

# Bacterias fijadoras de nitrógeno y *Trichoderma* en el crecimiento de las leguminosas *Mucuna pruriens* y *Phaseolus vulgaris*

Fernanda Chavarín-Flores<sup>1‡</sup>, Andrés de Jesús López-Gervacio<sup>2‡</sup>, Jhony Navat Enríquez-Vara<sup>3\*</sup>, Elba Montserrat Alcázar-Valle<sup>4</sup>, Soledad García-Morales<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente, Universidad Jesuita de Guadalajara, Tlaquepaque, México.

<sup>2</sup>Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Zapopan, México

<sup>3</sup>Biotecnología Vegetal, CONAHCYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Zapopan, México.

<sup>4</sup>Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Zapopan, México.

‡Estos autores contribuyeron de igual manera en el artículo.

Autores de correspondencia: [jenriquez@ciatej.mx](mailto:jenriquez@ciatej.mx) y [smorales@ciatej.mx](mailto:smorales@ciatej.mx)

## Resumen

### Palabras clave:

*Azotobacter*, biofertilizantes, promotor del crecimiento, *Rhizobium*, *Trichoderma*

El uso excesivo de fertilizantes sintéticos y agroquímicos causa efectos dañinos para el medio ambiente, la salud de los agricultores y los consumidores. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos promotores de crecimiento son una de las alternativas al uso de fertilizantes sintéticos. El objetivo fue evaluar el efecto de los biofertilizantes comerciales a base de *Rhizobium* y *Azotobacter*, así como el hongo *Trichoderma asperellum* en plantas de *Mucuna pruriens* y *Phaseolus vulgaris* para potencializar su crecimiento vegetativo. Se usaron dos productos comerciales, uno con *Rhizobium etli* y el otro con *Azotobacter* sp.; además de una cepa de *T. asperellum*. Se encontró un aumento significativo en índice de clorofila y peso fresco de raíz de *P. vulgaris* con ambas bacterias y un mayor número de hojas en plantas de *M. pruriens* con la aplicación de los dos insumos bacterianos. Con *T. asperellum* se obtuvo mayor índice de clorofila, altura y peso del vástago de *M. pruriens*; sin efectos significativos con la inoculación del hongo en el crecimiento de *P. vulgaris*. Los bioinsumos que contienen microorganismos benéficos pueden ser una alternativa para potencializar el crecimiento vegetativo de leguminosas; dependiendo del género vegetal y del microorganismo aplicado como biofertilizante.

Enfoques Transdisciplinarios:  
Ciencia y Sociedad, 2(2),  
197-214. ISSN: 3061-709X.  
[https://doi.org/10.5281/  
zenodo.12773946](https://doi.org/10.5281/zenodo.12773946)

Recibido: 03 junio 2024  
Revisado: 20 de junio 2024  
Aceptado: 10 de julio 2024  
Publicado: 18 de julio 2024



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



## Introducción

El frijol forma parte de la familia de las leguminosas y es una semilla fundamental en la dieta de la población en México debido a su valor nutricional. Este grano tiene un contenido elevado de vitaminas, minerales, fibra y proteína que oscila entre el 20 y 25% (Alcázar-Valle *et al.*, 2021). El consumo de frijol puede beneficiar las condiciones cardiovasculares, así como problemáticas relacionadas con la obesidad, hipertensión y diabetes (Rochín-Medina *et al.*, 2021). El frijol es originario de América, su cultivo y domesticación se registraron en Mesoamérica y los Andes, según revelan estudios y hallazgos arqueológicos encontrados en estas regiones (León-Rojas *et al.*, 2020).

Una de las especies de frijol más utilizadas en la alimentación es *Phaseolus vulgaris* L., que se conoce como frijol común. México es conocido por sus aportaciones a la domesticación del frijol y a la diversidad de especies que alberga; se calcula que existen 70 variedades criollas y una gran diversidad de frijoles silvestres (León-Rojas *et al.*, 2020).

El género *Mucuna* pertenece a la familia Fabaceae e incluye aproximadamente a 150 especies de leguminosas anuales y perennes (Lampariello *et al.*, 2012). *Mucuna pruriens* (L.) DC está considerada entre las leguminosas silvestres infrautilizadas y se puede encontrar en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta leguminosa es viable como alimento por su contenido de proteínas (23-35%) y su digestibilidad, que es comparable al de otras legumbres como la soya, las alubias y las habas (Lampariello *et al.*, 2012). Además, esta planta contiene una diversidad de metabolitos y uno de estos es la levodopa que potencialmente puede utilizarse en terapias coadyuvantes en pacientes con la enfermedad de Parkinson (Botello-Villagrana & Martínez-Ramírez 2021).

