblemente fue a que utilizaron diferente dosis y la forma de aplicación.

El contenido de Potasio en el fruto no mostro diferencias significativas entre los tratamientos, estos resultados coinciden con lo reportado por Zhang *et al.* (2021), al aplicar ácidos fúlvicos en diferentes vías de aplicación en el cultivo de tomate

no encontraron diferencias estadísticas con respecto al control al evaluar el potasio en fruto. El calcio en fruto se favoreció con los tratamientos AHyPF d2 y los AFyPF d2 y obtuvo un incremento de 60.3 y 35.4 % en comparación con el control, el resto de los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales al control.

Tabla 2. Contenido mineral en fruto de fresa variedad san Andreas con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias.

Tratamientos	N (%)	P mg/100 g	K mg/100 g	Ca mg/100 g	Mg mg/100 g	Fe ppm
AFyMM d1	2.0bcd	15.3c	127.5a	35.9bc	16.6a	362.7bc
AF MM d2	1.7de	15.8c	140.1a	29.9bcd	17.6a	360.7bc
AHyPF d1	2.1ab	15.8c	147.3a	32.3bcd	15.5a	330.5c
AHyPF d2	1.7e	17.0ab	136.1a	45.7a	13.4a	493.5a
AFyAzoz d1	2.1abc	15.7c	141.8a	32.7bcd	15.1a	384.7bc
AFyAzoz d2	1.8cde	15.4c	155.6a	26.0d	18.0a	338.0c
AFyPF d1	1.8cde	17.6a	130.7a	35.2bc	14.7a	386.0bc
AFyPF d2	1.8cde	15.7c	135.3a	38.6ab	18.0a	457.7ab
MHyF+Azoz d1	2.3 a	16.1bc	142.0a	29.6cd	17.9a	349.7c
MHyF+Azoz d2	2.1ab	16.c	144.5a	30.3bcd	16.7a	379.0bc
Control	1.7e	15.8c	140.5a	28.5cd	12.6a	369.2bc
DMS	0.269	0.875	23.865	8.974	4.465	99.576
Significancia	**	**	ns	**	ns	**

Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD Fisher ($P \leq 0.05$). DMS= Diferencia mínima significativa * = Significativo, **= Altamente significativo, ns= No significativo.

Estos resultados son parecidos a lo reportado por Sönmez y Gülser (2016), al realizar un estudio con el fin de determinar los efectos del nitrato de calcio y aplicaciones de ácidos húmicos en la absorción de nutrientes de plántulas de pimiento bajo estrés salino, reportan en calcio un incremento de 36 y 70% respecto al control. Sin embargo, fueron diferentes a Tursun *et al.* (2018) donde evaluaron los efectos de ácidos húmicos en perejil bajo diferentes

concentraciones de boro para determinar la absorción de nutrientes esenciales, reportan que no encontraron diferencias entre tratamientos al evaluar el calcio, debido posiblemente a que el boro tiene una relación antagónica con el calcio (Gezgin y Hamurcu, 2006).

En la concentración de Magnesio (Mg) en fruto no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, esto coincide con Galindo *et al.* (2016), al aplicar *Azospirillum brasilense* en el cultivo de maíz al evaluar el magnesio no encontraron diferencias significativas en comparación con el control sin inoculación. También concuerda con Pilanal *et al.* (2015), al evaluar ácidos húmicos aplicados a plantas de fresa no encontraron diferencias entre tratamientos al evaluar minerales como el magnesio, esto puede atribuirse a que la aplicación de ácido húmico a dosis altas posiblemente inhibe la absorción de nutrientes en fresa.

El Hierro (Fe) se incrementó con AHyPF d2 en 33.6 % con respecto al control, los AFyPF d2 también incrementaron al Fe en 23.8 % sin embargo estadísticamente fue igual al control, así como el resto de los tratamientos. Pii *et al.* (2018) con la inoculación de raíces bacterianas favorecieron significativamente el contenido de micronutrientes en frutas de fresa, las plantas tratadas con *Azospirillum brasilense* mostraron una mayor concentración de hierro (Fe) y zinc (Zn).

Conclusiones.

Los bioestimulantes con sustancias húmicas y rizobacterias favorecieron la absorción de minerales en plantas de fresa, la concentración de N en hoja se

incrementó con los Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum* d1, el N en fruto con la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum* d1, el P hoja y fruto se favoreció con Ácidos Fúlvicos y *Pseudomona fluorescens* d1, el K en hoja aumentó con la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum* d1, el Ca en hoja se favoreció con Ácidos Fúlvicos y Mezcla de Microorganismos d1, el Ca en fruto con Ácidos Húmicos y *Pseudomona fluorescens* d2, el Mg hoja se acrecentó con Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum* d1, el Mg en raíz con Ácidos Fúlvicos y *Pseudomona fluorescens* d2, el Fe en fruto se benefició con Ácidos Húmicos y *Pseudomona fluorescens* d2. Los bioestimulantes son una alternativa tecnológica y ecológica para incrementar el contenido mineral en el cultivo de fresa.

LITERATURA CITADA

- Abdel, YR, Abouzienna, HF, Amin, AA (2019) Improve quality and productivity of some faba bean cultivars with foliar application of fulvic acid. Bulletin of the National Research Centre 43: 1-11. DOI: 10.1186/s42269-018-0040-3
- Aghaeifard F, Babalar M, Fallahi E, Ahmadi A (2015) Influence of humic acid and salicylic acid on yield, fruit quality, and leaf mineral elements of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) Cv. Camarosa. Journal of Plant Nutrition 39:1821-1829. DOI: 10.1080/01904167.2015.1088023.
- Ahemad M, Kibret M (2013) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University Science 26: 1-20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- AOAC. (1980). Association of Official analytical Chemiste. Official Methods of Analysis. Kjeldahl method 2.062. 13th edition. Washington D.C., USA.p.547-562.
- Ávila A, González DJ (2012.) La competitividad de las fresas (*fragaria* spp.) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. Agricultura, sociedad y desarrollo 9: 17-27.

- Arıkan S, Ipek M, Esitken A, Pırlak L, Dönmez MF, Turan M (2020) Plant growth promoting rhizobacteria mitigate deleterious combined effects of salinity and lime in soil in strawberry plants. *Journal of Plant Nutrition* 43: 2028-2039. DOI:10.1080/01904167.2020.1766073
- Avitia E, Pineda J, Castillo AM, Trejo LI, Corona T, Cervantes E (2014) Extracción nutrimental en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 519-524 DOI:10.29312/remexca.v5i3.955
- Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77–136
- Bashan Y, Harrison SK, Whitmoyer RE (1990) Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 769-775.
- Bashan Y, Holguin G (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances 1990-1996. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 103-121.
- Besen MR, Neto AFG, Neto M, Zampar EJ, Costa EJ, Cordioli, VR, Inoue TT, Batista MA (2021) Nitrogen fertilization and leaf spraying with *Azospirillum brasilense* in wheat: effects on mineral nutrition and yield. *Revista de Ciências Agroveterinárias.* 19: 483-493. DOI: 10.5965/223811711942020483
- Boleta EHM, Shintate F, Jalal A, Santini JMK, Rodrigues WL, Lima BHd, Arf O, Silva MRd, Buzetti S and Teixeira Filho MCM (2020) Inoculation with growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and its effects on productivity and nutritional accumulation of wheat cultivars. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4: 1-10. DOI:10.3389/fsufs.2020.607262
- Bown HE, Watt MS, Clinton PW, Mason EG. 2010. Influence of ammonium and nitrate supply on growth, dry matter partition, N uptake and photosynthetic

capacity of *Pinus radiata* seedlings. *Trees: Structure and Function* 24: 1097-1107. DOI:10.1007/s00468-010-0482-1

Da Silva MSRA, dos Santos BdMS, da Silva CSRA, Antunes LFS, dos Santos RM, Santos CHB, Rigobelo EC (2021) Humic substances in combination with plant growth-promoting bacteria as an alternative for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-14. DOI:10.3389/fmicb.2021.719653

Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3–14. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021

Ekin Z (2019) Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. *Sustainability*. 11:341711. DOI: 10.3390/su11123417

Filho MCMT, Galindo FS, Buzetti S, Boleta, EHM (2018) The Effect of N fertilization on wheat under inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Nitrogen in Agriculture Updates* 9:164-186. DOI:10.5772/intechopen.68904

Galindo FS, Teixeira MCM, Buzetti S, Santini JMK, Alves CJ, Nogueira LM, Ludkiewicz MGZ, Andreotti M, Bellote JLM (2016) Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 40: 1-18.

García AC, de Souza LGA, Pereira MG, Castro RN, García JM, Zonta E (2016) Structure property function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports*. 6: 1-10. DOI: 10.1038/srep20798

Gerendás J, Führs H (2013) La importancia del magnesio para la calidad de los cultivos. *Suelo vegetal* 368: 101–128. DOI:10.1007/s11104-012-1555-2

Gezgin S, Hamurcu M (2006) The importance of the nutrient elements interaction and the interactions between boron with the other nutrients elements in

plant nutrition. Selçuk University. Yearbook of the Faculty of Agriculture pp: 24-31.

