

COINOCULACIÓN DE *Rhizobium* Y *Bacillus* EN EL CRECIMIENTO DE *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum*, EN INVERNADERO, 2018

Nery Santillana Villanueva

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Agrarias
Programa de Investigación en Pastos y Ganadería - Área de Rhizobiología
E-mail: nery.santillana@unsch.edu.pe

RESUMEN

La tecnología de la coinoculación en leguminosas es ventajosa porque proporciona mayor fijación biológica del nitrógeno y mayor capacidad de absorción de nutrientes mejorando el crecimiento y estado nutricional de las plantas. La presente investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de la coinoculación de *Rhizobium* y *Bacillus* en el crecimiento y nodulación de *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum*, en condiciones de invernadero. Los tratamientos fueron los siguientes: T1= Coinoculación *Rhizobium* + *Bacillus*, T2= Inoculación *Rhizobium*, T3= Inoculación *Bacillus*, T4= Fertilización química, T5= control. El experimento se condujo en el diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Se utilizó semillas de frijol de la variedad canario y semillas de arveja de la variedad verde común, las que fueron sembradas en suelo de Pampa del Arco contenidos en maceteros de 1 kg de capacidad. Los resultados obtenidos determinaron que el tratamiento *Rhizobium* + *Bacillus* incrementó, con diferencias estadísticas, el peso de la materia seca de la parte aérea en frijol y no así, en arveja. La co inoculación *Rhizobium* + *Bacillus* no incrementó el desarrollo del sistema radicular del frijol tampoco de la arveja, la nodulación en plantas de frijol y arveja coinoculadas con *Rhizobium* + *Bacillus* fue similar al tratamiento sólo con *Rhizobium*. Se ha demostrado que la coinoculación *Rhizobium* + *Bacillus* podría mejorar el crecimiento de las leguminosas por lo que se recomienda continuar investigando en diferentes variedades, como una estrategia para optimizar la producción de leguminosas en un sistema sostenible.

Palabras clave: Coinoculación, crecimiento, nodulación, frijol, arveja.

COINOCULATION OF *Rhizobium* and *Bacillus* IN THE GROWTH OF *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*, IN GREENHOUSE, 2018

ABSTRAT

Coinoculation technology in legumes is advantageous because it provides greater biological fixation of nitrogen and greater capacity for absorption of nutrients improving the growth and nutritional status of plants. The present investigation was developed with the aim of evaluating the effect of the coinoculation of *Rhizobium* and *Bacillus* on the growth of *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum*, under greenhouse conditions. The treatments were the following: T1 = *Rhizobium* + *Bacillus* coinoculation, T2 = *Rhizobium* inoculation, T3 = *Bacillus* inoculation, T4 = Chemical fertilization, T5 = control. The experiment was conducted in the completely randomized design with three repetitions per treatment. Bean seeds of the Canarian variety and pea seeds of the common green variety were used, which were sown in soil of Pampa del Arco contained in pots of 1 kg of capacity. The results obtained determined that the *Rhizobium* + *Bacillus* treatment increased, with statistical differences, the weight of the dry matter of the aerial part in beans and not, in peas. The *Rhizobium* + *Bacillus* co-inoculation did not increase the development of the bean root system either of the pea, the nodulation in coinoculated bean and pea plants with *Rhizobium* + *Bacillus* was similar to the *Rhizobium*-only treatment. It has been shown that *Rhizobium* + *Bacillus* coinoculation could improve the growth of legumes so it is recommended to continue investigating different varieties of legumes, as it could be a strategy to improve the production of legumes in a sustainable system.

Key words: Co-inoculation, growth, nodulation, pea beans.

INTRODUCCIÓN

La simbiosis leguminosa – rizobio es conocida por los múltiples beneficios que brinda a la planta y al ambiente por lo que el uso de biofertilizantes a base de estas bacterias es una práctica que se utiliza desde hace mucho tiempo (Peix et al. 2015, Mayz-Figueroa 2004). La necesidad de producir alimentos en mayor cantidad y de mejor calidad ha hecho de que se busquen otras alternativas, siendo la coinoculación una práctica que en algunos países como Brasil se viene utilizando para mejorar la producción de soya (EMBRAPA, 2014).