La eficiencia en la producción de leguminosas puede ser afectada por las condiciones climáticas, la presencia de enfermedades y las condiciones del suelo, donde el nitrógeno (N) y el fósforo (P) son considerados nutrimentos fundamentales para el cultivo (Medina-García *et al.*, 2016). Es frecuente encontrar deficiencias de N asociadas a la acidificación de los suelos lo que afecta su disponibilidad. Como las plantas carecen del mecanismo asociado con la fijación biológica del N, no son capaces de absorber el N atmosférico ( $N_2$ ) (González *et al.*, 2012).

Para remediar las deficiencias de N en el suelo, se suelen suministrar fertilizantes nitrogenados; sin embargo, el exceso de nitrógeno no sólo puede ocasionar rendimientos bajos y un precio elevado de producción, sino que también generan contaminación en los cuerpos de agua por la lixiviación que se produce del amoníaco ( $NH_3$ ). Además, se generan gases de efecto invernadero cuando el nitrato ( $NO_3^-$ ) se desnitrifica (Liu *et al.*, 2020). Por lo tanto, se ha propuesto utilizar microorganismos como algunas bacterias simbiotes que poseen el mecanismo de fijación biológica



de N y pueden transformar el  $N_2$  para convertirlo en N soluble que puede ser absorbido por las plantas para su metabolismo (González *et al.*, 2012).

La simbiosis se establece entre las bacterias fijadoras de N, como *Rhizobium*, y la raíz de la planta para formar estructuras especializadas que reciben el nombre de nódulos. A causa de la simbiosis, el frijol puede crecer en suelos que contienen bajas concentraciones de N sin la necesidad de utilizar fertilizantes sintéticos (Isidra-Arellano & Valdés-López, 2022). Para lograr un mejor crecimiento del frijol, se ha planteado el uso de consorcios microbianos porque podrían ser más económicos y tener una mayor eficiencia en la disponibilidad de nutrientes y protección de las plantas contra factores bióticos y abióticos. Debido al interés en los consorcios, es importante identificar a los microorganismos que los conforman, determinar la dinámica entre los microorganismos y evaluar la calidad y la concentración de los bioinsumos que los contenga para decidir la confiabilidad de su uso (Hernández Melchor *et al.*, 2016).

Otras bacterias fijadoras de N son las especies de *Azotobacter*, estas bacterias son de vida libre, tienen mecanismos no simbióticos de fijación del N atmosférico y son consideradas promotoras de crecimiento de las plantas de importancia agrícola. Se ha demostrado el potencial de *Azotobacter* como biofertilizante para la nutrición de las plantas y la fertilidad biológica de los suelos debido a la fijación del N y la solubilización de fósforo; además de conferir protección contra fitopatógenos y por la biosíntesis de fitohormonas (Aasfar *et al.*, 2021).

Asimismo, existen hongos benéficos que pueden actuar como promotores de crecimiento de plantas. Estos hongos han demostrado que favorecen el crecimiento y confieren tolerancia a la planta frente a condiciones climáticas adversas que pueden ser perjudiciales cuando se aplican a las semillas, al suelo o directamente (Miranda *et al.*, 2022). Entre ellos se ha destacado el género *Trichoderma*, el cual es un hongo que se encuentra en la rizosfera y predomina en suelos agrícolas o bosques. Posee un alto nivel de adaptabilidad en diferentes entornos al crecer como saprófito, no requiere de muchos nutrimentos y crece en un rango de temperatura de 25 a 30 °C (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Se ha reportado que *Trichoderma* puede producir fitohormonas como las auxinas, que favorecen el desarrollo de raíces, y giberelinas, que permiten una mayor germinación y elongación del tallo. Este hongo también posee la capacidad de biogénesis de metabolitos secundarios, micoparasitismo y propiedades antibióticas que aumentan la capacidad de la planta para combatir hongos fitopatógenos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). El hongo produce ácidos orgánicos como ácido glucónico, ácido fumárico y ácido cítrico, lo cual puede disminuir el pH del suelo, por lo que se ha propuesto probar su efecto en diferentes cultivos como tomate, frijol, cebolla, berenjena, entre otras (Rodríguez-García & Vargas-Rojas, 2022).



El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos biofertilizantes comerciales bacterianos a base de *Rhizobium* y *Azotobacter*, así como el hongo *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento vegetativo y fisiología de las leguminosas *M. pruriens* y *P. vulgaris* en invernadero.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de frijol común criollo (*P. vulgaris*) de testa negra, obtenidas del municipio de Xochistlahuca, Guerrero. Las semillas del frijol *Mucuna* (*M. pruriens*) provienen de Santa Rosa de Lima, Oaxaca.

### Preparación de los inóculos

Se utilizaron dos biofertilizantes comerciales de la marca Bio-Organik®, uno de ellos con la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium etli* a una concentración de  $1.2 \times 10^{11}$  UFC/dosis, en forma de solución acuosa y en presentación de 1 L. El otro producto con la bacteria *Azotobacter* sp. como ingrediente activo a una concentración de  $1.2 \times 10^{11}$  UFC/dosis, en solución acuosa de 1 L.

