



# Inoculante constituido por *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* y *Trichoderma harzianum* incrementa el número de sitios activos para la nodulación de *Pisum sativum*

Inoculant constituted by *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* and *Trichoderma harzianum* increases the number of active sites for nodulation of *Pisum sativum*

David Zavaleta-Verde<sup>1,\*</sup>; Bertha Soriano Bernilla<sup>1</sup>; Marco Antonio López Calvo<sup>2</sup>

1 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

2 Instituto de Educación Superior Tecnológica Mache, Calle Maravillas 321, Mache, Otuzco, La Libertad, Perú

\*Autor corresponsal: [ezverde@unitru.edu.pe](mailto:ezverde@unitru.edu.pe) (D. Zavaleta-Verde).

ID ORCID de los autores

D. Zavaleta-Verde:  <https://orcid.org/0000-0003-0382-8420>

B. Soriano:  <https://orcid.org/0000-0001-9216-7788>

## RESUMEN

Las plantas de *Pisum sativum* para su crecimiento requieren altas concentraciones de nitrógeno, que se obtienen principalmente de la fijación simbiótica con microorganismos. Con el objetivo de evaluar el efecto de un inoculante microbiano multicepa en la nodulación de *P. sativum*, se sembró el cultivar INIA-102 Usui de *P. sativum*, con un inoculante constituido por *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* y *Trichoderma harzianum*, en soporte sólido (turba) y líquido (caldo extracto de levadura manitol - YMB), para lo cual se diseñó cuatro tratamientos. El inoculante favoreció la infectividad del rizobio y la formación de nódulos efectivos, los cuales se distribuyeron principalmente en raíces secundarias, y fue el tratamiento T4 (en soporte sólido) que reportó mayor número de nódulos (148,7 recuentos/planta) y mayor peso seco de los mismos (0,386 g/planta), que el tratamiento T3 (en soporte líquido). Por lo tanto, el inoculante microbiano multicepa en soporte sólido tiene mayor efecto significativo en la nodulación de *Pisum sativum*, ya que pudo haber favorecido la expansión de la longitud y masa del sistema radicular, incrementando de esa manera el número de sitios activos para la nodulación.

**Palabras clave:** nodulación; *Rhizobium*; *Burkholderia*; *Trichoderma*; *Pisum sativum*.

## ABSTRACT

The plants of *Pisum sativum* for growth require high concentrations of nitrogen, which are obtained mainly from the symbiotic with microorganisms. With the objective of evaluating the effect of a microbial inoculant multicepa in nodulation of *P. sativum*, where he sowed the cultivar INIA-102 Usui of *P. sativum*, with an inoculant constituted by *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* and *Trichoderma harzianum*, in solid support (peat) and liquid (Yeast Extract Mannitol Broth - YMB), for which it was designed four treatments. The favored the infectivity of inoculant rhizobia and the formation of nodules troops, which were distributed mainly in secondary roots, and was the treatment T4 (in solid support) that reported the greatest number of nodules (148.7 counts/plant) and greater dry weight of the same (0.386 g/plant), that the treatment T3 (in liquid). Therefore, the microbial inoculant multicepa in solid support has the most significant effect on nodulation of *Pisum sativum*, since it could have contributed to the expansion of the length and mass of the root system, thereby increasing the number of active sites for nodulation.

**Keywords:** nodulation; *Rhizobium*; *Burkholderia*; *Trichoderma*; *Pisum sativum*.

Recibido: 28-02-2020.

Aceptado: 30-03-2020.

## INTRODUCCIÓN

Las leguminosas establecen relaciones simbióticas con los Rhizobios para suplir su incapacidad de asimilar el nitrógeno atmosférico, proceso que si realizan este grupo de  $\alpha$  y  $\beta$ -proteobacterias, a lo que se denomina Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN). La FBN es usada para remplazar los fertilizantes nitrogenados en la producción de leguminosas, debido a su eficiencia económica en la provisión de servicios de agroecosistemas sostenibles (Ouma *et al.*, 2016; Sulieman and Phan Tran, 2015).

