



## Efecto de la co-inoculación de *Burkholderia ubonensis* y *Rhizobium* spp. en la nodulación de *Pisum sativum*

### Effect of the co-inoculation of *Burkholderia ubonensis* and *Rhizobium* spp. in the nodulation of *Pisum sativum*

Gardenia Prado Chávarri<sup>1,\*</sup>; Bertha Soriano Bernilla<sup>2</sup>; David Zavaleta-Verde<sup>2</sup>

1 Universidad César Vallejo, Av. Larco 1770, Trujillo, Perú.

2 Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

\*Autor correspondiente: [pchavarrig@ucvvirtual.edu.pe](mailto:pchavarrig@ucvvirtual.edu.pe) (G. Prado Chávarri).

ID ORCID de los autores

G. Prado Chávarri:  <https://orcid.org/0000-0002-2089-3200>

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

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

---

#### RESUMEN

Las leguminosas tienen alto valor nutricional como fuente de proteínas y aminoácidos, además tienen la capacidad de restaurar o mantener la fertilidad de los suelos, siendo de vital importancia para ello, la asociación con su respectiva microbiota. *Pisum sativum* establece relaciones con bacterias consideradas promotoras del crecimiento vegetal, como es el caso de *Burkholderia ubonensis*, así también con proteobacterias del grupo de los rizobios para fijar el nitrógeno atmosférico. Con el objetivo de evaluar el efecto de la co-inoculación de *B. ubonensis* y *Rhizobium* spp. en la nodulación de *P. sativum* se diseñó un experimento con seis tratamientos distribuidos en bloques completamente randomizados. El tratamiento (T3) que mostró mayor número de nódulos radiculares de *P. sativum* fue cuando se inoculó solo *Rhizobium* spp., sin embargo, cuando se le co-inoculó con *B. ubonensis* (T6) disminuyó; un resultado distinto se obtuvo cuando se evaluó la masa seca de los nódulos, en ese caso la co-inoculación de *Rhizobium* spp. con *B. ubonensis* incrementó significativamente esta variable. Por lo tanto, se concluyó que la co-inoculación, de *B. ubonensis* y *Rhizobium* spp. no incrementa el número de nódulos de *P. sativum*, pero sí incrementa la masa seca de los mismos.

**Palabras clave:** Nodulación; *Rhizobium*; *Burkholderia*; *P. sativum*.

#### ABSTRACT

Legumes have high nutritional value as a source of proteins and amino acids, they also can restore or maintain soil fertility, being of vital importance for this, the association with their respective microbiota. *Pisum sativum* establishes relationships with bacteria considered to promote plant growth, such as *Burkholderia ubonensis*, as well as with proteobacteria from the rhizobia group to fix atmospheric nitrogen. In order to evaluate the effect of the co-inoculation of *B. ubonensis* and *Rhizobium* spp. in the nodulation of *P. sativum*, an experiment was designed with six treatments distributed in completely randomized blocks. The treatment (T3) that showed the highest number of root nodules of *P. sativum* was when only *Rhizobium* spp. was inoculated, however, when it was co-inoculated with *B. ubonensis* (T6) it decreased; a different result was obtained when the dry mass of the nodules was evaluated, in this case the co-inoculation of *Rhizobium* spp. with *B. ubonensis* significantly increased this variable. Therefore, it concludes that the co-inoculation of *B. ubonensis* and *Rhizobium* spp. not improve the number of *P. sativum* nodules, but it does have an effect on the dry mass of the nodules.

**Keywords:** Nodulation; *Rhizobium*; *Burkholderia*; *Pisum sativum*.

---

Recibido: 07-10-2020.

Aceptado: 28-11-2020.

## INTRODUCCIÓN

La sostenibilidad en los modelos agrícolas es de vital importancia para la seguridad alimentaria futura, y son los mercados de proteínas derivados de plantas, los que están reemplazando al de proteínas de origen animal. *Pisum sativum*, ubicada dentro de la Familia Fabacea, tiene altos porcentajes de proteínas (20 a 30%), siendo la lisina la más importante (Peng et al., 2016). Esta leguminosa, cultivada en todo el mundo, aporta significativamente a la agricultura sostenible al tener un ciclo de vida corto y requerir bajas cantidades de agua para su cultivo; además, es muy valorado su aporte de nitrógeno orgánico al suelo a través de la fijación biológica del nitrógeno en asociaciones con bacterias (Do Carmo et al., 2016; Xiong et al., 2018; Pietrysiak et al., 2018).