Se utilizó el hongo *Trichoderma asperellum*, aislado de raíz de aguacate e identificado previamente por secuenciación con los iniciadores universales ITS1 e ITS4. El hongo se sembró por plaqueo en cajas de Petri con medio PDA, las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por seis días. Después el hongo se dejó crecer en la incubadora con luz artificial durante tres días para inducir la formación de esporas (color verde característico del hongo). Posteriormente, se agregó 5 mL de agua destilada estéril con Tween 80 (0.05%) para cosechar los conidios mediante el raspado de las cajas de Petri. La concentración de conidios se determinó por medio del conteo en una cámara de Neubauer y se ajustó una concentración  $1 \times 10^8$  conidios/mL para su aplicación a las plantas.

### Establecimiento del experimento y tratamientos

Se establecieron dos ensayos experimentales independientes en un invernadero de cubierta plástica, con una temperatura promedio de 25.7 °C y una humedad relativa promedio de 60%. El primero consistió en aplicar los biofertilizantes comerciales que contenían *Rhizobium* o *Azotobacter*, descritos en la sección anterior, para promover el crecimiento vegetativo de las leguminosas estudiadas. En el segundo experimento se utilizó al hongo *T. asperellum*.

En ambos experimentos se utilizó sustrato comercial Sunshine® Mix #4, que se compone por una mezcla de musgo de turba esfagno canadiense, perlita gruesa, piedra caliza dolomítica, carga de nutrientes iniciales y agente humectante. El sustrato se esterilizó en una autoclave bajo condiciones estándares (121 °C por 15 min).



Se utilizaron charolas germinadoras de polietileno flexible de 38 cavidades. Estas charolas se llenaron con el sustrato estéril y se colocó una semilla de cada leguminosa, previamente seleccionadas, todas las semillas se sembraron a aproximadamente 1.5 cm de profundidad. Las semillas no pasaron por ningún tratamiento de desinfestación debido a que se usaron semillas criollas; considerando que, los campesinos no realizan ningún proceso de desinfestación durante sus prácticas agrícolas y que los resultados obtenidos en este trabajo puedan ser socializados en las regiones donde se obtuvo el material vegetal.

Para el primer ensayo experimental, los tratamientos consistieron en los insumos comerciales: Bio-Organik® con *Rhizobium* y Bio-Organik® con *Azotobacter*. El testigo consistió en riegos con agua destilada. La preparación de los productos se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando 1 L de producto por 200 L de agua. Al momento de la siembra se aplicó 5 mL de cada biofertilizante comercial por cavidad de la charola (se colocó una semilla por cavidad). Posteriormente, los tratamientos se aplicaron (5 mL) una vez por semana, durante ocho semanas, hasta la aparición de nódulos.

Para el segundo ensayo experimental, las semillas se colocaron en 300 mL de una suspensión de conidios de *T. asperellum*, a una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/mL, durante 3 h. Después, las semillas tratadas se sembraron a 1.5 cm de profundidad aproximadamente. La aplicación de tratamientos se realizó una vez por semana, a partir de la siembra, regando con 3 mL de la suspensión de *T. asperellum* por cada planta (una planta por cavidad), durante cinco semanas, hasta observar diferencias en las variables de crecimiento entre el testigo y el tratamiento con *T. asperellum*.

En ambos experimentos se tuvieron duplicados, empleando dos charolas germinadoras por cada tratamiento. En cada charola, se sembraron 18 semillas de *P. vulgaris* y 20 semillas de *M. pruriens*.

### **Variables evaluadas**

Una vez que finalizaron los experimentos (ocho semanas para los biofertilizantes y cinco semanas con el hongo *T. asperellum*), se seleccionaron seis plantas por charola para un total de 12 plantas por tratamiento. Se midió el índice de clorofila de las hojas con el medidor de clorofila SPAD-502 Plus (2900P-C). Se midieron las variables asociadas al crecimiento (número de hojas, altura de vástago, longitud de raíz, peso fresco y seco de raíz, peso fresco y seco del vástago) y se determinó el porcentaje de nodulación de las plantas de frijol *M. pruriens* y *P. vulgaris*.



## Análisis estadístico

Para las variables de crecimiento se realizó un ANOVA y una separación de medias de acuerdo con la prueba LSD de Fisher con un nivel de significancia del 95%, se utilizó el programa Minitab 20.