*Pisum sativum* es una leguminosa considerada como guisante a nivel mundial, se consume en forma fresca, enlatada y como grano. Tiene una gran capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno con *Rhizobium leguminosarum* (Chao *et al.*, 2017). En la sierra del Perú, la arveja más cultivada es el cultivar INIA-102 Usui, liberada por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Tiene buena adaptación a diferentes condiciones agroecológicas, buen potencial de rendimiento, tolerancia a enfermedades. Se cultiva en los Departamentos de Cajamarca, La Libertad y Junín (Ministerio de Agricultura, 2016).

Los inoculantes comerciales son formulaciones desarrolladas para favorecer el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos dentro del inoculante, así como también la supervivencia durante su aplicación, particularmente en la semilla (Lesueur *et al.*, 2016). Estos inoculantes pueden ser monocepa o multicepa, de acuerdo al número de especies microbianas que lo constituyen; y generalmente se envasan en forma de polvo, granular o líquido, siendo la turba el soporte preferido para crecimiento y supervivencia de rizobios (Albareda *et al.*, 2008).

En muchos inoculantes se ha incluido a *Burkholderia ubonensis*, miembro del complejo

*Burkholderia cepacia* (Bcc), un grupo genéticamente relacionado con especies ambientales metabólicamente diversas, altamente adaptables y ampliamente dispersas (De Smet *et al.*, 2015), ha sido aislada de la rizosfera de diversos cultivos en donde cumple el rol de Promotor del Crecimiento Vegetal (PCV) ya que produce fitohormonas, fija nitrógeno atmosférico y solubiliza fosfatos.

Otro microorganismo considerado PCV es el hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* por sus mecanismos de controlador biológico como micoparasitismo, antibiosis o competencia (Carrero *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2017). Es también ampliamente estudiado su capacidad de inducir las defensas de los vegetales (Yedia *et al.*, 1999) y estimular el crecimiento y desarrollo estableciendo un diálogo molecular con las raíces (Mendoza *et al.*, 2018). Se han informado interacciones beneficiosas mutuales entre *Trichoderma* spp. y *P. sativum* (Contreras *et al.*, 2009; Samolski *et al.*, 2012).

La producción de leguminosas utilizando inoculantes microbianos tiene muchos beneficios, como disminuir los costos de producción y con ello se más asequible para los pequeños agricultores de escasos recursos (Singh *et al.*, 2016), también podría ser un factor importante cuando la planta se introduce en un nuevo agroecosistema (Klock *et al.*, 2015; La Pierre *et al.*, 2017). La inducción de los Rhizobios a la formación de nódulos es beneficioso para la planta ya que según Koskey *et al.* (2017), existe relación entre el número de nódulos y el incremento de la FBN.

Por lo mencionado anteriormente, este estudio estuvo orientado a evaluar el efecto de un inoculante microbiano multicepa en la nodulación de *P. sativum* cultivada en Mache, La Libertad, Perú.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó un inoculante microbiano multicepa conformado por las bacterias *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia ubonensis* y el hongo *Trichoderma harzianum*. Además de semillas certificadas de *Pisum sativum* cultivar INIA-102 Usui.

### Métodos

Reactivación de los microorganismos

En la reactivación de la cepa rizobiana, se tomó como referencia la metodología sugerida por Somasegaran y Hoben, (1994). Se cultivó *Rhizobium leguminosarum* mediante estrías paralelas en placas de Petri con agar extracto de levadura manitol (YMA) con rojo de congo, y se incubó a 28°C por 3 días, luego una colonia aislada se conservó en medio inclinado YMA a 4°C hasta su posterior uso. Para la reactivación de *Burkholderia ubonensis*, se siguió la metodología sugerida en el manual de Bergey's (Brenner, 2005), se cultivó en agar soya tripticasa (TSA) por 3 días a 30°C. *Trichoderma harzianum* fue reactivado en agar

papa dextrosa (APD), en ausencia de luz, a temperatura ambiente por 7 días.