- Guerrero MF, Lovaisa NC, Salazar SM, Díaz JC, Pedraza RO (2014) Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. *Plant Biology* 16: 726–731. DOI:10.1111/plb.12114
- Gupta P, Rani R, Chandra A, Kumar V (2018) Potential applications of *Pseudomonas* sp. (strain CPSB21) to ameliorate Cr⁶⁺ stress and phytoremediation of tannery effluent contaminated agricultural soils. *Scientific reports*. 8: 4860. DOI:10.1038/s41598-018-23322-
- Hernández MA, Vázquez D, Linares A., Gloria, De Dios GE, Guerrero A, Rodríguez N (2020) Inoculation effect of *Azospirillum* spp. over nutrimental content of moringa (*Moringa oleifera* Lam.). *Terra Latinoamericana* 38: 29-38. DOI:10.28940/terra.v38i1.542
- Hirschi KD (2004) The calcium conundrum. both versatile nutrient and specific signal. *Plant physiology*. 136: 2438–2442. DOI:10.1104/pp.104.046490
- Husein ME, El Hassan SA. and Shahein MM (2015) Effect of humic, fulvic acid and calcium foliar application on growth and yield of tomato plants. *International Journal of Biosciences* 7: 132-140. DOI:10.12692/ijb/7.1.132-140
- Fukami J, Cerezini, P, Hungria M (2018) *Azospirillum*: beneficios que van mucho más allá de la fijación biológica de nitrógeno. *AMB Expres* 8: 1-12. DOI:10.1186/s13568-018-0608-1
- Jindo K, Olivares FL, Malcher DJ, Sánchez MA, Kempenaar C, Canellas LP (2020) From lab to field: Role of humic substances under open-field and greenhouse conditions as biostimulant and biocontrol agent. *Frontiers in Plant Science* 11:426. DOI:10.3389/fpls.2020.00426
- Karakas S, Dikilitas M (2021) Determination of the physiological and biochemical effects of humic acid application in strawberry plant grown under salt

- stress. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 25: 326-335. DOI:10.29050/harranziraat.905113
- Kumar M, Zeng X, Su S, Wang Y, Bai L, Zhang Y, Li T, Zhang X (2019) The effect of fulvic acids derived from different materials on changing properties of albic black soil in the northeast plain of China. *Molecules*. 24:1535. DOI:10.3390/molecules24081535
- Kroh GE, Pilon M (2020) Regulation of iron homeostasis and use in chloroplasts. *International journal of molecular sciences* 21: 3395. DOI:10.3390/ijms21093395
- McFarland J (1907) Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 14: 1176-1178. DOI:10.1001/jama.1907.25320140022001
- Martínez JI, Gómez M, Gómez MD, Faz A, Martínez S, Acosta JA (2019) *Pseudomonas fluorescens* affects nutrient dynamics in plant-soil system for melon production. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 79: 223-233. DOI:10.4067/S0718-58392019000200223
- Mogollón J, Beusen A, Van Grinsven H, Westhoek H, Bouwman A (2018) Future agricultural phosphorus demand according to the shared socioeconomic pathways. *Global Environmental Change* 50: 149–163. DOI:10.1016/j.gloenvcha.2018.03.007
- Moreno A, García V, Reyes JL, Vásquez J, Cano P (2018) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20:1. 68 – 83. DOI:10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Nardi S, Schiavon M, Francioso O (2021) Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules* 26: 2256. DOI:10.3390/molecules26082256
- Leite JM, Pitumpe PS, Ciampitti, IA, Hettiarachchi, GM, Maurmann L, Trivelin, PCO, Sunoj, SVJ (2020) Co-addition of humic substances and humic acids

- with urea enhances foliar nitrogen use efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Heliyon* 6: 1-8. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e05100
- López R, González G, Vázquez RE, Olivares E, Vidales JA, Carranza R, Ortega M (2014) Metodología para obtener ácidos húmicos y fúlvicos y su caracterización mediante espectrofotometría infrarroja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8:1397-1407.
- Luna L, Martínez RA, Hernández M, Arvizu SM, Pacheco JR (2013) Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 63- 69.
- Ortiz JA., Delgadillo J, Rodríguez MN, Calderón G (2016) Inoculación bacteriana en el crecimiento y calidad del fruto de cinco variedades de fresa en suelos con ph contrastante. *Terra Latinoamericana* 34:177-185.
- Olivares FL, Busato JG, de Paula AM, da Silva L, Aguiar NO, Canellas LP (2017) Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4: 1-13 DOI:10.1186/s40538-017-0112-x
- Paredes M, Espinosa D (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70
- Pii Y, Graf H, Valentinuzzi F, Cesco S, Mimmo T (2018) The effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth and quality of strawberries. *Acta Horticulturae* 1217: 231-238 DOI:10.17660/ActaHortic.2018.1217.29
- Pilanal N, Kaplan M (2003) Investigation of effects on nutrient uptake of humic acid applications of different forms to strawberry plant. *Journal of Plant Nutrition* 26: 835-843. DOI:10.1081/PLN-120018568
- Sah S, Sahgal M, Singh R (2017) Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas siderophore*. *3 Biotech* 7: 121. DOI:10.1007/s13205-017-0772-z

- Sharma A, Johri BN (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research* 158:243–248. DOI:10.1078/0944-5013-00197
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology* 156:997–1005. DOI:10.1104/pp.111.175232
- Shirin K, Naseem, S, Bashir E, Imad S, Shafiq S (2008) A comparison of digestion methods for the estimation of elements in *Dodonaea Viscosa*: a native flora of Wadh, Balochistan, Pakistan. *Journal Chemical Society of Pakistan* 30: 90-95.
- SIAP. (2020). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Sönmez and Gülser (2016) Effects of humic acid and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ on nutrient contents in pepper (*Capsicum annuum*) seedling under salt stress, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 66: 613-618. DOI:10.1080/09064710.2016.1205654
- Soppelsa S, Kelderer M, Casera C, Bassi M, Robatscher R, Matteazzi A, Andreotti C (2019) Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. *Agronomy* 9:483. DOI:10.3390/agronomy9090483
- Suh HY, Yoo KS, Suh SG (2014) Effect of foliar application of fulvic acid on plant growth and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Horticulture, Environment and Biotechnology* 55: 455–461. DOI:10.1007/s13580-014-0004-y
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) Un estudio taxonómico del grupo *Spirillum lipoferum*, con las descripciones de un nuevo género, *Azospirillum* gen. nov. y dos especies *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) peine. nov. y *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* 24:967–980

- Trevisan S, Francioso O, Quaggiotti S, Nardi S (2010) Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling and Behavior* 5: 635–643. DOI:10.4161/psb.5.6.11211
- Turan M, Yıldırım E, Ekinci M Argin S (2021) Effect of biostimulants on yield and quality of cherry tomatoes grown in fertile and stressed soils. *Hortscience* 56:414–423. DOI:10.21273/hortsci15568-20
- Türkmen Ö, Dursun A, Turan M, Erdinç C (2004) Calcium and humic acid affect seed germination, growth, and nutrient content of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings under saline soil conditions, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 54: 168-174. DOI:10.1080/0906471031002201
- Veobides H, Guridi F Vázquez V (2018) Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales* 39 :102-109.
- White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants. *Annals of botany* 92: 487–511. DOI:10.1093/aob/mcg164
- Yang F, Tang C Markus A (2021) Natural and artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil Microorganisms. *Chemical Society Reviews* 50: 6221–6239.
- Zhang P, Zhang H, Wu G, Chen X, Gruda N, Li X, Dong J Duan Z (2021) Dose-dependent application of straw-derived fulvic acid on yield and quality of tomato plants grown in a greenhouse. *Frontiers in Plant Science* 12:736613. DOI:10.3389/fpls.2021.736613

TERCER ARTÍCULO

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y
RIZOBACTERIAS EN CRECIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTOS DE
FRAMBUESA**

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS Y RIZOBACTERIAS EN CRECIMIENTO Y CALIDAD DE FRUTOS DE FRAMBUESA

Simeón Martínez de la Cruz¹, José Antonio González Fuentes^{1*}, Armando Robledo Olivo², Rosalinda Mendoza Villarreal¹, Armando Hernández Pérez¹, Miriam Desireé Dávila Medina ⁴, Fidel Maximiano Peña Ramos³

¹Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila. sime642@hotmail.com, jagf252001@gmail.com, rosalingdamendoza@hotmail.com, hernandez865@hotmail.com

² Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila. armando.robledo@outlook.com,

³ Departamento de Ciencias del Suelo, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila.

⁴ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Ing. J. Cárdenas Valdez S/N, República, 25280 Saltillo, Coahuila. desireedavila@uadec.edu.mx.

(*Autor para correspondencia: jagf252001@gmail.com)

Resumen

México es un importante productor en el cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), sin embargo, la agricultura intensiva plantea serios problemas como la contaminación ambiental, disminución de la fertilidad del suelo, causado por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y plaguicidas, por lo que se buscan alternativas biotecnológicas favorables al medio ambiente. El objetivo de esta

investigación fue evaluar el efecto de un bioestimulante a base de sustancias húmicas y rizobacterias en variables agronómicas y de calidad en cultivo de frambuesa, realizada en la UAAAN en el año 2021, aplicando los siguientes tratamientos: 1. Ácidos Fúlvicos y Mezcla de microorganismos, 2. Ácidos Húmicos y *Pseudomonas fluorescens*, 3. Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum*, 4. Ácidos Fúlvicos y *Pseudomonas fluorescens*, 5. Mezcla AH y AF más *Azospirillum* y el Testigo, con dos diferentes dosis, D1: Ácidos húmicos y/o fúlvicos: 3 mL y microorganismo 5 mL, D2: Ácidos húmicos y/o fúlvicos: 3.5 mL y microorganismo 4 mL, con 4 repeticiones por tratamiento. La altura de planta incremento con AFyAzoz d1 en 24.3%, el peso de fruto se favoreció con AFyMM d2 en 37.8%, el rendimiento incremento con AFyPF d2 en 78.2%, los SST con AFyMM d1 en 23 %, la Vitamina C incremento en 20% con aplicación de AFyPF d2. En el análisis de componentes principales existe correlación positiva entre Numero de frutos y Altura de planta ($r=0.94^{**}$), Rendimiento y Numero de frutos ($r=0.91^{**}$). Los bioestimulantes con rizobacterias y sustancias húmicas son una alternativa biotecnológica para ser aplicada al cultivo de frambuesa.

Palabras clave: Frambuesa, calidad, rizobacterias, sustancias húmicas.