Se realizó un análisis de agrupamiento, empleando una clasificación por grupos de plantas que presentaban atributos o variables similares. Para esta clasificación se realizó una matriz de similitud del tipo Bray-Curtis, con datos previamente transformados por una raíz cuarta. Esta matriz consideró las variables morfológicas y fisiológicas medidas de cada especie por tratamiento al inicio y al final del experimento. A partir de la matriz de similitud Bray-Curtis se realizó un análisis de coordenadas principales (PCO). El PCO se visualizó, en una escala métrica, la distribución espacial de las plantas agrupadas por tratamiento.

## Resultados

### Efecto de los inoculantes bacterianos en el crecimiento de leguminosas

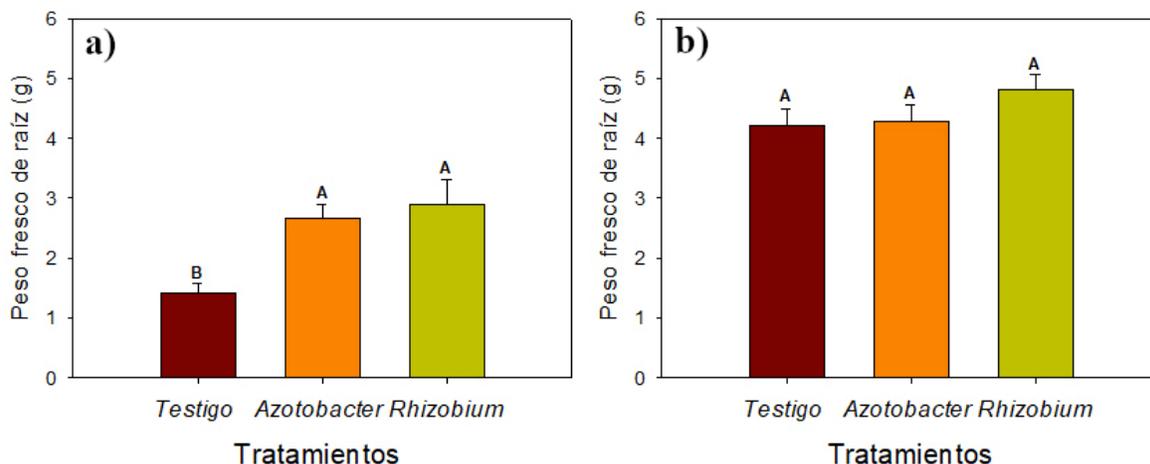
La aplicación de los biofertilizantes comerciales con las bacterias benéficas *Azotobacter* o *Rhizobium* en plantas de *P. vulgaris* y *M. pruriens* no tuvo efectos significativos en la altura de planta, longitud de la raíz o en la acumulación de biomasa fresca o seca (Tabla 1). Particularmente, en las plantas de *P. vulgaris* se encontró mayor longitud de raíz al aplicar el producto *Rhizobium* comparado con *Azotobacter*. El índice de clorofila también fue menor en las plantas tratadas con *Azotobacter* con respecto al testigo.

**Tabla 1.** Aplicación de inoculantes comerciales en el crecimiento de plantas de leguminosas

Especie	Tratamiento	Altura de vástago (cm)	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco de vástago (g)	Peso seco de vástago (g)	Peso seco de raíz (g)	Índice de clorofila
<i>P. vulgaris</i>	Testigo	23.47 ± 1.86 A	15.72 ± 2.83 AB	1.89 ± 0.30 A	0.40 ± 0.10 A	0.23 ± 0.08 A	34.54 ± 3.47 A
	<i>Azotobacter</i>	22.57 ± 2.51 A	14.70 ± 1.74 B	1.58 ± 0.31 A	0.35 ± 0.13 A	0.23 ± 0.05 A	27.67 ± 3.27 B
	<i>Rhizobium</i>	23.74 ± 1.64 A	17.14 ± 1.88 A	1.68 ± 0.34 A	0.36 ± 0.07 A	0.24 ± 0.05 A	30.98 ± 8.17 AB
<i>M. pruriens</i>	Testigo	32.06 ± 1.79 A	16.54 ± 4.11 A	5.07 ± 0.96 A	1.10 ± 0.26 A	0.29 ± 0.07 A	33.29 ± 4.27 A
	<i>Azotobacter</i>	31.79 ± 1.94 A	15.07 ± 2.47 A	5.26 ± 1.01 A	1.05 ± 0.21 A	0.29 ± 0.06 A	31.20 ± 4.49 A
	<i>Rhizobium</i>	32.23 ± 2.16 A	15.29 ± 1.96 A	5.62 ± 0.93 A	1.21 ± 0.22 A	0.33 ± 0.05 A	33.95 ± 5.02 A