Preparación de inoculante microbiano multicepa  
Se preparó dos tipos de soportes, uno sólido elaborado con turba fina estéril, estandarizada a pH 6,8 con carbonato de calcio al 3% (CaCO<sub>3</sub>) y otro líquido con caldo extracto de levadura manitol (YMB), según Somasegaran y Hoben, (1994). Cada microorganismo reactivado fue inoculado en los soportes asegurando una concentración final de 10<sup>8</sup> cel/g o mL, respectivamente. En el caso del inoculante sólido se dejó madurar a temperatura aproximada de 20 °C por 7 días.

Acondicionamiento de terreno de cultivo

Un terreno de cultivo de 420 m<sup>2</sup> fue preparado teniendo en cuenta las técnicas agronómicas, considerándose también, antes de la siembra, su humedad y capacidad de campo (Somasegaran y Hoben, 1994). Se habilitó unidades experimentales de 20m<sup>2</sup> para cada tratamiento en estudio (Tabla

1), considerando 0,75 m de distancia entre surcos y 0,5 m de separación entre tratamientos.

**Tabla 1**

Descripción de los tratamientos usados en la experimentación

Tratamientos (T)	Descripción
T1	Control negativo*
T2	Control positivo**
T3	Inoculante en soporte sólido
T4	Inoculante en soporte líquido

Nota: \* Sin inocular; \*\* Recibió fertilización con N, P y K inorgánicos.

Siembra de *Pisum sativum* e inoculación

Se mezcló 100 g de semillas con 3 mL de una solución azucarada estéril, luego se agregó 10 g o 10 mL del inoculante sólido o líquido respectivamente, se homogenizó con movimientos suaves, hasta asegurar la distribución uniforme del inoculante. Se sembró tres semillas por golpe con una separación de 0,3 m, evitando en todo momento la contaminación cruzada, las herramientas como palanas u otros, fueron desinfectadas con alcohol de 70° en cada tratamiento. Se sembró en las primeras horas del día evitando la exposición del inoculante a la luz solar directa.

El manejo agronómico de la leguminosa se realizó

según la metodología propuesta por el Instituto de Innovación Agraria INIA, con riegos en promedio de 3500 a 4000 m<sup>3</sup>/ha según las necesidades del cultivo y la disponibilidad de agua; el deshierbo fue manual, y para el control de plagas se usó control entomológico (trampas amarillas y trampas negras).

Evaluación de la nodulación

Se realizó a los 45 días de la siembra, en la etapa de prefloración, se determinó aspectos cualitativos y cuantitativos. Se extrajo al azar 3 plantas de cada unidad experimental, a las cuales se evaluó distribución, coloración, número y peso seco de los nódulos.

Análisis de datos

Todos los tratamientos fueron distribuidos en un diseño de bloques completo al azar, con cuatro repeticiones.

La diferencia de medias entre los resultados obtenidos fue analizada mediante la prueba t-student al 95% de confianza. Además, para evaluar la igualdad de varianzas entre los resultados se utilizó la prueba de Levene ( $p = 0,05$ ). También se evaluó que los resultados tengan una distribución normal, mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $p = 0,05$ ). Se utilizó el software RStudio-1.2.5033.

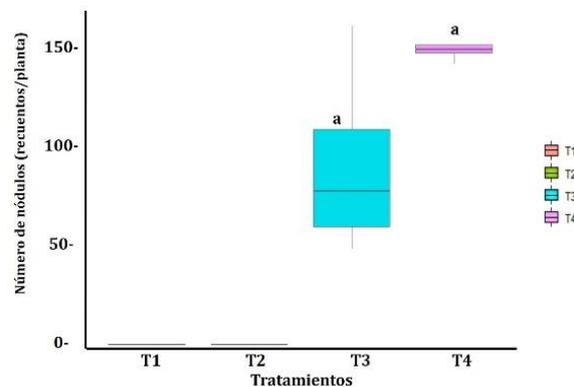
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de un inoculante microbiano multicepa tuvo un efecto significativo en *Pisum sativum*, se observó sistemas radiculares con nódulos distribuidos principalmente en raíces secundarias, considerado un parámetro muy importante para evaluar el rendimiento de plantas (Boudjabi et al., 2017; Panasiewicz et al., 2019), estos nódulos resultaron ser infectivos y efectivos por la coloración rojiza interna, debido a la leghemoglobina activa que protege la dinitrogenasa del rizobio (Khan et al., 2014; Farid y Navabi, 2015).