La coinoculación de leguminosas se puede realizar utilizando el rizobio y otras bacterias de vida libre como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* u otras bacterias con características promotoras de crecimiento vegetal (Obando 2012, Yadav y Verma 2014), por lo que se ha planteado realizar la presente investigación con la finalidad de utilizar bacterias del género *Bacillus* aisladas de pasturas alto andinas de Ayacucho. Padda et al. (2017) indican que las bacterias del género *Bacillus* son microorganismos de importancia agrícola por su capacidad de promover el crecimiento de las plantas. Además de ser consideradas como un potente agente de control biológico, también son ampliamente conocidas por su capacidad para fijar nitrógeno

atmosférico, solubilizar fosfato y producir fitohormonas; por lo tanto, podrían usarse como biofertilizantes efectivos en la agricultura.

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto de la coinoculación de *Rhizobium* y *Bacillus* en el crecimiento y nodulación de *Phaseolus vulgaris* y *Pisum sativum*, en condiciones de invernadero. Se ha demostrado que la coinoculación *Rhizobium* + *Bacillus* podría mejorar el crecimiento de las plantas de frijol y arveja por lo que se recomienda continuar investigando en diferentes variedades de leguminosas, considerando que la presente investigación es la primera que se realiza con la técnica de coinoculación.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Área de ubicación del estudio
La investigación se realizó en el laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga ubicado en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Geográficamente está ubicado a 74°13'18" de longitud oeste y a 13° 08'38" de latitud sur, a una altitud de 2750 msnm.
- Material biológico
Cepas de *Rhizobium* y *Bacillus*
Semillas de frijol variedad Canario y arveja variedad Verde común
- Tratamientos
T1= Control
T2= Fertilización química
T3= Inoculación *Rhizobium*
T4= Inoculación *Bacillus*
T5= Coinoculación *Rhizobium* + *Bacillus*
- Diseño Experimental
El ensayo fue conducido en el diseño Completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento
- Instalación de ensayos
 - Preparación de macetas
Se utilizó suelo de Pampa del Arco. El suelo fue colocado en maceteros de 1 kg de capacidad, abonado e inoculado de acuerdo a los tratamientos. Los tratamientos inoculados fueron abonados con materia orgánica y superfosfato triple (120 P2O5), para la fertilización química se utilizó 60-120-0 de NPK. El tratamiento control fue abonado con solamente superfosfato triple.
 - Siembra
La siembra se realizó utilizando 2 semillas por maceta, luego del desahije se dejó una planta por maceta.
 - Inoculación
La inoculación se realizó utilizando 1 mL de la solución bacteriana por planta.

- Conducción del experimento
Se realizó riegos de acuerdo a la necesidad de la planta.
- Evaluación
La evaluación se realizó al inicio de floración, considerando las siguientes variables:

- Materia seca de la parte aérea y radicular
Se cortó la parte aérea de la planta, se dejó secar en estufa a 60°C luego se procedió al pesado, de igual manera se procedió con la parte radicular.
- Nodulación
Se realizó el recuento de los nódulos, de cada una de las plantas.
Los nódulos fueron extraídos de la planta, secados a 60°C y pesados para obtener la masa nodular.
- Análisis estadístico
Los resultados obtenidos de cada parámetro fueron sometidos al análisis de variancia y las diferencias significativas entre medias se analizaron por la prueba de Tukey utilizando el programa estadístico MINITAB versión 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Efecto de la co-inoculación *Rhizobium* – *Bacillus* en el crecimiento y nodulación de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad Canario.

El análisis de variancia de las variables evaluadas (materia seca de la parte aérea, de la raíz, de los nódulos y el número de nódulos) en plantas de frijol indicó diferencias altamente significativas entre tratamientos por lo que se procedió a realizar la prueba de significación de Tukey (0.05).