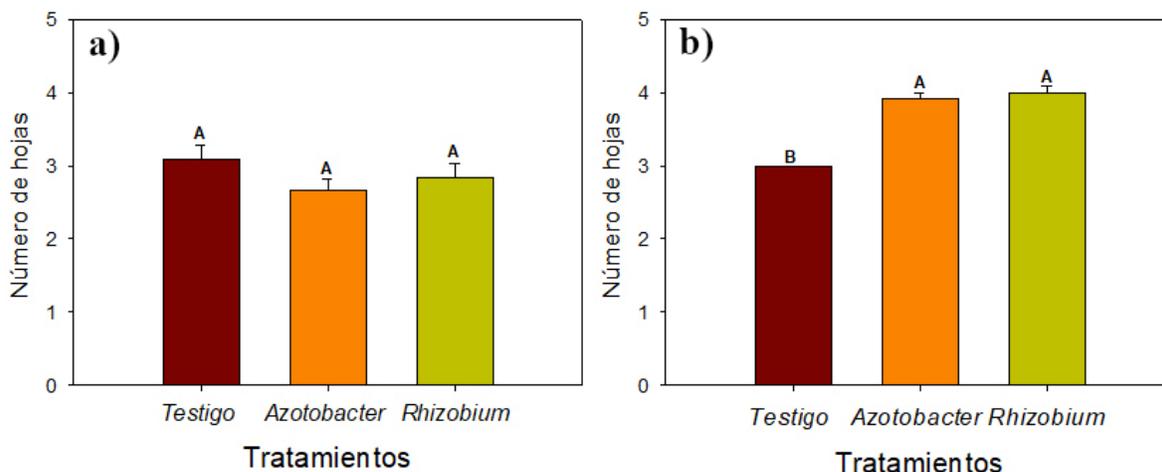
Valores promedio ±SD (desviación estándar), n = 12. Letras diferentes, en cada columna, indican diferencias significativas con base en la prueba LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). Fuente: propia

Las leguminosas evaluadas respondieron de manera diferencial a los inoculantes aplicados, ya que en las plantas de *P. vulgaris* se encontró mayor peso fresco de raíz con *Azotobacter* y *Rhizobium*. Mientras que las plantas de *M. pruriens* no presentaron diferencias significativas con la aplicación de los dos productos comerciales (Figura 1).



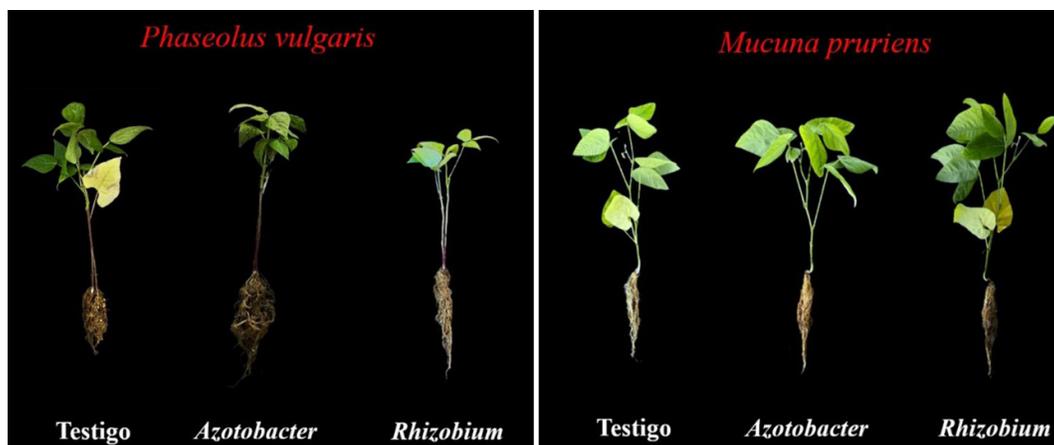
**Figura 1.** Efecto de los biofertilizantes comerciales *Azotobacter* y *Rhizobium* en el peso fresco de raíz en *P. vulgaris* (a) y *M. pruriens* (b). Valores promedio +SD, n = 12. Letras diferentes, en cada subfigura, indican diferencias significativas con base en la prueba LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). **Fuente:** propia

A diferencia de lo encontrado en el peso fresco de la raíz, en el número de hojas por planta no se encontraron diferencias entre los tratamientos en las plantas de *P. vulgaris* (Figura 2a). Sin embargo, la aplicación de los biofertilizantes comerciales incrementó el número de hojas en las plantas de *M. pruriens* (Figura 2b).