Por otro lado, la disponibilidad de fósforo (P) en suelo, contribuyó a la formación de nódulos, como lo demuestran Bello et al. (2018) quienes encontraron que la nodulación de caupí por rizobios aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) por el uso de superfosfato simple (SSP). El inoculante microbiano multicepa estuvo constituido además por *Burkholderia ubonensis*, bacteria ampliamente estudiada por su capacidad de solubilizar el fósforo inorgánico en suelo y hacerlo disponible para la asimilación por las plantas, entonces también esta bacteria influyó indirectamente en la formación de nódulos.

En cuanto al número de nódulos (Figura 1), si bien es cierto no existió diferencia significativa ( $p = 0,059 > 0,05$ ) entre las medias de los tratamientos T3 y T4, se observó que T4 presentó el mayor número de nódulos promedio (148,7 recuentos/planta), así mismo presentó un menor coeficiente de variación ( $CV\% = 4,702\%$ ), indicando un comportamiento muy homogéneo. Si bien se tiene en cuenta que a mayores células

bacterianas por gramo de suelo será mayor el número de nódulos en el sistema radicular, entonces este tipo de soporte favorece la viabilidad de los microorganismos.



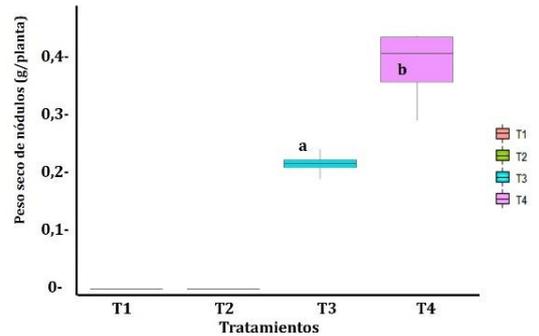
**Figura 1.** Número de nódulos promedio en plantas de *Pisum sativum* según los tratamientos experimentales. T1 control negativo, T2 control positivo, T3 inoculante en soporte sólido y T4 inoculante en soporte líquido.

Nota: Prueba t-student ( $p = 0,059 > 0,05$ ); Levene ( $p = 0,083 > 0,05$ ) y Shapiro-Wilk en los tratamientos T3 y T4 ( $p = 0,4378$  y  $p = 0,5955$ , respectivamente).

El peso seco de los nódulos refleja una fijación simbiótica de nitrógeno más eficiente que podría resultar en un aumento de la biomasa de la planta (Kawaka et al., 2014; Delić et al. 2010), también Unkovich et al. (2010) informaron de una fuerte correlación positiva entre la biomasa de guisantes y el peso seco de nódulos al ser inoculados con

rizobios. La Figura 2 nos muestra que el valor p de significancia de la prueba de hipótesis de la diferencia de medias t-student, es menor que 0,05 ( $p = 0,003 < 0,05$ ), evidenciando que existió diferencia significativa entre los tratamientos T3 y T4, siendo el tratamiento 4, quién presentó el mayor peso de nódulos promedio (0,386 g/planta), lo que implicaría ser más eficiente en la fijación simbiótica del nitrógeno, esto debido a que hay una relación directa entre el número de nódulos y el peso seco de los mismos.