Las leguminosas están involucradas en asociaciones simbióticas con un grupo heterogéneo de bacterias rizobianas (Leppyanen et al., 2019), ubicadas dentro de las proteobacterias  $\alpha$  y  $\beta$ ; siendo su principal fuente de aislamiento los nódulos radiculares. Estas bacterias tienen un rango de hospedero muy estrecho y forman nódulos con plantas bien definidas; son diversos los estudios que confirman que el simbionte de *P. sativum* es *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae, un bacilo aeróbico, móvil, no formador de esporas y perteneciente al grupo de los  $\alpha$ -rizobios (Kumar et al., 2015; Leppyanen et al., 2019; Bourion et al., 2018; Mazur et al., 2015; Reeve et al., 2015).

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa está fuertemente controlada por fitohormonas las cuales permitirán el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno (Serova et al., 2019) y mecanismos de regulación genética. El reconocimiento de los flavonoides producidos por el hospedero y los factores Nod del simbionte, facilitados por los lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS),  $\beta$ -glucanos cíclicos periplásmicos, conduce a la expresión de genes vegetales y diferenciación celular (Zgadzaj et al., 2015), que dan lugar a la formación de bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidea;

estos forman simbiosomas, estructuras en forma de orgánulos en las que los bacteroides fijan nitrógeno (Tsyganova et al., 2018; Tsyganova y Tsyganov, 2017; Kawaharada et al., 2015).

Las leguminosas, además del nitrógeno que le pueden proporcionar los rizobios, necesitan otros macro, micronutrientes y fitohormonas que les pueden proporcionar las bacterias endofíticas y rizosféricas con capacidad para afectar la promoción del crecimiento de las plantas (PGPR, de sus siglas en inglés) (Orrell y Bennett, 2013), estas actúan a través de mecanismos directos e indirectos, siendo la solubilización de fósforo un mecanismo muy valorado en estas bacterias. Especie del género *Burkholderia* son descritas como PGPR (Bernabeu et al., 2015), aunque aún son pocos los estudios, estas especies han sido evaluadas por su capacidad de solubilizar el fósforo (Pande et al., 2017; Ranjan et al., 2016), como es el caso de *B. ubonensis*, una beta proteobacteria, aerobia, aislada a partir de muestras de suelo (Estrada-de et al., 2016).

La perspectiva de manipular las poblaciones microbianas de la rizosfera, por la inoculación de bacterias beneficiosas, como *Rhizobium* y *Burkholderia*, para aumentar la nodulación y el crecimiento vegetal ha mostrado una promesa considerable en el laboratorio, estudios de invernadero y campo, los cuales proporcionarían resultados significativos para disminuir o anular el empleo de fertilizantes químicos en la agricultura evidenciando un manejo agrícola sostenible.

En este sentido, es fundamental el progreso constante y exigente de investigaciones que aporten al conocimiento de interacciones biológicas que ocurren en la rizosfera de la planta, para la formulación de inoculantes microbianos con fiabilidad de su aplicación en campo asegurando su desarrollo comercial, por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la co-inoculación de *B. ubonensis* y *Rhizobium* spp. en la nodulación de *P. sativum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Un cultivo puro de *Rhizobium* spp. de la colecta nacional de rizobios perteneciente al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Una cepa de *Burkholderia ubonensis* con características de PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Una cepa control positivo de *Rhizobium leguminosarum*, aislada de *P. sativum* de la Región Cajamarca del Perú, probada en campo su alta eficiencia en la fijación de nitrógeno.

Además de semillas certificadas de *Pisum sativum* cultivar INIA-102 Usui.