ABSTRACT

Mexico is an important producer in the cultivation of raspberry (*Rubus idaeus* L.), however, intensive agriculture poses serious problems such as environmental pollution, decreased soil fertility, caused by the indiscriminate use of chemical fertilizers and pesticides, for what are sought biotechnological alternatives

favorable to the environment. The objective of this research was to evaluate the effect of a biostimulant based on humic substances and rhizobacteria on agronomic and quality variables in raspberry cultivation, carried out at the UAAAN in 2021, applying the following treatments: 1. Fulvic Acids and Mixture of microorganisms, 2. Humic Acids and *Pseudomonas fluorescens*, 3. Fulvic Acids and *Azospirillum*, 4. Fulvic Acids and *Pseudomonas fluorescens*, 5. Mix AH and AF plus *Azospirillum* and the Control, with two different doses, D1: Humic acids and/or fulvic: 3 mL and microorganism 5 mL, D2: Humic and/or fulvic acids: 3.5 mL and microorganism 4 mL, with 4 repetitions per treatment. Plant height increased with AFyAzoz d1 by 24.3%, fruit weight was favored with AFyMM d2 by 37.8%, yield increased with AFyPF d2 by 78.2%, SST with AFyMM d1 by 23%, Vitamin C increased by 20 % with application of AFyPF d2. In the principal component analysis there is a positive correlation between Number of fruits and Plant height ($r=0.94^{**}$), Yield and Number of fruits ($r=0.91^{**}$). Biostimulants with rhizobacteria and humic substances are a biotechnological alternative to be applied to raspberry cultivation.

Keywords: Raspberry, quality, rhizobacteria, humic substances.

INTRODUCCIÓN

La frambuesa (*Rubus idaeus* L.), es una frutilla de gran importancia en algunos países, así como en México, pertenece a la familia Rosácea, es un arbusto del grupo de los berries se cultiva en algunos estados como Jalisco, Michoacán y Baja California con una producción de 104,080.19, 28,895.40 y 10,221.74 ton/ha

respectivamente (SIAP, 2020). El mercado de la frambuesa y berries en general, presenta condiciones alentadoras en el crecimiento de la demanda y su consumo; se busca desarrollar tecnologías innovadoras que aumenten la calidad, rendimiento y ayuden disminuir el daño ambiental (García y Sommerfeld, 2016). El uso extensivo de fertilizantes químicos plantea serios problemas como la contaminación ambiental, desarrolla la resistencia a plagas y pérdida de fertilidad del suelo (Ye *et al.*, 2020). Los bioestimulantes ofrecen un potencial para mejorar la producción y calidad de los cultivos, así como reducir el uso de fertilizantes (Quintero *et al.*, 2018). El uso de bioestimulantes se está convirtiendo en una práctica común en los sistemas de producción, debido a su capacidad para cambiar los procesos fisiológicos de las plantas, relacionados con el crecimiento, la producción y la mitigación del estrés (Afonso *et al.*, 2022).

Las sustancias húmicas (SH), son los constituyentes naturales de la materia orgánica del suelo, resultantes de la descomposición de los residuos de la planta, animales y microbianos (Canellas y Olivares, 2014). Estas sustancias tienen efectos considerables sobre la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos debido a sus propiedades fisicoquímicas y bioquímicas únicas, juegan un papel vital en establecer interacciones bióticas y abióticas dentro de la rizosfera vegetal (Shah *et al.*, 2018). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) pueden interactuar con las plantas directamente aumentando la disponibilidad de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, hierro, la producción y regulación de compuestos involucrados en el crecimiento de las plantas como fitohormonas (Oleńska *et al.*, 2020). Los inoculantes a base de rizobacterias son una alternativa

biotecnológica en la agricultura sustentable, que permite incrementar el rendimiento, disminuyendo los costos de producción en la práctica agrícola (Velasco *et al.*, 2020). La aplicación combinada de un consorcio microbiano y sustancias húmicas mejoró el rendimiento en arándanos, lo que resulta en un efecto sinérgico cuando se combinan microorganismos benéficos y sustancias húmicas (Schoebitz *et al.*, 2016). La aplicación de bacterias benéficas y humatos incrementó la productividad en tomate y las defensas de la planta (Olivares *et al.*, 2017). Inoculación de rizobacterias y ácidos húmicos alteró la composición de los exudados de raíces en maíz, promoviendo un aumento en la cantidad y variedad de compuestos nitrogenados (Da Silva *et al.*, 2014). Es probable que el mecanismo de las sustancias húmicas que afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas se explique por su conexión con los microorganismos de la rizosfera y su activación por las secreciones de las raíces de las plantas tratadas con preparaciones húmicas (Bezuglova y Klimenko, 2022). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y las sustancias húmicas (HS) son opciones prometedoras para reducir el uso de pesticidas y fertilizantes minerales (Da Silva *et al.*, 2021). Por lo que el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un bioestimulante a base de sustancias húmicas y rizobacterias, en variables agronómicas y calidad en cultivo de frambuesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La investigación se realizó en un invernadero tipo túnel del Departamento de Horticultura, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio

Narro, en Saltillo, Coahuila, México, que se localiza entre las coordenadas geográficas 25° 22' de latitud norte y 101° 02' longitud oeste y a una altitud de 1,742 msnm. Se utilizaron plantas de frambuesa (xz28), fueron plantadas en el mes de febrero de 2021 a una edad de 2 meses, en la plantación se utilizaron 3 camellones de suelo con 12 m de largo y 1 de ancho, se utilizó un sistema de riego por goteo con cintilla de 20 cm de separación entre goteros.

Sustancias húmicas. Las sustancias húmicas y fúlvicas se extrajeron de Leonardita, compuesto orgánico mineral, aportado por la empresa minera DHD de México ubicada en Sabinas, Coahuila. La extracción se realizó con la metodología de López *et al.*, (2014), utilizando hidróxido de potasio (KOH) 1 N, y para la separación se utilizó ácido acético hasta obtener un pH de 4, posteriormente 24 horas después, por decantación, se obtuvieron los ácidos fúlvicos con una coloración amarilla dorada, mientras los ácidos húmicos con apariencia de suelo y color café oscuro permanecieron en el fondo del contenedor.

Material microbiológico y preparación de cepas bacterianas. Cepas de rizobacterias de *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*, fueron proporcionadas por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. La rizobacteria *Azospirillum brasilense* se reactivó en medio de cultivo NRCB, las especies de *Pseudomonas* se sembraron en medio King B. En la preparación, las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo y en agitación constante a 150 rpm durante 48 horas a 25° ±5 °C,

donde el crecimiento bacteriano fue evidenciado por la turbidez en el medio. La concentración celular bacteriana fue de 10^9 cel/ml de acuerdo la escala de turbidez Mc Farland (Mc Farland, 1907).

Tratamientos. En el experimento se utilizaron los siguientes tratamientos: 1. Ácidos Fúlvicos y Mezcla de microorganismos (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Azospirillum brasilense*), 2. Ácidos Húmicos y *Pseudomonas fluorescens*, 3. Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum brasilense*, 4. Ácidos Fúlvicos y *Pseudomonas fluorescens*, 5. Mezcla AH y AF más *Azospirillum* y el Control, con dos diferentes dosis, D1: Ácidos húmicos y/o fúlvicos: 3 ml y microorganismo 5 ml, D2: Ácidos húmicos y/o fúlvicos: 3.5 ml y microorganismo 4 ml, en total fueron 10 tratamientos más el control (solución Steiner), se aplicaron las sustancias húmicas cada 15 días y las rizobacterias cada 30 días.

Variables evaluadas.

Las variables agronómicas se evaluaron al final del ciclo de cultivo, 180 días después del trasplante. La altura de planta se midió con cinta métrica desde la base de la corona hasta el ápice de la hoja más alta, el diámetro basal del tallo fue medido con un calibrador digital vernier marca STEREN modelo HER-411. El Peso de fruto fue registrado con balanza gramera marca TJ modelo MH-500. El Diámetro polar de fruto y Diámetro ecuatorial de fruto, fue medido con un calibrador digital vernier marca STEREN modelo HER-411, el Peso de fruto fue registrado con balanza gramera marca TJ modelo MH-500, el Numero de frutos

se registró por planta y en el Rendimiento se pesó el total de frutos por planta, se reportó como (g/planta).

En las variables de calidad, los Solidos Solubles Totales (SST) se midieron colocando una gota de jugo del fruto de frambuesa sobre el lente del refractómetro digital marca HANNA modelo 96-801, las lecturas fueron expresadas en grados brix. El potencial de hidrogeno (pH), se midió con un potenciómetro digital HI98130 (Hanna Instruments). La acidez titulable se determinó por colorimetría de acuerdo a la AOAC, (2000), para ello se pesaron 10 g de fruto de frambuesa, se maceró y luego se agregó 100 mL de agua desionizada y se filtró, del volumen total del filtrado se tomaron 10 mL en un matraz, se añadieron 2-3 gotas de fenolftaleína y se realizó la tinción con NaOH (0.1N) hasta viraje rosa de manera constante, la acidez titulable se expresa cómo % de ácido cítrico. La determinación de Vitamina C en fruto de frambuesa, fue con la metodología de Padayatt *et al.*, (2001), se utilizaron 20 gramos de fruto fresco, se macero en mortero de porcelana con 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 2%, posteriormente se le agregaron 100 ml de agua desionizada y se filtró con gasa, del volumen total del filtrado se tomó una proporción de 10 mL y se hizo la titulación con 2-6 diclorofenolindofenol, la Vitamina C se reportó en mg/100g.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) usando el paquete estadístico Infostat versión (2020). Para la separación de medias se utilizó la prueba de LSD de Fisher ($P \leq 0.05$). El Análisis

de Componentes Principales, se realizó con el paquete computacional Minitab16 (2009).

Resultados y discusión.

Variables agronómicas y de producción

Se evaluó la altura de planta de frambuesa (Figura 1), se observan diferencias significativas entre tratamientos, la altura se benefició con la aplicación de AFyAzoz d1, AFyPF d2, MHyF + Azoz d1, AHyPF d2, MHyF + Azoz d2, AHyPF d1, AFyAzoz d2 el incremento con respecto al control fue de 24.3, 23.6, 22.2, 21.6, 15.5, 11.4 y 10.8%, el resto de los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales al testigo.