Esta experimentación ha demostrado la infectividad y efectividad de *Rhizobium leguminosarum* como simbiote de *P. sativum*, y que *Burkholderia ubonensis* y el hongo *Trichoderma harzianum* contribuyen eficazmente a la fijación biológica del nitrógeno, siendo los tres microorganismos muy importantes en la formulación de inoculantes para leguminosas.



**Figura 2.** Peso seco de nódulos promedio en plantas de *P. sativum* según los tratamientos experimentales. T1 control negativo, T2 control positivo, T3 inoculante en soporte sólido y T4 inoculante en soporte líquido.

Nota: Prueba t-student ( $p = 0,003 < 0,05$ ); Levene ( $p = 0,107 > 0,05$ ) y Shapiro-Wilk en los tratamientos T3 y T4 ( $p = 0,7321$  y  $p = 0,2456$ , respectivamente).

## CONCLUSIONES

El inoculante microbiano multicepa en soporte sólido promovió significativamente el aumento del número y peso seco de los nódulos de *P. sativum*,

debido a que favoreció la expansión de la longitud y masa de la raíz, por lo tanto, un mayor número de sitios activos para la nodulación.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Educación Superior Tecnológica Mache, Otuzco, La Libertad, por el apoyo en el manejo agronómico de cultivo de *P. sativum*. A la Estación Experimental Agraria Donoso – Huaral, Lima, por proporcionar la semilla certificada de *P. sativum* cultivar INIA-102 Usui. Al Laboratorio de Micología de la Universidad Nacional de Trujillo,

por proporcionar el cultivo de *Trichoderma harzianum*. Al Laboratorio de rizobiología de la Universidad Nacional de Cajamarca por el cultivo de *R. leguminosarum*. Al laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de San Martín Tarapoto por la cepa de *Burkholderia ubonensis*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D.; Camacho, M.; Temprano, F. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biol Biochem* 40(11): 2771–2779.
- Bello, S., Yusuf, A.; Cargele, M. 2018. Performance of cowpea as influenced by native strain of rhizobia, lime and phosphorus in Samaru, Nigeria. *Symbiosis* 75: 167–176.
- Boudjabi, S.; Kribaa, M.; Chenchouni, H. 2017. Sewage sludge fertilization alleviates drought stress and improves physiological adaptation and yield performances in durum wheat (*Triticum durum*): a double-edged sword. *Journal King Saud Univ. Sci.* 12: 1–9.
- Brenner, D.; Krieg, N.; Staley, J.; Garrity, G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da Edition, vol. 2 (The Proteobacteria), parte C (The Alpha-, Beta-, Delta- y Epsilonproteobacteria). Editorial Springer. Nueva York. 875 pp.
- Carrero-Carrón, I.; Rubio, M.; Niño-Sánchez, J.; Navas-Cortés, J.; Jiménez-Díaz, R.; Monte, E.; Hermosa, R. 2018. Interactions between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahlia* in resistant and susceptible wild olive clones. *Plant Pathol* 67: 1758–1767.
- Chao, Y.; Bueckert, R.; Schoenau, J.; Diederichsen, A.; Zakeri, H.; Warkentin, T. 2017. Simbiosis de *Rhizobium leguminosarum* bv. cepas viciae con diversos genotipos de guisantes: efectos sobre la fijación biológica de nitrógeno. *Canadian Journal of Microbiology* 63: 909-919.
- Contreras-Cornejo, H.; Macías-Rodríguez, A.; Cortés-Penagos, L.; López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances bio-mass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 149: 1579–1592.
- De Smet, B.; Mayo, M.; Peeters, C.; Zlosnik, JE.; Spilker, T.; Hird, TJ.; et al. 2015. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. y *Burkholderia territorii* sp. nov., dos nuevas especies complejas de *Burkholderia cepacia* de fuentes ambientales y humanas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(7): 2265–2271.
- Delić, D.; Stajković, O.; Rasulić, N.; Kuzmanović, D.; Jošić, D.; Milić, B. 2010. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation effectiveness of *Bradyrhizobium* strains in symbiosis with adzuki bean, *Vigna angularis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 293–299.
- Farid, M.; Navabi, A. 2015. N<sub>2</sub> fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 95: 1243–1257.
- Kawaka, F.; Dida, M.; Opala, P.; Ombori, O.; Maingi, J.; Osoro, N.; Muthini, M.; Amoding, A.; Mukaminega, D.; Muoma, J. 2014. Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Kenya. *Int. Sch. Res. Notices* 2014: 1–8.
- Khan, N.; Tariq, M.; Ullah, K.; Muhammad, D.; Khan, I.; Rahatullah, K.; Ahmed, N.; Ahmed, S. 2014. The effect of molybdenum and iron on nodulation, nitrogen fixation, and yield of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). *IOSR J. Agric. Vet. Sci.* 7: 63–79.
- Klock, M.; Barrett, L.; Thrall, P.; Harms, K. 2015. La promiscuidad del huésped en las asociaciones de simbioses puede influir en el establecimiento de leguminosas exóticas y la colonización de nuevos rangos. *Diversity and Distributions* 21: 1193–1203.
- Koskey, G.; Mburu, S.; Njeru, E.; Kimiti, J.; Ombori, O.; Maingi, J. 2017. Potential of native rhizobia in enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of Eastern Kenya. *Front. Plant Sci.* 8: 1–12.