La prueba de Tukey de la materia seca de la parte aérea de frijol determinó que el tratamiento *Rhizobium* + *Bacillus* superó con diferencias significativas al resto de tratamientos. Asimismo, los tratamientos Fertilización química y *Rhizobium* superaron con diferencias significativas a los tratamientos control y *Bacillus* lo que indica el efecto positivo de los tratamientos mencionados.

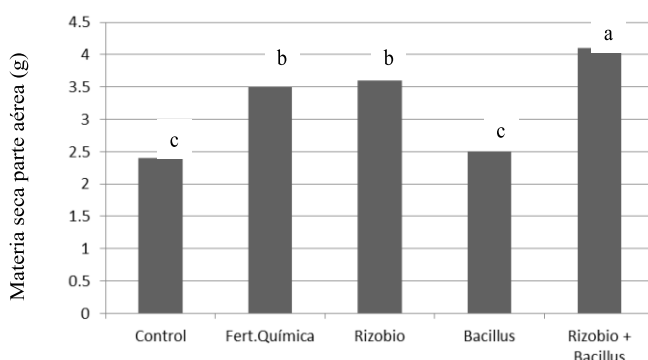


Figura 1. Prueba de Tukey (0.05) de la materia seca de la parte aérea de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

La prueba de Tukey de la materia seca de la raíz (Figura 2) mostró diferencias significativas entre los tratamientos

evaluados, siendo la fertilización química el mejor tratamiento, seguido de los tratamientos *Rhizobium* + *Bacillus*, *Rhizobium*, control y *Bacillus*. Los resultados obtenidos indican que la presencia de fertilizante químico disponible para la planta estimula el crecimiento radicular de las plantas de frijol, sin embargo, no corresponde al mayor desarrollo de la parte aérea, relación que sí se puede observar en el caso de los tratamientos *Rhizobium* + *Bacillus* y *Rhizobium*.

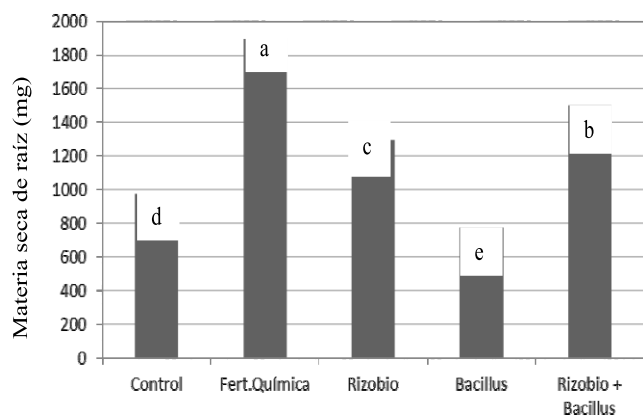


Figura 2. Prueba de Tukey (0.05) de la materia seca radicular de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

La prueba de Tukey del número de nódulos (Figura 3) determinó que los tratamientos *Rhizobium* y *Rhizobium* + *Bacillus* superaron con diferencias significativas al resto de tratamientos, resultados que también fueron evidenciados en el desarrollo de la parte aérea.

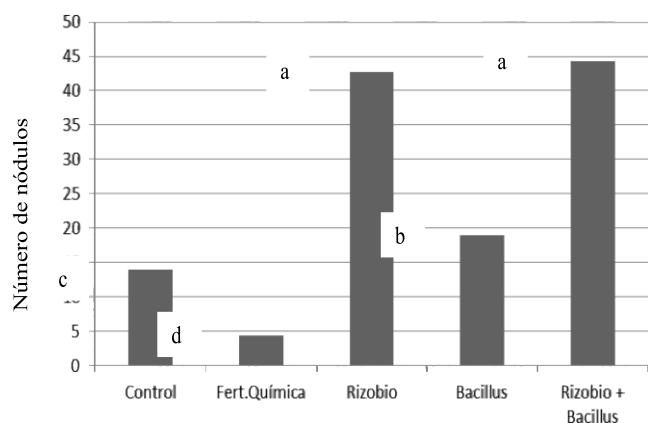


Figura 3. Prueba de Tukey (0.05) del número de nódulos de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

La prueba de Tukey de la materia seca de los nódulos (Figura 4) comprobó que el tratamiento *Rhizobium* presentó la mayor masa seca de nódulos seguido del tratamiento *Rhizobium* + *Bacillus*, dichos tratamientos superaron con diferencias significativas al resto de tratamientos.