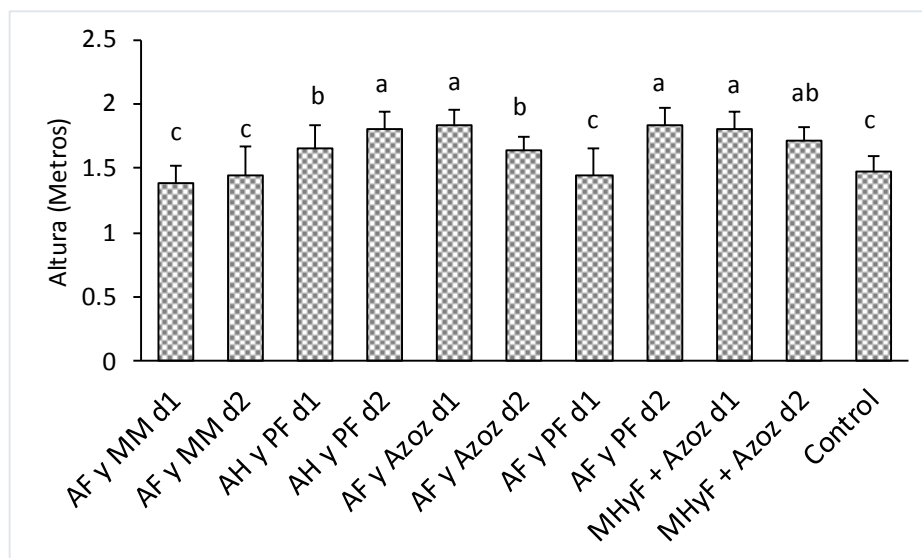


Figura 1. Altura de planta en frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$)

Estos resultados coinciden con Schoebitz *et al.*, (2016), al aplicar ácidos húmicos más un consorcio bacteriano en el cultivo de arandano incrementaron en 16.0% la altura de planta en comparación con el control. En un estudio por Esringü *et al.*, (2015) con aplicaciones de ácidos fúlvicos incremento en 25.6% en la altura de planta ornamental *Impatiens walleriana* L.

Con aplicación de ácidos húmicos y fúlvicos se promueve el crecimiento de las plantas a través de efectos similares a las hormonas, ya que la descomposición de estas sustancias libera auxinas (Shahrajabian *et al.*, 2021). La inoculación de rizobacterias producen varias fitohormonas que ingresan a la planta desde las raíces y pueden inducir alteraciones en la morfología, fisiología de los brotes y las hojas (Yong *et al.*, 2014).

En la evaluación del diámetro basal de tallo en plantas de frambuesa (Figura 2), se observa que la aplicación de AFyPFd2 y los AHyPF d2 incrementaron el diámetro de tallo en 30.4 y 20.8%, el resto de los tratamientos se comportaron iguales al testigo.

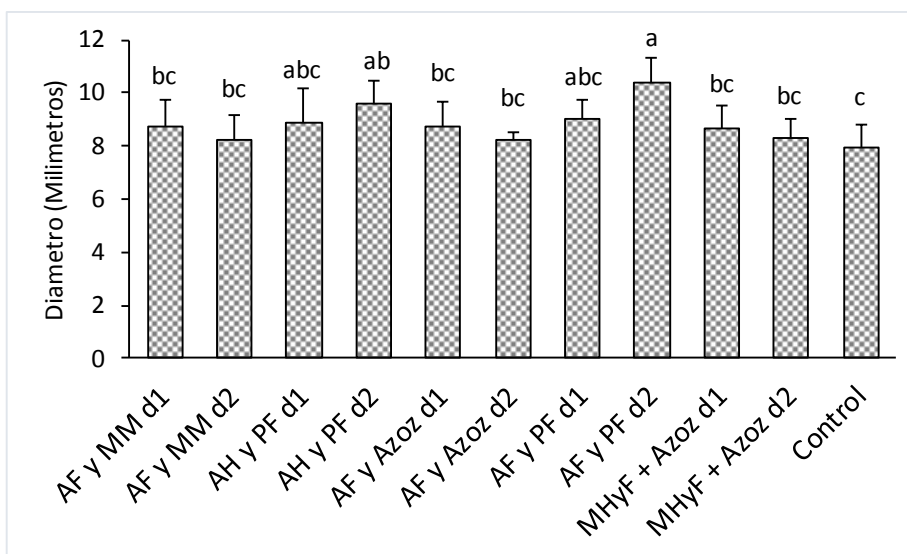


Figura 2. Diámetro basal de tallo en frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$)

En un experimento realizado por Ekin, (2020) en plantas de cártamo con aplicación de ácidos húmicos incrementaron en 17.25% el diámetro de tallo con respecto al testigo. En un estudio por Protim *et al.*, (2017), al inocular cepas del genero *pseudomonas* en plantas de ricino (*Ricinus communis* L.) incrementaron el diámetro de tallo en 10.6% comparado con la fertilización química. Este incremento observado en nuestro experimento pudo deberse a la combinación de sustancias húmicas y rizobacterias.

El peso de fruto (Figura 3), se favoreció en forma significativa con la aplicación de AFyMM d2 y con AFyPF d2 donde obtuvieron un incremento de 37.8 y 24.9 % sin embargo este último tratamiento estadísticamente fue igual con el control, como el resto de los tratamientos. En un estudio por Zejak *et al.*, (2021), al evaluar la producción y calidad de frutos frambuesa reporta en peso de fruto valores entre 3.4 y 4.7g los cuales fueron similares a lo encontrado en este trabajo.

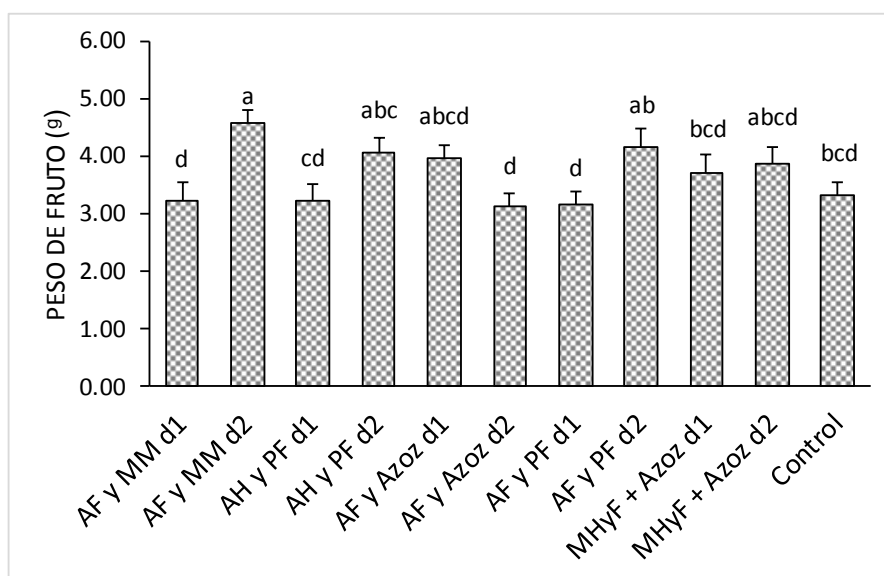


Figura 3. Peso de fruto de frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$)

El peso de fruto fue incrementado por los ácidos fúlvicos y húmicos, al respecto Kumar *et al.*, (2005), al utilizar ácidos fúlvicos derivados de diferentes fuentes y aplicados al cultivo de maíz, obtuvo un incremento significativo en peso de grano de 4% con respecto al control, el incremento encontrado en nuestra investigación pudo deberse a que los ácidos fúlvicos fueron extraídos de Leonardita y no de extractos de plantas como los utilizados por Kumar *et al.*, (2005) en su investigación.

La evaluación del Diámetro ecuatorial de fruto (DEF) se observa en la Figura 4, el incremento observado en esta variable es con la aplicación de AFyMM d2, AFyPF d2, AFyAzoz d2 y AHyPF d2 con incrementos respecto al control de 44.5, 29.8, 28.6 y 28.4%, los otros tratamientos aplicados se comportaron iguales al testigo. El diámetro polar de fruto (DPF) en Figura 4, se incrementó con los tratamientos AFyPF d2, AFyMM d2, AFyAzoz d1, con 13.3, 11.8 y 8.4%, los demás tratamientos estadísticamente fueron iguales al control. En un estudio por Abd El-Razek *et al.*, (2020) con aplicaciones de ácidos húmicos y materia orgánica en cultivo de olivo, al evaluar el fruto incremento el DPF en 30.2 % y el DEF en 28.9%. Abd El-Rheem *et al.*, (2017) con aplicaciones de ácidos fúlvicos con dosis 2 ml l⁻¹ en árbol de persimón (*Diospyros kaki* L.) incremento el DPF en 5.3 % y el DEF 8.8 %, este incremento menor observado podría deberse a que utilizaron diferente dosis al aplicar ácidos fúlvicos. Espinosa *et al.*, (2017) al aplicar rizobacterias como *Pseudomonas lini* con diferentes sustratos en el cultivo de tomate, al evaluar el fruto incremento el DPF en 6.1% y en DEF 4.0 % con respecto a su testigo sin rizobacteria. Sin embargo, Andrade-Sifuentes *et al.*, (2020) al aplicar una bioinoculación con *Azospirillum brasilense* en cultivo de tomate no encontraron diferencias entre tratamientos al evaluar DPF y DEF.