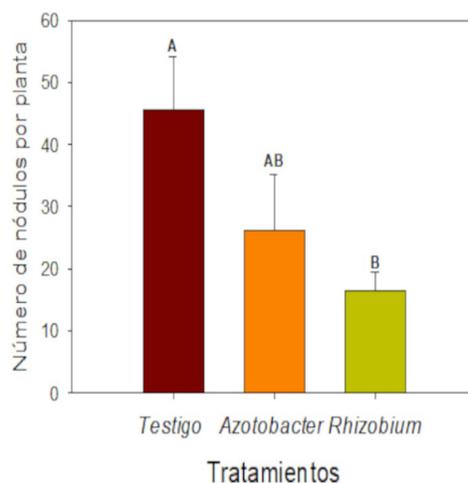
**Figura 2.** Efecto de biofertilizantes comerciales *Azotobacter* y *Rhizobium* en el número de hojas de plantas de *P. vulgaris* (a) y *M. pruriens* (b). Valores promedio +SD, n = 12. Letras diferentes, en cada subfigura, indican diferencias significativas con base en la prueba LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). **Fuente:** propia

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación de los biofertilizantes *Azotobacter* y *Rhizobium* favoreció el crecimiento de la parte radicular en *P. vulgaris*; mientras que, en *M. pruriens* se estimuló el crecimiento foliar (Figura 3).



**Figura 3.** Plantas de frijol de la especie *M. pruriens* y *P. vulgaris* después de ocho semanas de la aplicación de los inoculantes comerciales con *Azotobacter* o *Rhizobium*

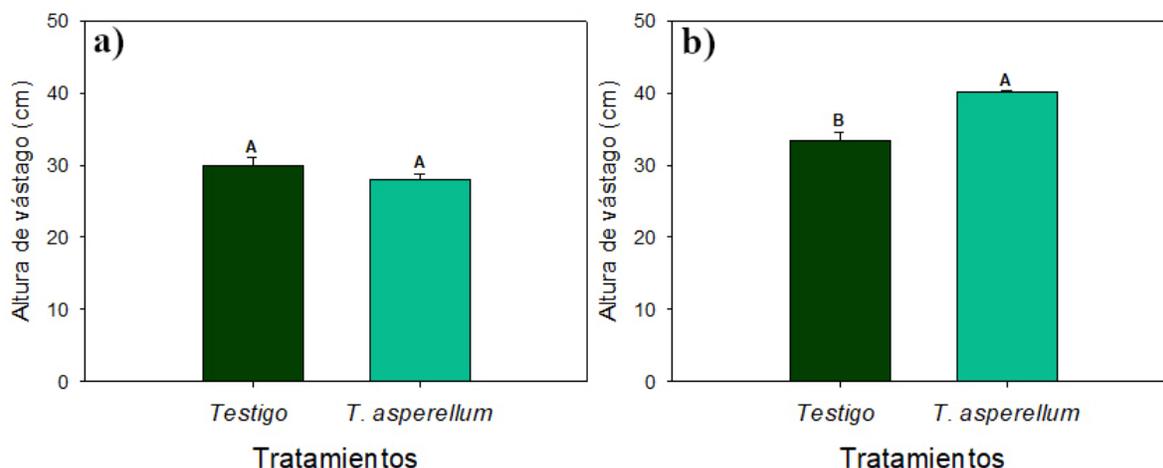
En las plantas de *M. pruriens* no hubo formación de nódulos. Sorpresivamente, en las plantas de *P. vulgaris* se presentó la formación de nódulos en las plantas testigo, sin la aplicación de los productos comerciales, indicando la presencia de bacterias nativas formadoras de nódulos en las semillas de frijol utilizado. La aplicación de los biofertilizantes comerciales *Azotobacter* o *Rhizobium* tuvieron un efecto antagónico con el número de nódulos, principalmente con *Rhizobium*, ya que se obtuvo una reducción significativa en la formación de nódulos (Figura 4). Lo anterior podría indicar una competencia entre las bacterias fijadoras de N por su establecimiento en la raíz.



**Figura 4.** Número de nódulos de *P. vulgaris* después de la aplicación de los biofertilizantes comerciales *Azotobacter* y *Rhizobium*. Valores promedio +SD. Letras diferentes indican diferencias significativas con base en el método LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). **Fuente:** propia

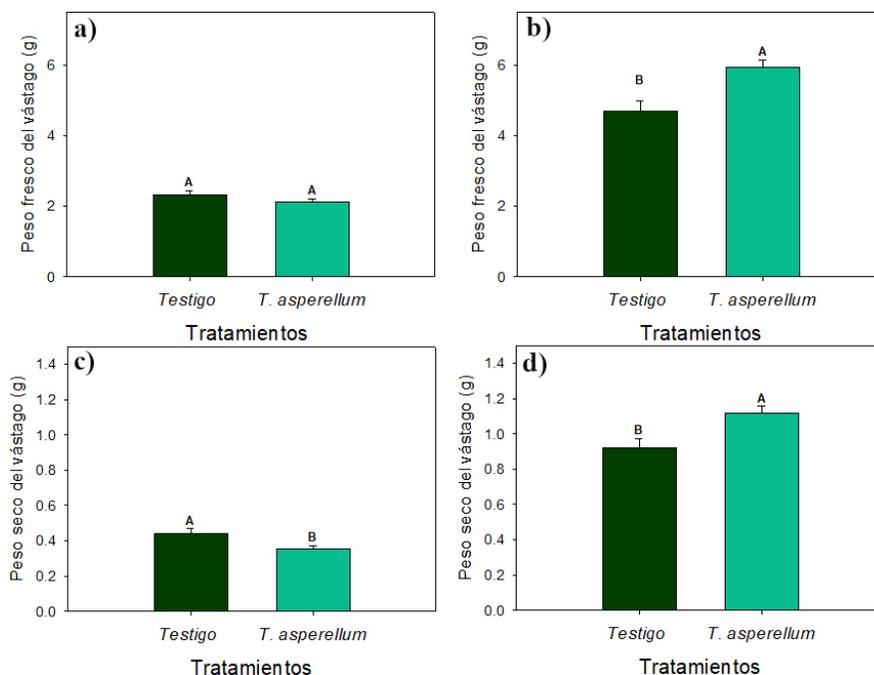
### El papel de *Trichoderma* en el crecimiento inicial de leguminosas