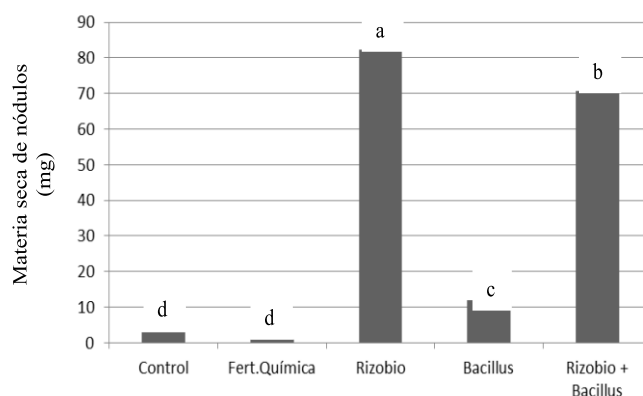


Figura 4. Prueba de Tukey (0.05) de la materia seca de nódulos de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

En la Figura 5 se presenta el conglomerado de las variables evaluadas en cada uno de los tratamientos. Se determinó que los tratamientos *Rhizobium* + *Bacillus* y *Rhizobium* superaron al resto de tratamientos incluido la Fertilización química, lo que indica el efecto positivo de la inoculación, en este caso también se observa el incremento de la masa de la materia seca de la parte aérea con la co inoculación *Rhizobium* + *Bacillus* que superó con diferencias significativas al tratamiento *Rhizobium*.

El efecto positivo de la coinoculación ha sido observado por varios autores, por ejemplo, Martínez et al. (2015) mencionan el efecto positivo de la coinoculación bacteriana en plantas de alfalfa, Ferlini (2006) informa sobre el efecto positivo de la coinoculación en soja, Akhtar et al. (2013) demostraron claramente que la coinoculación de *Rhizobium* y *Bacillus* sp aumentó la disponibilidad de fósforo y ejerció un efecto positivo sobre el crecimiento y el rendimiento del cultivo de trigo, asimismo, EMBRAPA (2014) recomienda la coinoculación como una práctica para mejorar la producción de soja.

Figura 5. Conglomerado de las variables evaluadas en cada uno de los tratamientos.

En la tabla 1 se presenta el análisis de Correlación de Pearson entre las variables evaluadas, se observa correlación positiva entre la materia seca de la parte aérea (MSPA) y el número de nódulos (NN) y la materia seca de nódulos (MSN) no obstante sin diferencias significativas.

Tabla 1. Correlación de Pearson entre las variables materia seca de la parte aérea (MSPA), materia seca de la raíz (MSR), número de nódulos (NN) y materia seca de nódulos (MSN) de plantas de frijol variedad Canario.

	MSPA	MSR	NN
MSR	0.758		
	0.137		
NN	0.593	-0.056	
	0.292	0.928	
MSN	0.709	0.132	0.968
	0.18	0.832	0.007

Contenido de la celda: Correlación de Pearson
Valor P

La materia seca de la raíz (MSR) presentó correlación negativa con el número de nódulos, mientras que con la materia seca de la raíz (MSR) presento baja correlación, no significativa. Las variables Número de nódulos (NN) y materia seca de nódulos (MSN) presentaron correlación positiva y significativa. Los resultados obtenidos indican que el desarrollo de la parte aérea se relaciona con la nodulación y no con el desarrollo de la raíz, asimismo la correlación positiva y significativa entre el número y masa seca de nódulos indica características eficientes de nodulación.