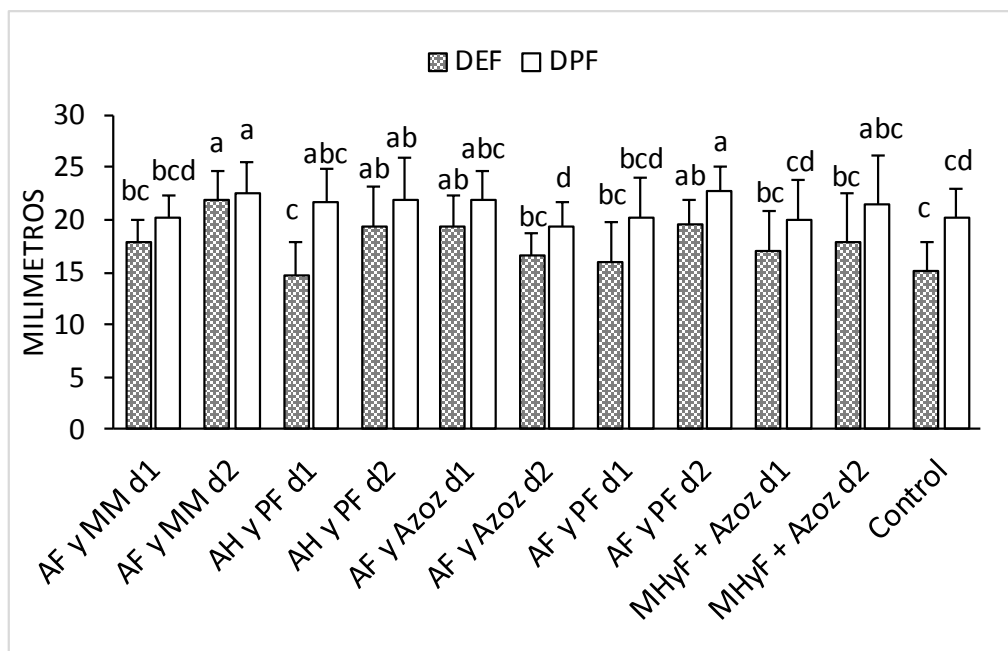


Figura 4. Diámetro Ecuatorial de Fruto (DEF) y Diámetro Polar de Fruto (DPF) de frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$)

El número de frutos (Figura 5), se incrementó con la aplicación de, AFyPF d2, AFyAzoz d1, MHyF+Azoz d2 y con AHyPF d2 con 45.8, 39.5, 33.3 y 29.1 % respectivamente respecto al control, el resto de los tratamientos estadísticamente fueron iguales al testigo. Estos resultados fueron parecidos a lo reportado por García-seco *et al.*, (2015) con la inoculación de una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal *Pseudomonas fluorescens* incremento en 42.8 % el número de frutos en el cultivo de arandano. En un estudio realizado por Kamal *et al.*, (2017) al aplicar ácidos húmicos en plantas de granada incremento el número de frutos en 38.2 %. Andrade-Sifuentes *et al.*, (2020) realizaron un experimento donde aplicaron la cepa *Azospirillum brasilense* en el cultivo de tomate, donde incrementaron el número de frutos por planta en 27%.

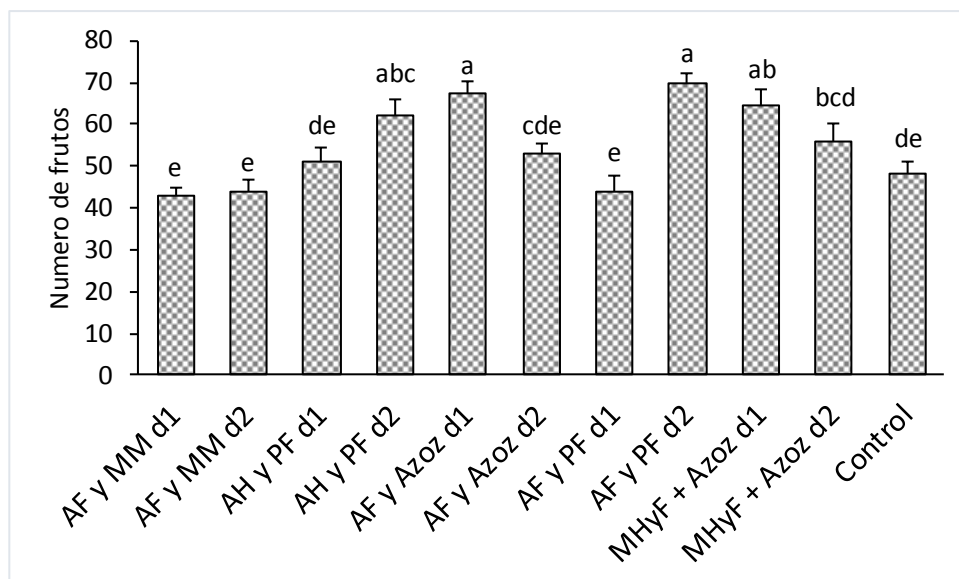


Figura 5. Número de frutos de frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$).

El rendimiento que se observa en la figura 6, se favoreció con la aplicación de los tratamientos AFyPF d2, AFyAzoz d1, AHyPF d2, y con la MHyF+Azoz d2 registrando un incremento de 78.2, 66.8, 57.5 y 48.7% en comparación con el control, el resto de los tratamientos se comportaron iguales al testigo. En un estudio por Hernández-Montiel *et al.*, (2017) al aplicar cepas de *Pseudomona putida* en cultivo de tomate incremento el rendimiento en 20.7 %. Andrade-Sifuentes *et al.*, (2020) en un experimento al aplicar la rizobacteria *Azospirillum brasilense* incremento el rendimiento en el cultivo de tomate en 35 %. Boleta *et al.*, (2020) realizó un estudio para investigar el uso potencial de una cepa *Azospirillum brasilense* en el cultivo de trigo donde incremento el rendimiento en 20%. Sin embargo, Rosales *et al.*, (2015), al aplicar ácidos fúlvicos en cultivo de melón, compararon tres tratamientos en suelo con un testigo sin aplicación de ácidos fúlvicos (AF0), aplicación de ácidos fúlvicos a pH6 (AF6) y de ácidos fúlvicos a pH7 (AF7) al evaluar el rendimiento no encontraron diferencias entre los tratamientos aplicados. Este rendimiento más alto presentado en nuestro

estudio se debió posiblemente a la combinación de rizobacterias con sustancias húmicas que sirvieron de fuente de carbono.

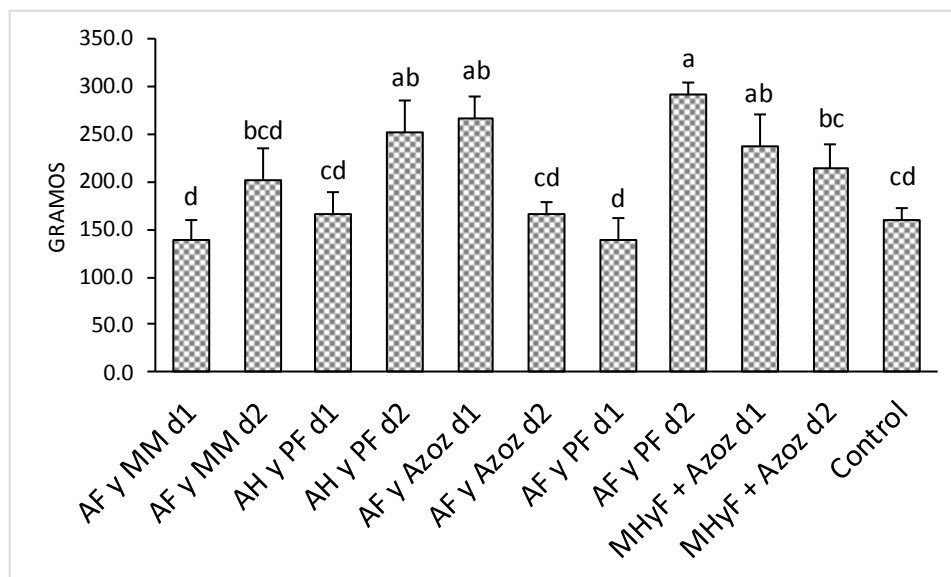


Figura 6. Rendimiento de frambuesa con aplicaciones de sustancias húmicas y rizobacterias. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos LSD de Fisher ($P \leq 0.05$).

Variables de calidad de fruto.

Se evaluaron atributos de calidad en fruto de fresa (Cuadro 1), los Sólidos solubles totales (SST), que se midieron en ° brix, fueron incrementados por los tratamientos AF y MM d1 en (12.3 ° brix), y por los AF y PF d1 en (12.2 ° brix) el incremento fue de 23 y 22% con respecto al control, los demás tratamientos se comportaron de acuerdo al análisis estadístico de la misma forma que el testigo. Dujmović *et al.*, (2012) al evaluar diferentes variedades de frambuesa encontraron en su investigación valores en sólidos solubles totales un rango de 9.4 a 11.5° brix. En el incremento de SST respecto al control los resultados fueron diferentes a Aghaeifard *et al.*, (2015), donde valoraron el impacto del ácido húmico aplicado a plantas de fresa y obtuvieron incremento de SST de 13.9 % con respecto al control. Ortiz *et al.*, (2016), al utilizar rizobacterias del genero *Pseudomonas* reportaron incrementos en SST de 1.2 % en el fruto de fresa en

comparación con su testigo. El porcentaje recomendado de sólidos disueltos en el fruto de frambuesa a la cosecha, es de 8.5 a 10° Brix (Contreras y González, 2005), estos resultados coincidieron con lo presentado en nuestro estudio. El pH del fruto se incrementó con la aplicación de AFyMM d2 con un incremento respecto al control de 5.6 %. Estos resultados fueron parecidos a lo reportado por El-Beltagi *et al.*, (2022), al aplicar un biofertilizante a base de rizobacterias de *Azospirillum* y *Azotobacter* en el cultivo de tomate cherry donde se incrementó el pH del jugo de fruto en 7 %.

Cuadro 1. Variables de calidad en fruto de frambuesa con aplicación de sustancias húmicas y rizobacterias.