### Métodos

#### Reactivación de los microorganismos

Se utilizó la metodología de Somasegaran y Hoben (1994) para la reactivación de *Rhizobium* spp. y *Rhizobium leguminosarum*. Se utilizó el medio agar extracto de levadura manitol (YMA) con rojo de congo, y 28 °C como temperatura de incubación. La cepa de *Burkholderia ubonensis* fue reactivada en agar soya triptica (TSA) a 30 °C, según lo sugerido en el manual de Bergey's (Brenner, 2005).

#### Inoculación de las bacterias en turba

Se preparó una suspensión estandarizada (en fase exponencial) de cada bacteria reactivada; luego se inoculó utilizando un soporte orgánico estéril, a

base de turba, asegurando una concentración final de  $10^8$  cel.g<sup>-1</sup> de turba. Finalmente se dejó madurar por 7 días a temperatura aproximada de 20 °C.

### Condiciones de campo

Mediante técnicas agronómicas descritas por Somasegaran et al. (1994), se preparó un terreno de cultivo de 127,5 m<sup>2</sup>, en el cual se habilitó unidades experimentales de 20 m<sup>2</sup> para cada tratamiento experimental, se consideró surcos separados a 0,75 m y calles de 0,5 m.

**Tabla 1**

Tratamientos utilizados en la experimentación

Tratamiento (T)	R. <i>leguminosarum</i> **	<i>Rhizobium</i> spp.	B. <i>ubonensis</i>
T1	-	-	-
T2	X	-	-
T3	-	X	-
T4	-	-	X
T5	X	-	X
T6	-	X	X

\* tratamiento control negativo. \*\* Cepa bacteriana altamente eficiente en la fijación de nitrógeno usada como control positivo.

### Inoculación y siembra de *Pisum sativum*

Cuando el terreno estuvo en capacidad de campo, se realizó la siembra, para ello se inoculó 10 g de turba madura conteniendo la bacteria respectiva, en 100 g de semillas previamente embebidas con 3 mL de una solución azucarada estéril, luego se homogenizó con movimientos suaves, hasta

asegurar la distribución uniforme en todas las semillas.

Se sembraron tres semillas por golpe, con una separación de 0,3 m, evitando en todo momento la contaminación cruzada por el mal uso de herramientas como palanas u otros.

El manejo agronómico de la leguminosa se realizó según lo propuesto por el Instituto de Innovación Agraria de Perú, con riegos en promedio de 3500 a 4000 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>, 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

A los 45 días de la siembra, cultivo estuvo en prefloración, se evaluó el tipo, distribución, número y masa seca de los nódulos. Para ello, de cada tratamiento, se extrajo al azar el sistema radicular completo de 3 plantas. Para determinar el peso de la masa seca de los nódulos, estos se colocaron en una estufa a 25 °C hasta la obtención de un peso constante.

### Análisis de datos

Se verificó que los resultados de número y masa seca de nódulos tengan una distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk ( $p=0,05$ ), luego se evaluó la igualdad de varianzas mediante la prueba de Welch ( $p=0,05$ ) y se determinó el mejor tratamiento con la prueba post hoc de Games-Howell. Se utilizó el software RStudio-1.2.5033.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

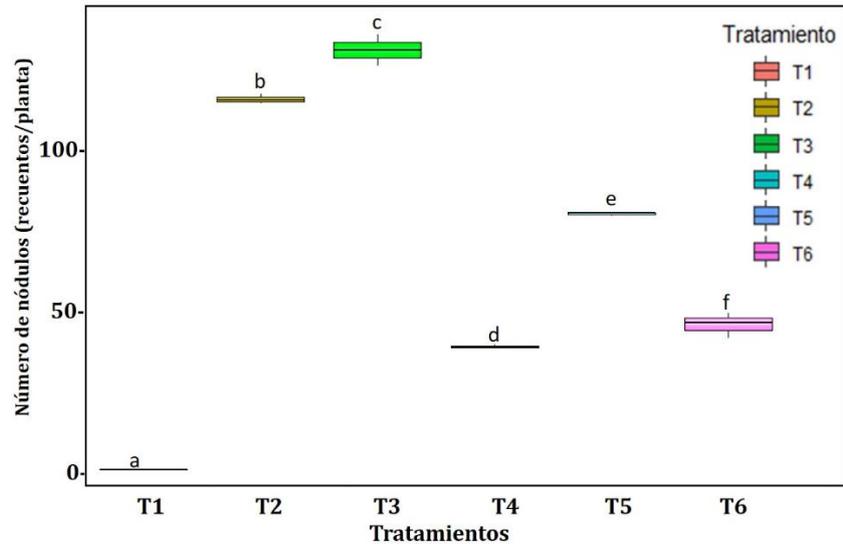
Las interacciones biológicas que ocurren en la rizosfera de las plantas aportan al conocimiento científico y son una oportunidad para mejorar las propiedades biológicas de los suelos. La co-inoculación de *Rhizobium* spp. y *Burkholderia ubonensis* tuvo un efecto significativo sobre la masa seca de los nódulos de *Pisum sativum*, los cuales se encontraron distribuidos principalmente en raíces secundarias, que según Panasiewicz et al. (2019) esta característica está relacionada directamente con la eficiencia en la fijación biológica del nitrógeno y que se traduce en el aumento de rendimiento de la leguminosa.