- La Pierre, K.; Simms, E.; Tariq, M.; Zafar, M.; Porter, S. 2017. Las legumbres invasoras pueden asociarse con muchos mutualistas de legumbres nativas, pero generalmente no lo hacen. *Ecol. Evol.* 7: 8599–8611.
- Lesueur, D.; Deaker, R.; Herrmann, L.; Bräu, L.; Jansa, J. 2016. The production and potential of biofertilizers to improve crop yields. In: Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds) *Bioformulations: for sustainable agriculture*. Editorial Springer. New Delhi. 71–92 pp.
- Medeiros, H.; Vieira de Araújo, J.; Grassi de Freitas, L.; Castillo, P.; Rubio, M.; Hermosa, R.; Monte, E. 2017. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Sci. Rep.* 7: 40216.
- Mendoza-Mendoza, A.; Zaid, R.; Lawry, R.; Hermosa, R.; Monte, E.; Horwitz, B.; Mukherjee, P. 2018. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biol. Rev.* 32: 62–85.
- Ministerio de Agricultura y Riego. 2016. *Leguminosas de grano: Semillas nutritivas para un futuro sostenible*. Perú. Disponible en: <https://clck.ru/N36jn>
- Ouma, E.; Asango, A.; Maingi, J.; Njeru, E. 2016. Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. *Int. J. Agron* 2016: 1–7.
- Panasiewicz, K.; Niewiadomska, A.; Sulewska, H.; Wolna-Maruska, A.; Borowiak, K.; Budka, A.; Ratajczak, K. 2019. The effect of sewage sludge and BAF inoculant on plant condition and yield as well as biochemical and microbial activity of soil in willow (*Salix viminalis* L.) culture as an energy crop. *J. Peer* 7: 1–23.
- Samolski, I.; Rincón, A.; Pinzón, L.; Viterbo, A.; Monte, E. 2012. The *quid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158: 129–138.
- Somasegaran, P.; Hoben, H. 1994. *Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology*. 1era Edición. Editorial Springer-Verlag New York, Inc. New York. 58-64 pp.
- Singh, J.; Koushal, S.; Kumar, A.; Vimal, S.; Gupta, V. 2016. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, Vol. II: functional application. *Journal Frontiers in Microbiology* 7: 2105.
- Suliman, S.; Tran, L. 2015. *Fijación de nitrógeno en leguminosas en un entorno cambiante*. 1era Edición. Editorial Springer International Publishing. Suiza. 5-33 pp.
- Unkovich, M.; Baldock, J.; Peoples, M. 2010. Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N<sub>2</sub> fixation by crop and pasture legumes. *Plant Soil* 329: 75–89.
- Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061–1070.