Tratamientos	SST (° brix)	pH	Acidez Titulable (%)	Vitamina C (mg/100g)
AF y MM d1	12.3a	3.55ab	0.96c	51.6ab
AF y MM d2	10.3b	3.57a	1.23ab	49.1abc
AH y PF d1	9.5b	3.38bc	1.21ab	50.0abc
AH y PF d2	9.4b	3.45abc	1.18ab	53.8a
AF y Azoz d1	9.6b	3.5abc	1.23ab	52.5ab
AF y Azoz d2	9.3b	3.35c	1.25ab	48.4abc
AF y PF d1	12.2a	3.55ab	1.08bc	43.9c
AF y PF d2	10.4b	3.52abc	1.06bc	49.5abc
MHyF + Azoz d1	9.2b	3.47abc	1.28a	46.7bc
MHyF + Azoz d2	9.7b	3.37c	1.20ab	43.9c
Control	10.0b	3.38bc	1.20ab	44.7c
DMS	1.21	0.18	0.19	6.22
Significancia	**	*	*	**

Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales LSD

Fisher ($P \leq 0.05$). DMS = Diferencia mínima significativa * = Significativo, ** = Altamente significativo, ns = No significativo.

Sin embargo, fueron diferentes a lo mencionado por Shehata *et al.*, (2011) al aplicar ácidos húmicos en el cultivo de fresa, al evaluar el pH de fruto no encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Trujano-Fragoso *et al.*, (2017), realizó la evaluación en frutos de frambuesa de los cultivares Adelita,

Erika, Lupita y Polka reportando valores de 3.42 a 3.83, estos mismos valores de pH fueron obtenidos en este estudio.

En la acidez titulable del fruto se observa que los tratamientos se comportaron en su mayoría iguales al control, a excepción de AF y MM d1 (0.96%) que presento frutos con menor acidez con respecto a los demás tratamientos aplicados. Alvarado *et al.*, (2016), al estudiar diferentes densidades de plantación en el cultivo de frambuesa al evaluar la acidez titulable reporto valores de 1.37 a 1.42 % que fueron con más acidez a lo encontrado en nuestra investigación. En un estudio realizado por Todeschini *et al.*, (2018), donde utilizó cepas del genero *Pseudomonas* en combinación con hongos micorrízicos encontró un incremento de acidez titulable en fruto de fresa de 2.2 % con respecto a su control. Mientras que González *et al.*, (2018), al aplicar la *Pseudomonas lini* en cultivo de tomate incremento en un 18.9 % la acidez del fruto con respecto al testigo sin inoculación. Orhan *et al.*, (2018), al aplicar rizobacterias en el cultivo de frambuesa no encontró diferencias significativas entre tratamientos.

La Vitamina C se benefició con los AH y PF d2 en (53.8 mg/100g), AF y Azoz d1 (52.5 mg/100g), y con aplicación de AF y MM d1 en (51.6 mg/100g), con incremento respecto al control de 20, 17 y 15%, el resto de los tratamientos estadísticamente fueron iguales al testigo. Ponder y Hallmann, (2020), en una investigación comparando la agricultura convencional y de forma orgánica, reporta que las frutas de frambuesa convencionales obtuvieron valores de Vitamina C de (55.4 mg / 100g) en comparación con las frutas orgánicas con

(46.2 mg /100g). Aminifard *et al.*, (2012), con aplicaciones de Ácidos fúlvicos en el cultivo de pimiento no observo diferencias entre tratamientos al evaluar la Vitamina C. Sin embargo, Eshghi y Garazhian, (2015) utilizando ácidos húmicos en aplicaciones al suelo vía drench en el cultivo de fresa, incrementaron la Vitamina C en 45% con respecto al control.

Análisis de componentes principales

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) donde se incluyeron las variables agronómicas y de calidad en el cultivo de frambuesa. El análisis de los tres componentes principales de las poblaciones explica 85.9 % de la variación de datos de las 11 variables analizadas tal porcentaje resultó en sumar consecutivamente los valores proporcionales determinados en el análisis (Cuadro 2). De acuerdo con los vectores propios, en el primer componente principal las variables originales más importantes fueron: Peso fruto, Altura, Número de frutos, Rendimiento, las cuales contrastan con SST. En el segundo componente principal las variables con mayor influencia fueron: Acidez y Altura que contrastan con SST y pH. El tercer componente estuvo fuertemente influido por las variables: Peso de fruto y DEF que se relacionan negativamente con Diámetro de tallo.

Cuadro 2. Valores y vectores propios para los tres primeros componentes principales de 11 variables evaluadas en el cultivo de frambuesa.

	Componentes principales		
	1	2	3
Valor propio	4.9677	3.0595	1.4160

Proporción (%)	45.2	27.8	12.9
Acumulada (%)	45.2	73.0	85.9

Variables	Vectores propios		
Peso de fruto	0.362	-0.124	0.435
SST	-0.219	-0.478	-0.128
Acidez	0.098	0.465	0.385
Vitamina C	0.240	-0.146	-0.122
DEF	0.310	-0.270	0.394
DPF	0.342	-0.197	0.153
pH	0.083	-0.499	0.117
Diámetro de tallo	0.269	-0.234	-0.516
Altura	0.362	0.263	-0.272
Numero de frutos	0.375	0.180	-0.309
Rendimiento	0.435	0.053	-0.057

En la Figura 7 se observan las correlaciones entre las variables según los ángulos de los vectores que las representan. Se presentó una correlación positiva y altamente significativa entre las siguientes variables: Numero de frutos y Altura de planta ($r=0.94^{**}$), Rendimiento y Numero de frutos ($r=0.91^{**}$), Peso de fruto y DEF ($r=0.89^{**}$), Peso de fruto y DPF ($r=0.85^{**}$). Esto indica que el número de frutos fue favorecido por la altura de planta, y el rendimiento por el número de frutos, el peso de fruto fue influenciado por el DEF y DPF. Respecto a las variables que presentan una relación negativa y altamente significativa se encuentran: Acidez de fruto y los SST (-0.86^{**}). Por lo que los tratamientos con bajo porcentaje de acidez incremento los SST en el fruto de frambuesa.

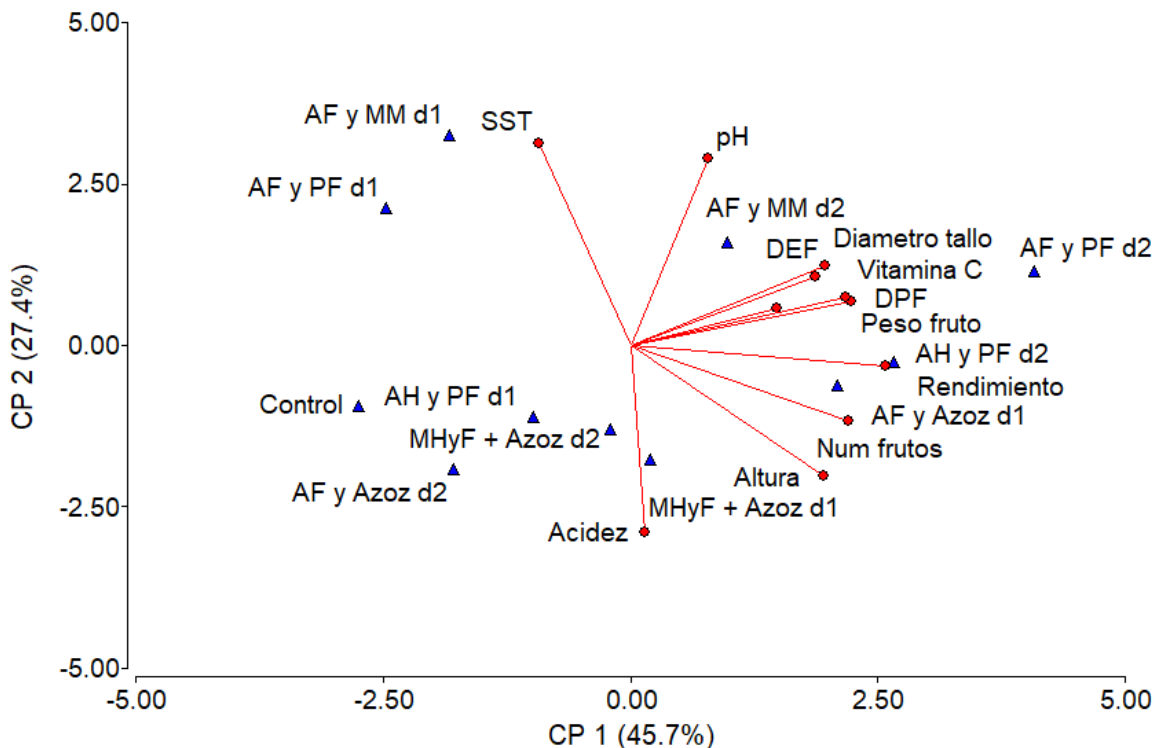


Figura 7. Biplot de tratamientos con sustancias húmicas más rizobacterias en variables agronómicas y de calidad de fruto en frambuesa

Conclusiones

Los bioestimulantes a base de sustancias húmicas y rizobacterias aplicadas al cultivo de frambuesa incrementaron el peso del fruto con los Ácidos Fúlvicos + Mezcla de Microorganismos d2 y los Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2; el rendimiento se favoreció con la aplicación de Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2, los SST se favorecieron con los tratamientos Ácidos Fúlvicos + mezcla de microorganismos d1 y por los Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d1; la vitamina C se incrementó con Ácidos húmicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2 y los Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasilense* d1. Existe correlación positiva y altamente significativa entre Numero de frutos y

Altura de planta, Rendimiento y Numero de fruto. Los bioestimulantes elaborados con sustancias húmicas combinadas con rizobacterias son una opción ecológica al manejo de abonos químicos, ayudan disminuir la contaminación de los suelos y el medio ambiente, favorecen parámetros agronómicos y de calidad en el cultivo de frambuesa.

Literatura citada.