Bisseling et al. (1978) mencionaron que existe una relación cuantitativa entre el contenido de leghemoglobina y la capacidad de fijación de nitrógeno del nódulo, y que los agroquímicos como los nitratos disminuyen la cantidad de leghemoglobina. Los nódulos evaluados resultaron ser efectivos por la coloración rojiza interna, debido a la leghemoglobina activa que protege a la dinitrogenasa del rizobio (Farid y Navabi, 2015), confirmando la reducción del nitrógeno atmosférico a nitrógeno que fue asimilado por *P. sativum*.

La Figura 1, muestra el recuento promedio de nódulos por planta de *P. sativum*, nótese que en

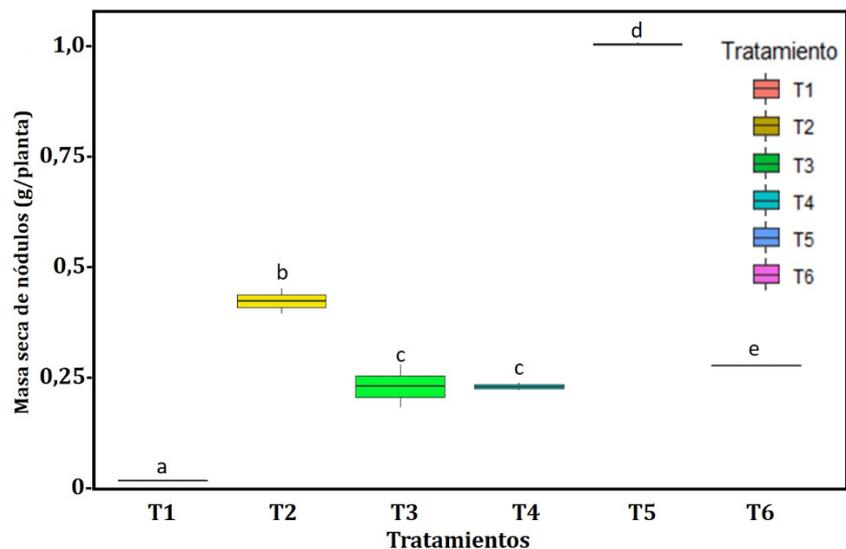
comparación con el tratamiento T1 (control negativo), la co-inoculación de *Rhizobium* spp. y *Burkholderia ubonensis* (T6) incrementó considerablemente esta variable. Sin embargo, al compararlo con el control positivo (T2) en el que se inoculó, su simbionte específico (*R. leguminosarum*), el valor fue menor; esta tendencia también se evidenció al co-inocular *R. leguminosarum* con *B. ubonensis* (T5), el cual también presentó mayor número de nódulos.