- Efecto de la co-inoculación *Rhizobium* – *Bacillus* en el crecimiento y nodulación de plantas de arveja variedad Verde común

El análisis de variancia de la materia seca de plantas de arveja inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus* determinó que los tratamientos evaluados no presentaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en la Figura 6 se observa un incremento numérico en los tratamientos *Rhizobium* + *Bacillus*, *Rhizobium* y fertilización química frente al control y *Bacillus*. Los resultados obtenidos posiblemente se deben al ataque de las plantas por el hongo *Erysiphe polygoni* que causa el polvillo o el oídium en arveja.

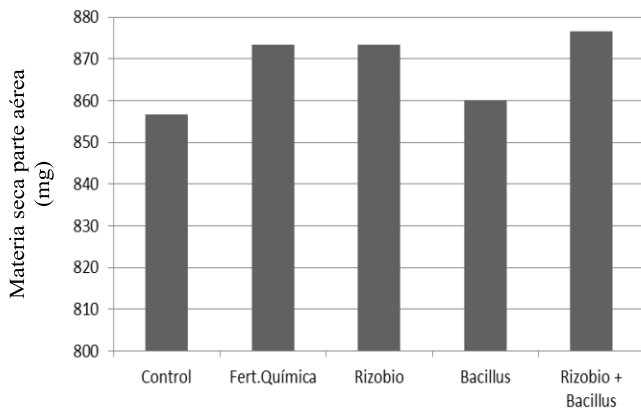


Figura 6. Materia seca de la parte aérea de plantas de arveja inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

El análisis de variancia de la materia seca de la raíz y del número de nódulos determinó diferencias significativas entre tratamientos por lo que se procedió a realizar la prueba de Tukey (0.05).

La prueba de Tukey de la materia seca de la raíz (Figura 7) determinó que el tratamiento Fertilización química presentó diferencias significativas frente al resto de tratamientos, los que no presentaron diferencias estadísticas entre ellos. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en plantas de frijol, debido posiblemente a que las bacterias inoculadas no ejercen un efecto positivo en el sistema radicular.

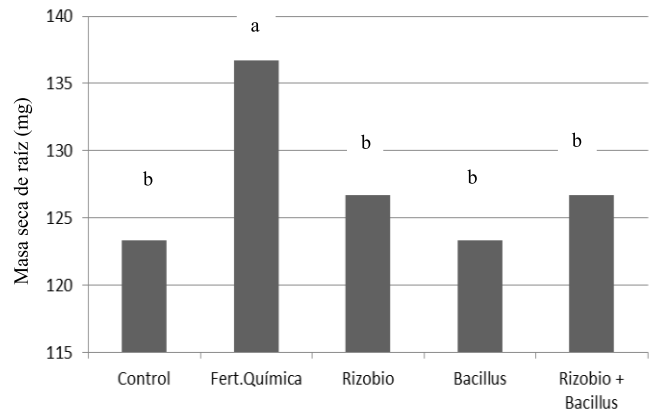


Figura 7. Prueba de Tukey (0.05) de la masa seca de la raíz de plantas de arveja inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*

Al realizar la prueba de Tukey del número de nódulos (Figura 8) se observó que los tratamientos *Rhizobium*, *Bacillus* y *Rhizobium* + *Bacillus* no presentaron diferencias significativas entre ellos, sin embargo superaron al control sin inocular y a la fertilización química que no presentaron diferencias significativas con el tratamiento *Bacillus*. Es importante indicar que la nodulación también fue afectada por el ataque del hongo *Erysiphe polygoni* ya que se observó una deficiente nodulación, entre 1 a 3 nódulos por planta, por lo que no se determinó la masa seca de nódulos. Padda et al. (2017) indican que las bacterias del género *Bacillus* son famosas por su capacidad de actuar como un agente de control biológico contra una amplia gama de patógenos de plantas, sin embargo, en la presente investigación no se ha observado dicha capacidad.