- Abd El-Razek, E., Haggag, LF, El-Hady, ES et al. (2020). Effect of soil application of humic and biohumic acid on the yield and quality of the fruit of "Kalamata" olive trees. Bull Natl Res Cent 44, 73. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00318-8>
- Abd El-Rheem Kh. M., Kassem A. S. Mohammed and Yasser A. El-Damarawy. (2017). Effect of Humic and Fulvic Acid on Growth, Yield and Nutrients Balance of "Costata" Persimmon Trees. Journal of Agriculture and Food Technology 7(4)1-5
- Afonso S, Oliveira I, Meyer AS, Gonçalves B. (2022). Biostimulants to improved tree physiology and fruit quality: a review with special focus on sweet cherry. Agronomy 12(3):659. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030659>
- Aghaeifard, F., Babalar M., Fallahi E. and Ahmadi A. (2015). Influence of humic acid and salicylic acid on yield, fruit quality, and leaf mineral elements of strawberry (*Fragaria ananassa Duch.*) Cv. Camarosa. Journal of Plant Nutrition. 39(13):1821-1829. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1088023>.
- Aminifard MH, Aroiee H, Nemati H, Azizi M, Jaafar ZE. (2012). Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. African Journal of Biotechnology 11:13179-13185. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1507>
- Andrade-Sifuentes A, Fortis-Hernández M, Preciado-Rangel P, Orozco-Vidal JA, Yescas-Coronado P, Rueda-Puente EO. (2020). *Azospirillum brasilense* and solarized manure on the production and phytochemical quality of

- tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomy* 10(12):1956.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10121956>
- Alvarado-Raya, Horacio E., Avitia-García, Castillo-González. (2016). Producción de frambuesa 'Autumn Bliss' con diferentes densidades de caña en el Valle de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7 (1) :17-29.
- AOAC (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods, Assoc. Off. Anal. Chem. Int. (AOAC), Arlington, VA, USA. 2 000 p.
- Bezuglova, Olga, and Aleksandr Klimenko. (2022). Application of humic substances in agricultural industry. *Agronomy* 12 (3): 584.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12030584>
- Canellas L. and Fábio Olivares F. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1:3
- Contreras, de la R., F. J. y González R., V. (2005). Frambuesa roja para el sureste de Coahuila y Nuevo León. CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto para Productores Núm. 11. Coahuila, México. 23 p.
<http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/206.pdf>
- Da Silva Lima, L., Olivares, F.L., Rodrigues de Oliveira, R. (2014). Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1, 23.
<https://doi.org/10.1186/s40538-014-0023-z>
- Da Silva MSRA, dos Santos BdMS, da Silva CSRA, da Silva CSRA, Antunes LFS, dos Santos RM, Santos CHB and Rigobelo EC. (2021). Humic substances in combination with plant growth-promoting bacteria as an alternative for sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* 12:719653.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719653>
- Dujmović, A., Duralija B., Voća S., Vokurka A. and Ercisli S. 2012. Comparison of fruit chemical characteristics of two wild grown *Rubus* species from different locations of Croatia. *Molecules.* 17:10390-10398
<https://doi:10.3390/molecules170910390>

- El-Beltagi, H.S., Ahmad, I., Basit, A. (2022). Effect of *azospirillum* and *azotobacter* species on the performance of cherry tomato under different salinity levels. *Gesunde Pflanzen* 74, 487–499. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00625-2>
- Ekin, Z. (2020). Field evaluation of rhizobacterial inoculants in combination with humic substances to improve seed and oil yields of safflower (*carthamus tinctorius* L.) under irrigated and rainfed. *Applied Ecology and Environmental Research* 18(5): 6377-6403. DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1805_63776403
- Espinosa Palomeque, B., A. Moreno Reséndez, P. Cano Ríos, V. P. Álvarez Reyna, J. Sáenz Mata, H. Sánchez Galván y G. González Rodríguez. (2017). Inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afrodita en invernadero. *Terra Latinoamericana* 35: 169-178
- Eshghi, S. and Garazhian M (2015). Improving growth, yield and fruit quality of strawberry by foliar and soil drench applications of humic acid. *Iran Agricultural*. 34(1):14-20. <https://doi.org/10.22099/IAR.2015.3031>
- Esringü, A., Sezen, İ., Aytatlı, B. and Ercişli, S. (2015). Effect of humic and fulvic acid application on growth parameters in *impatiens walleriana* L. *Akademik Ziraat Dergisi*, 4 (1), 37-42
- García-Seco D, Zhang Y, Gutiérrez-Mañero FJ, Martín C, Ramos-Solano B. (2015). Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLOS ONE* 10(11): e0142639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142639>
- García J. and Sommerfeld M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol* 28, 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- González, G., Espinosa B., Cano P., Moreno A., Leos L., Sánchez H., Sáenz J. (2018). Influence of rhizobacteria in production and nutraceutical quality of

- tomato fruits under greenhouse condition. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9 (2): 367-379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1078>
- Hernández-Montiel LG, Chiquito-Contreras CJ, Murillo-Amador B, Vidal-Hernández L, Quiñones-Aguilar EE, and Chiquito Contreras RG. (2017). Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17 (4), 1003-1012
- InfoStat, Versión (2020). Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=36>
- Kumar M, Zeng X, Su S, Wang Y, Bai L, Zhang Y, Li T, Zhang X. (2019) The effect of fulvic acids derived from different materials on changing properties of albic black soil in the northeast plain of China. *Molecules*. 24:1535. DOI:10.3390/molecules24081535
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14, 1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001>
- Minitab, Inc. (2009). Minitab Statistical Software, Versión 16 para Windows, State College, Pennsylvania. Minitab® es una marca comercial registrada de Minitab, Inc.
- López R, González G, Vázquez RE, Olivares E, Vidales JA, Carranza R, Ortega M (2014). Metodología para obtener ácidos húmicos y fúlvicos y su caracterización mediante espectrofotometría infrarroja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:1397-1407.
- Oleńska, E., Małek W. and Wójcik M. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*. 743:54. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>

- Olivares, F., Galba J., Alessandra M., Da Silva L., Oliveira N. y Pasqualoto L. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4:30.13 p.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., and Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111(1), 38–43. <https://doi:10.1016/j.scienta.2006.09.002>
- Ortiz, J.A., Delgadillo J., Rodríguez M. N. y Calderón G. (2016). Inoculación bacteriana en el crecimiento y calidad del fruto de cinco variedades de fresa en suelos con ph contrastante. *Terra Latinoamericana*. Vol. 34:2. 177-185.
<https://www.terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/95/95>
- Padayatt, S. J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P. K., Song, J., Koh, W. S., & Levine, M. (2001). Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. 30 p.
- Ponder, A. and Hallmann E. 2020. The nutritional value and vitamin C content of different raspberry cultivars from organic and conventional production. *Journal of Food Composition and Analysis*. 87.103429.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103429>
- Protim, S., Moni, P., Nageshappa, V., Kumar, D., y Kardong, D. (2017). Impact of *pseudomonas aeruginosa* MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of *Samia ricini*. *Journal of soil Science and Plant Nutrition*, 17(2), 499-515.
- Quintero E., Calero A., Pérez Y., Enríquez L. (2018). Efecto de diferentes bioestimulantes en el rendimiento del frijol común. *Revista Centro Agrícola*. Vol.45:3. pp. 73-80
- Rosales Serrano LA, Segura Castruita MA, González Cervantes G, Potisek Talavera MC, Orozco Vidal JA y Preciado Rangel P. (2015). Influence of

fulvic acid on the stability of aggregates and melon root in shadow-house. *Interciencia*, 40:5 pp. 317-323.

- Shahrajabian, MH, Chaski, C., Polyzos, N. y Petropoulos, SA (2021). Aplicación de bioestimulantes: una herramienta de gestión de cultivos de bajos insumos para la agricultura sostenible de hortalizas. *Biomoléculas*, 11 (5), 698. <https://doi.org/10.3390/biom11050698>
- Shah ZH, Rehman HM, Akhtar T, Alsamadany H, Hamooh BT, Mujtaba T, Daur I, Al Zahrani Y, Alzahrani HAS, Ali S, Yang SH and Chung G. (2018). Humic Substances: Determining Potential Molecular Regulatory Processes in Plants. *Front. Plant Sci.* 9:263. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00263>
- Shehata, S. A. Gharib, A. A., Mohamed M. El-Mogy, Abdel Gawad, K. F. and Emad A. Shalaby. (2011). Influence of compost, amino and humic acids on the growth, yield and chemical parameters of strawberries. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(11), pp. 2304-2308
- Schoebitz M, López MD, Serrí H, Martínez O, Zagal E. 2016. Combined application of microbial consortium and humic substances to improve the growth performance of blueberry seedling. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16 (4), 1010-1023
- SIAP. (2020). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Todeschini V., AitLahmidi N., Mazzucco E., Marsano F., Gosetti F., Robotti E., Bona E., Massa N., Bonneau L., Marengo E., Wipf D., Berta G. and Lingua G. (2018). Impact of Beneficial Microorganisms on Strawberry Growth, Fruit Production, Nutritional Quality, and Volatilome. *Front. Plant Sci.* 9:1611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01611>
- Trujano-Fragoso DE, Trinidad-Santos A, López-Romero RM, Velasco-Cruz C, Becerril-Román AE y Cortés-Penagos CJ. (2017). Características

pomológicas, capacidad antioxidante y ácido elágico en frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 40 (3): 261 - 269

- Velasco-Jiménez, A., O. Castellanos-Hernández, G. Acevedo-Hernández, R. C. Aarland y A. Rodríguez-Sahagún. 2020. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana* 38: 333-345. DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>
- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li J., Zou Z. and Cao K. (2020). Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. *Sci Rep* 10, 177. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56954-2>
- Yong JWH, Letham DS, Wong SC, Farquhar GD Rhizobium-induced elevation in xylem cytokinin supply in pigeon peas induces changes in shoot development and leaf physiology. *Plant Biol. Function* 2014; 41:1323–1335. <https://doi.org/10.1071/FP14066>
- Zejak D, Glisic I, Spalevic V, Maskovic P, Dudic B. (2021). Sustainable management of fruit growing in rural areas of Montenegro: the impact of location on the phenological and nutritional properties on raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Agronomy* 11(8):1663. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081663>