La inoculación de *Rhizobium* spp. (T3) permitió obtener el mayor número de nódulos, seguido del tratamiento T2 (*R. leguminosarum*, control positivo), esto se debe a la alta especificidad con la leguminosa hospedera, que conlleva al incremento del número de sitios activos para nodular en presencia del microsimbionte específico (Paul et al., 2019). También los resultados permiten inferir que la co-inoculación con *B. ubonensis* disminuye la formación de nódulos, se explica esto, porque esta bacteria, considerada como PGPR, suministra directamente fitohormonas, como auxinas, giberlinas, ácido 3-indol acético, además de micronutrientes como el fósforo que son suficientes para el buen desarrollo de la planta, disminuyendo la necesidad de incrementar el número de nódulos.



**Figura 1.** Número de nódulos de *Pisum sativum* co-inoculada con *B. ubonensis* y *Rhizobium* spp. según los tratamientos usados. T1: Control negativo, T2: *R. leguminosarum*, T3: *Rhizobium* spp., T4: *B. ubonensis*, T5: *R. leguminosarum* y *B. ubonensis*, T6: *Rhizobium* spp. y *B. ubonensis*.

Nota: Prueba de análisis de Varianza de Welch ( $p=7,30e^{-8} < 0,05$ ), y tratamientos con letras diferentes existe diferencia significativa según prueba post hoc de Games-Howell.



**Figura 2.** Masa seca de nódulos de *Pisum sativum* co-inoculada con *B. ubonensis* y *Rhizobium* spp., según los tratamientos utilizados. T1: Control negativo, T2: *R. leguminosarum*, T3: *Rhizobium* spp., T4: *B. ubonensis*, T5: *R. leguminosarum* y *B. ubonensis*, T6: *Rhizobium* spp. y *B. ubonensis*.

Nota: Prueba de análisis de Varianza de Welch ( $p=6,25e^{-9} < 0,05$ ), y tratamientos con letras diferentes existe diferencia significativa según prueba post hoc de Games-Howell.

La masa seca de los nódulos radiculares de *P. sativum* es el parámetro que mayor relación tiene con la fijación de nitrógeno (Kawaka et al., 2014) y no necesariamente está relacionada con el número de nódulos. El tratamiento T6, en donde se co-inoculó ambas bacterias, obtuvo mayor masa seca de los nódulos que cuando se inocularon por separado (T3 y T4), que, a su vez entre estos no existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Bello et al. (2018) mencionaron que la disponibilidad de fósforo en suelo, contribuye al aumento de la masa de los nódulos, esto se justifica debido a que *Burkholderia ubonensis* es una bacteria ampliamente estudiada por su capacidad de

solubilizar el fósforo inorgánico en suelo y hacerlo disponible para la asimilación por *P. sativum*.

El control positivo, al ser inoculado individualmente (T2) o con *B. ubonensis* (T5), presentaron los valores más altos, demostrando que la especificidad no solo implica el aumento de los sitios de nodulación, sino en incrementar la promoción del desarrollo de la masa de los nódulos. Además, *R. leguminosarum* es una cepa nativa de la Región Cajamarca del Perú, adaptada a factores ambientales propios de las zonas altoandinas, condiciones en las cuales se desarrolló la investigación.

## CONCLUSIONES

La co-inoculación, de *Burkholderia ubonensis* y *Rhizobium* spp. no afecta significativamente el incremento del número de nódulos de *Pisum sativum*, mayor número se observó cuando se

inoculó por separado *Rhizobium* spp. Sin embargo, el efecto sobre la masa seca de los nódulos se vio favorecida cuando se coinoculó con *B. ubonensis*.

## AGRADECIMIENTOS

A las instituciones educativas, Universidad Nacional de Trujillo (laboratorios de Micología y Microbiología Ambiental), Universidad Nacional de Cajamarca (laboratorio de rizobiología) y Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto (laboratorio de suelos); a la Estación Experimental