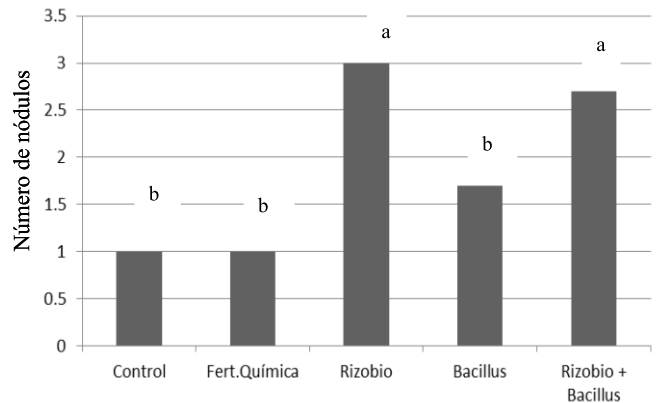


Figura 8. Prueba de Tukey (0.05) del número de nódulos de plantas de arveja inoculadas con *Rhizobium* y *Bacillus*.

Tonelli et al. (2017) indican que la inoculación de *Bacillus* sp. no afecta el comportamiento simbiótico de los rizobios de soya, efecto también observado en la presente investigación, ya que la nodulación en el tratamiento *Rhizobium* + *Bacillus* fue similar al tratamiento sólo con *Rhizobium* en ambas especies evaluadas.

Los resultados obtenidos determinaron que el tratamiento *Rhizobium* + *Bacillus* incrementó con diferencias estadísticas el peso de la materia seca de la parte aérea en frijol y no así, en arveja. La co inoculación *Rhizobium* + *Bacillus* no incrementó el desarrollo del sistema radicular de frijol tampoco de la arveja, la nodulación en plantas de frijol y arveja coinoculadas con *Rhizobium* + *Bacillus* fue similar al tratamiento sólo con *Rhizobium*.

Se ha demostrado que la coinoculación *Rhizobium* + *Bacillus* podría mejorar el crecimiento de las leguminosas por lo que se recomienda continuar investigando en diferentes variedades de leguminosas, considerando que la presente investigación es la primera que se realiza con la técnica de coinoculación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, N., Arshad, I., Shakir, M.A., Sehrish, J., Ali, L. (2013). Co-inoculation with *Rhizobium* and *Bacillus* sp to improve the phosphorus availability and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Animal and Plant Sciences* 23(1):190-197.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA). (2014). Tecnología de coinoculación Rizobios y *Azospirillum* en soya y frijol. Folder 02. Segunda Impresión.
- Ferlini H. (2006). Co-inoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Centro de Desarrollo Agrícola de las FAR, AGROFAR. Santo Domingo, Villa Clara. Cuba.
- Martínez R., Nebot E., Porres J.M., Kapravelou, Bedmar E. López-Jurado M. (2015). Medicago sativa: mejora y nuevos aspectos de su valor nutritiva y funcional por coinoculación bacteriana. *Nutr. Hosp.* 32(6): 2741-2748
- Mayz-Figueroa J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1):1-20.
- Obando D. (2012). “Respuesta fisiológica del frijol caupí (*Vigna unguiculata* L.) A la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* en suelos del departamento del César”. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias: Línea de Investigación en fisiología de cultivos. Universidad de Colombia, Facultad de Agronomía.
- Padda K.P., Puri A., Chanway Ch. (2017). *Paenibacillus* polimixa: A prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agricultura. En: *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* pp 165-191.
- Peix A., Ramírez-Bahena M., Velázquez E. and Bedmar E. (2015). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34:17–42, 2015.
- Tonelli M.L., Magallanes-Noguera, C., Fabra A. (2017). Symbiotic performance and induction of systemic resistance against *Cercospora sojina* in soybean plants co-inoculated with *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium japonicum* E109. *Archives of Microbiology*, 199(9):1283-1291.
- Yadav J., Verma P. (2014). Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Soil Biology*, 63: 70-77.