CONCLUSIÓN GENERAL

Los bioestimulantes con sustancias húmicas y rizobacterias aplicadas al cultivo de fresa incrementaron variables agronómicas como el número de hojas con Ácidos Húmicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2, el volumen de raíz con Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1, Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2 y Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d2; en variables fisiológicas se incrementó la Tasa de asimilación de CO₂ con Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d1 y con Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1; en variables de producción aumento el peso de fruto con aplicaciones de Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1 y Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1 y el rendimiento con Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1 y d2, Ácidos Fúlvicos y Mezcla de Microorganismos d2; en variables de calidad los SST se incrementaron con Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d1 y la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1, la vitamina C con Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2, Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d2 y con la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum brasiliense* d1. Las sustancias húmicas y rizobacterias favorecieron la absorción de minerales en plantas de fresa, la concentración de N en hoja se incrementó con los Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum* d1, el N en fruto con la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum* d1, el P hoja y fruto se favoreció con Ácidos Fúlvicos y *Pseudomona fluorescens* d1, el K en hoja aumentó con la Mezcla de Húmicos y Fúlvicos + *Azospirillum* d1, el Ca en hoja se favoreció con Ácidos Fúlvicos y Mezcla de Microorganismos d1, el Ca en fruto con Ácidos Húmicos y *Pseudomona fluorescens* d2, el Mg hoja se acrecentó con Ácidos Fúlvicos y *Azospirillum* d1, el Mg en raíz con Ácidos Fúlvicos y *Pseudomona fluorescens* d2, el Fe en fruto se benefició con Ácidos Húmicos y *Pseudomona fluorescens* d2. Los bioestimulantes aplicados al cultivo de frambuesa incrementaron el peso del fruto con los Ácidos Fúlvicos + Mezcla de Microorganismos d2 y los Ácidos Fúlvicos +

Pseudomonas Fluorescens d2; el rendimiento se favoreció con la aplicación de Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2, los SST se favorecieron con los tratamientos Ácidos Fúlvicos + mezcla de microorganismos d1 y por los Ácidos Fúlvicos + *Pseudomonas Fluorescens* d1; la vitamina C se incrementó con Ácidos húmicos + *Pseudomonas Fluorescens* d2 y los Ácidos Fúlvicos + *Azospirillum brasilense* d1. Los bioestimulantes son una alternativa ecológica que ayudan disminuir la contaminación de los suelos y el medio ambiente, favorecen al cultivo de fresa y frambuesa en cuanto a su producción y calidad de fruto.

REFERENCIAS

- Afonso S, Oliveira I, Meyer AS, Gonçalves B. (2022). Biostimulants to improved tree physiology and fruit quality: a review with special focus on sweet cherry. *Agronomy* 12(3):659. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030659>
- Ahmad, T., Khan, R., and Nawaz Khattak, T. (2018). Effect of liquid and foliar fertilizers based on humic acid and fulvic acid on wheat crop yield. *J. Plant Nutr.* 41, 2438–2445. doi: 10.1080/01904167.2018.1527932
- Ampong K, Thilakaranthna MS and Gorim LY. (2022). Understanding the Role of Humic Acids on Crop Performance and Soil Health. *Front. Agron.* 4:848621. doi: 10.3389/fagro.2022.848621
- Álvarez JA., Santoyo G. y Rocha MC. 2020. *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sustentable. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* Vol.16:1. Pp.1-10.
- Ávila, A. y González D. 2012. La competitividad de las fresas (*fragaria spp.*) mexicanas en el mercado nacional, regional y de estados unidos. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*. Vol.9:1, pp 17-27.
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S and Smith DL (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473
- Billingham, KL. (2012). Humic products, potential or presumption for agriculture, can humic products improve my soil, at the 27th Annual Conference (Orange, NSW: Grassland Society of NSW Inc.).
- Calvo P., Nelson L. and Kloepper J. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil.* 383:3–41 <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Cheng Z, Woody OZ, McConkey BJ, Glick BR. (2012). Combined effects of the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and salinity stress on the proteome of *Brassica napus*. *Applied Soil Ecology.* 61:255–263. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.006>
- De Melo, BAG, Motta, FL, and Santana, MHA. (2016). Humic acids: structural properties and multiple functionalities for new technological developments. *Mate. science Eng C* 62, 967–974. doi: 10.1016/j.msec.2015.12.001

- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3–14. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S., and Okon, Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting ability of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x>
- García J. and Sommerfeld M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol* 28, 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214>
- González FJ., Rebollar S., Hernández J., Morales JL., Ramírez O. 2019. Situación actual y perspectivas de la producción de berries en México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, vol. 44, pp. 260-272
- Guo, Yanqing, Zhentao Ma, Baizhao Ren, Bin Zhao, Peng Liu, and Jiwang Zhang. 2022. “Effects of Humic Acid Added to Controlled-Release Fertilizer on Summer Corn Yield, Nitrogen Use Efficiency, and Greenhouse Gas Emission” *Agriculture* 12, no. 4: 448. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040448>
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy*, Vol. 129, pp. 141–174
- Hernaández-Esquivel AA, Castro-Mercado E, Valencia-Cantero E, Alexandre G and García-Pineda E. (2020). Application of *Azospirillum brasilense* Lipopolysaccharides to Promote Early Wheat Plant Growth and Analysis of Related Biochemical Responses. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:579976. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.579976>
- Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. Inoculation of brachiaria spp. with the plant growth-promoting bacterium *azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agr Ecosyst Environ* 2016;(221):125-131.
- Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laine, P., Goux, D., Garnica, M., et al. (2012). Microarray analysis of the effects of humic acid on the growth of *Brassica*

napus: involvement of N, C, and S metabolisms. *Vegetal soil* 359, 297–319. doi: 10.1007/s11104-012-1191-x

Jindo K, Olivares FL, Malcher DJ, Sánchez MA, Kempenaar C, Canellas LP. (2020). From lab to field: Role of humic substances under open-field and greenhouse conditions as biostimulant and biocontrol agent. *Frontiers in Plant Science* 11:426. DOI:10.3389/fpls.2020.00426

Kamou, NN, Karasali, H., Menexes, G., Kasiotis, KM, Bon, MC, Papadakis, EN, Tzelepis, GD, Lotos, L. and Lagopodi, AL. (2015). Isolation detection and characterization of beneficial local rhizobacteria based on in its ability to suppress the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and tomato foot and root rot. *Biocontrol Science and Technology*. 25, 928-949 <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1020762>

Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Ann Microbiol* 69, 873–883 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>

Martínez JI., Gómez M., Gómez MD., Faz A., Martínez S. and Acosta JA. (2018). *Pseudomonas fluorescens* affects nutrient dynamics in plant-soil system for melon production. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 79:2. 224-233.

Monda H, McKenna AM, Fountain R and Lamar RT. (2021) Bioactivity of humic acids extracted from shale ore: molecular characterization and structure-activity relationship with tomato plant yield under nutritional stress. *Front. Plant Sci*. 12:660224. doi: 10.3389/fpls.2021.660224

Molina-Romero D, Juárez-Sánchez S, Venegas B, Ortiz-González CS, Báez A, Morales-García YE and Muñoz-Rojas J. (2021). A bacterial consortium interacts with different varieties of maize, promotes the plant growth, and reduces the application of chemical fertilizer under field conditions. *Front. Sustain. Food Syst*. 4:616757. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.616757>

Nardi, S., Ertani, A., and Francioso, O. (2017). Soil-root crosstalk: the role of humic substances. *J. Plant Nutr. Soil Sciences* 180, 5–13. doi: 10.1002/jpln.201600348

León L., Guzmán D., García JA, Chávez CG y Peña JJ. 2014. Consideraciones para mejorar la competitividad de la región “El Bajío” en la producción nacional de fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (4) p. 673-686

- Oliver C., Hernández I., Caminal M., Lara JM. and Fernández C. 2019. *Pseudomonas putida* strain B2017 produced as technical grade active ingredient controls fungal and bacterial crop diseases, *Biocontrol Science and Technology*. 1-16. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1645304>
- Parra, Y. y Cuevas F. 2002. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura cultivos Tropicales. Vol. 23:3. pp. 31-41.
- Piña J., García V., Herrera H. y Flores JA (2016). Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. como promotoras de crecimiento vegetal. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(7):1613-1623.
- Qin, K. and Leskovar, D. (2020). Humic substances improve vegetable seedling quality and post-transplant yield performance under stress conditions. *Agriculture* 10:10070254. doi:10.3390/agriculture10070254
- Quintero E., Calero A., Pérez Y., Enríquez L. (2018). Efecto de diferentes bioestimulantes en el rendimiento del frijol común. *Revista Centro Agrícola*. Vol.45:3. pp. 73-80
- Shah ZH, Rehman HM, Akhtar T, Alsamadany H, Hamooh BT, Mujtaba T. (2018). Humic substances: determination of potential molecular regulation processes in plants. *Front of. plant science* 9: e00263. doi: 10.3389/fpls.2018.00263
- Sible, CN, Seebauer, JR, and Below, FE. (2021). Plant biostimulants: a categorical review, their implications for row crop production and their relationship to soil health indicators. *Agronomy* 11, 1297. doi: 10.3390/agronomy11071297
- Stevenson, F.J. (1994). *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. New York, NY: John Wiley and Sons.
- Weber, J., Chen, Y., Jamroz, E., and Miano, T. (2018). Preface: humic substances in the environment. *J. Soils Sediments* 18, 2665–2667. doi: 10.1007/s11368-018-2052-x
- Xu, L. and Geelen, D. (2018). Development of biostimulants from agri-food and industrial by-products. *Plant science* 871:1567. doi: 10.3389/fpls.2018.01567
- Zhang Z, Shi W, Ma H, Zhou B, Li H, Lü C. (2020). Binding mechanism between fulvic acid and heavy metals: integrated interpretation of binding experiments, fraction characterizations, and models. *Water air soil pollution*. 231:184. doi: 10.1007/s11270-020-04558-2