Agraria Donoso – Huaral, Lima, todas ellas por proporcionar el material biológico usado en la experimentación. Además, al Instituto Superior Tecnológico de Mache, Otuzco, La Libertad, por el apoyo en el manejo agronómico de *Pisum sativum*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Bernabeu, P.; Pistorio, M.; Torres-Tejerizo, G.; *et al.* 2015. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Sci. Hort.* 191: 113-120.
- Bisseling, T.; Van Den Bos, R.; Van Kammen, A. 1978. The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 539(1): 1-11.
- Bourion, V.; Heulin-Gotty, K.; Aubert, V.; *et al.* 2018. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction, *Frontiers in Plant Science* 8: 2249.
- Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; *et al.* 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, vol. 2 (The Proteobacteria), parte C (The Alpha, Beta, Delta y Epsilon proteobacteria), Springer, Nueva York.
- Do Carmo, C.S.; Nunes, A.; Silva, I.; *et al.* 2016. Formulation of pea protein for increased satiety and improved foaming properties. *RSC Adv* 6: 6048-6057.
- Estrada, P.; Rojas-Rojas, F.U.; Tapia-García, E.Y.; *et al.* 2016. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Ann Microbiol* 66: 1303-1314.
- Farid, M.; Navabi, A. 2015. N<sub>2</sub> fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 95: 1243-1257.
- Kawaharada, Y.; Kelly, S.; Nielsen, M.W.; *et al.* 2015. Receptor mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523: 308-315.
- Kawaka, F.; Dida, M.; Opala, P.; *et al.* 2014. Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Kenya. *Int. Sch. Res. Notices* 1: 1-8.
- Kumar, P.G.; Saha, P.; Mayilraj, S. *et al.* 2013. Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PGP *Rhizobium* sp Original. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (3): 234-239.
- Leppyanen, I.; Kirienko, A.; Dolgikh, E. 2019. Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of *Pisum sativum* L. roots as a tool for studying the mycorrhizal and root nodule symbioses. *J Peer* 7: 6552.
- Mazur, A.; De Meyer, S.E.; Tian, R.; *et al.* 2015. Secuencia de genoma de borrador permanente de alta calidad de *Rhizobium leguminosarum* bv. cepa GB30 de viciae; un microsimbionte eficaz de *Pisum sativum* que crece en Polonia. *Estándares en ciencias genómicas* 10: 36.
- Orrell, P.; Bennett, A. 2013. How can we exploit above-belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? *Front. Plant Sci.* 4: 432.
- Panasiewicz, K.; Niewiadomska, A.; Sulewska, H.; *et al.* 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.
- Pande, A.; Pandey, P.; Mehra, S.; *et al.* 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 15(2): 379-391.
- Paul, J.; Rutten, P.; Poole, S. 2019. Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia, Editor(s): Robert K. Poole, *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press. 325-389.
- Peng, W.; Kong, X.; Chen, Y.; *et al.* 2016. Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocoll* 52: 301-310.
- Pietrysiak, E.; Smith, D.; Smith, B.; *et al.* 2018. Enhanced functionality of pea-rice protein isolate blends through direct steam injection processing. *Food Chem.* 243: 338-344.
- Ranjan, G.; Soma, B.; Rajib, M.; *et al.* 2016. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiological Research* 183: 80-91.
- Reeve, W.; Ardley, J.; Tian, R.; *et al.* 2015. Una enciclopedia genómica de las bacterias del nódulo de la raíz: evaluación de la diversidad genética mediante un estudio biogeográfico sistemático. *Stand Genomic Sci.* 10: 14.
- Serova, T.A.; Tsyganova, A.V.; Tikhonovich, I.A.; *et al.* 2019. Gibberellins Inhibit Nodule Senescence and Stimulate Nodule Meristem Bifurcation in Pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci.* 10: 285.
- Somasegaran, P.; Hoben, H. 1994. *Handbook for Rhizobia Methods in Legume Rhizobium Technology*. New York, NY: Springer.
- Tsyganova, A.; Tsyganov, V. 2017. Plant genetic control over infection thread development during legume *Rhizobium* symbiosis, in *Symbiosis* ed. Rigobelo E. C. (London: IntechOpen): 23-52.
- Tsyganova, A.; Tsyganov, V. 2018. Negative hormonal regulation of symbiotic nodule development. II. Salicylic, jasmonic and abscisic acids. *Agric. Biol.* 53: 3-14.
- Xiong, T.; Xiong, W.; Ge, M.; *et al.* 2018. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate, *Food Res. Int.* 109: 260-267.
- Zgadaj, R.; James, E.K.; Kelly, S.; *et al.* 2015. A legume genetic frame-work controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genet* 11(6): 1005280.