La inoculación con el hongo benéfico *T. asperellum* no tuvo efecto en la altura de las plantas de la leguminosa *P. vulgaris*; no obstante, se favoreció la altura del vástago de *M. pruriens* (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto de *Trichoderma asperellum* en la altura de vástago de *P. vulgaris* (a) y *M. pruriens* (b). Valores promedio +SD, n = 12. Letras diferentes, en cada subfigura, indican diferencias significativas con base en el método LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). **Fuente:** propia.

La inoculación con *T. asperellum* no tuvo efecto en el peso fresco del vástago de las plantas de *P. vulgaris* (Figura 6a). Mientras que en las plantas de *M. pruriens* se tuvo mayor peso fresco de vástago (Figura 6b). Este impacto positivo se confirmó con un aumento en el peso seco del vástago de *M. pruriens* (Figura 6d); contrario a lo obtenido en el peso seco del vástago de *P. vulgaris*, donde se registró un valor significativamente menor al testigo (Figura 6c) con la aplicación de la suspensión de conidios de *T. asperellum*.



**Figura 6.** Efecto de la inoculación de *Trichoderma asperellum* en el peso de vástago. Peso fresco (a) y seco (c) de *P. vulgaris* y peso fresco (b) y seco (d) de *M. pruriens*. Valores promedio +SD, n = 12. Letras diferentes, en cada subfigura, indican diferencias significativas basadas en el método LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). **Fuente:** propia



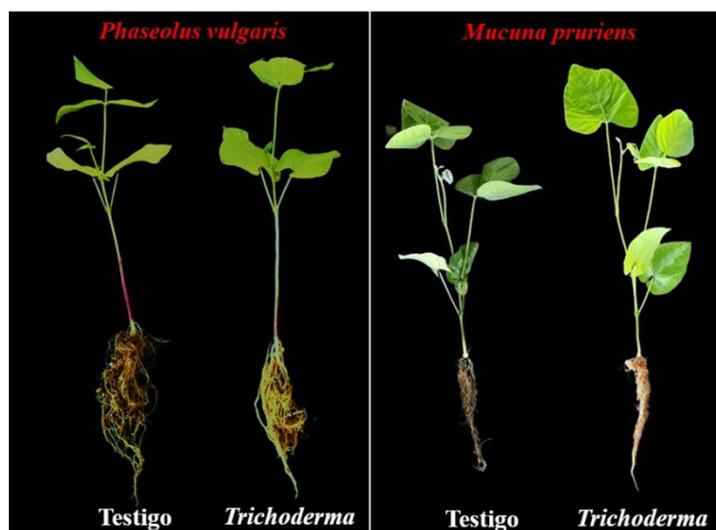
Las plantas de *P. vulgaris* no respondieron a la inoculación *T. asperellum*, ya que no se encontraron diferencias significativas en la longitud de la raíz, el peso de la raíz, el número de hojas, el índice de clorofila o en el número de nódulos (Tabla 2). En el crecimiento de la raíz de *M. pruriens* tampoco hubo efectos positivos del hongo *T. asperellum*, incluyendo la longitud y el peso de la raíz o en la formación de nódulos. Por otro lado, el índice de clorofila fue superior en las hojas de *M. pruriens* tratadas con el hongo benéfico, aunque el número de hojas fue similar en el testigo y con la inoculación de *T. asperellum* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Efecto de *T. asperellum* en el crecimiento vegetativo de plantas de leguminosas

Especie	Tratamiento	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Número de hojas	Índice de clorofila	Número de nódulos
<i>P. vulgaris</i>	Testigo	13.95 ± 1.56 A	1.82 ± 0.53 A	0.18 ± 0.03 A	2.16 ± 0.38 A	22.47 ± 6.73 A	57.6 ± 13.1 A
	<i>Trichoderma</i>	13.63 ± 1.64 A	1.86 ± 0.51 A	0.19 ± 0.04 A	2.00 ± 0 A	24.14 ± 4.04 A	51.3 ± 17.8 A
<i>M. pruriens</i>	Testigo	15.80 ± 1.24 A	3.32 ± 1.10 A	0.24 ± 0.06 A	3.00 ± 0 A	32.1 ± 5.25 A	0.0
	<i>Trichoderma</i>	17.47 ± 2.82 A	3.43 ± 1.08 A	0.27 ± 0.08 A	3.08 ± 0.28 A	39.2 ± 2.74 B	0.0

Valores promedio ± SD, n = 12. Letras diferentes en cada columna representan diferencias significativas con base en el método LSD de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). Fuente: propia

La inoculación con *T. asperellum* no tuvo efectos en el crecimiento de las plantas de *P. vulgaris*; mientras que en *M. pruriens* favoreció el desarrollo de la parte aérea de la planta (Figura 7), principalmente en el tamaño de las hojas, lo que se vio reflejado en el peso fresco y seco del vástago.



**Figura 7.** Plantas de *P. vulgaris* y *M. pruriens* cinco semanas después del inicio de la aplicación del inoculante de *T. asperellum*

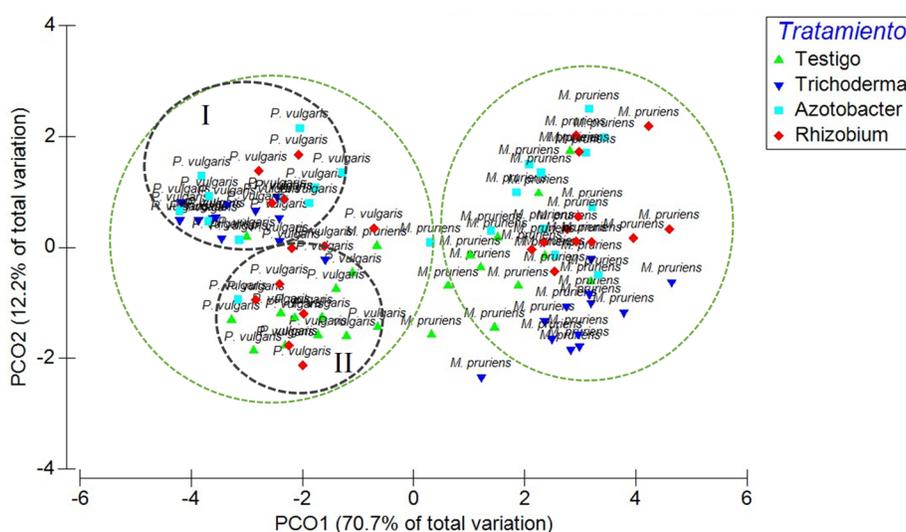
## Análisis de coordenadas principales

El análisis de agrupamiento demostró una clara separación por especie vegetal, un grupo correspondiente a *M. pruriens* y en otro a *P. vulgaris*. En esta última especie se formaron dos subgrupos, el primero se conformó en respuesta a la inoculación con

el biofertilizante *Azotobacter* y el hongo *Trichoderma* (I). El otro subgrupo se constituyó por el testigo y el biofertilizante comercial *Rhizobium* (II). Para el caso de *M. pruriens*, se formó un sólo grupo que incluyó todos los tratamientos evaluados (Figura 8).

No hubo variación atribuida a los tratamientos aplicados (testigo, *Azotobacter*, *Rhizobium* o *Trichoderma*), lo cual se corroboró con el análisis PERMANOVA ( $p = 0.0586$ ); sin embargo, las diferencias entre especies vegetales fueron significativas ( $p = 0.001$ ), así como el efecto entre los insumos dentro de la misma especie también resultaron significativas ( $p = 0.001$ ).

Otro dato interesante es el comportamiento de las plantas testigo, principalmente de *M. pruriens*, que mostraron mayor dispersión y con la aplicación de los microorganismos benéficos se agruparon de forma más cercana, teniendo una respuesta más homogénea en el crecimiento cuando se aplican los biofertilizantes.



**Figura 8.** Análisis de coordenadas principales (PCO) de las especies de leguminosas *P. vulgaris* y *M. pruriens* con la aplicación de los biofertilizantes comerciales *Azotobacter* o *Rhizobium* y el hongo *T. asperellum*. **Fuente:** propia

## Discusión

Las bacterias fijadoras de N de los géneros *Rhizobium* y *Azotobacter* se han empleado como biofertilizantes por su efecto positivo sobre el crecimiento vegetal, para aumentar la disponibilidad de nutrientes como el N y sintetizar hormonas vegetales (Aasfar *et al.*, 2021). En primer ensayo experimental, con la aplicación de dos biofertilizantes comerciales a base de *Rhizobium etli* o *Azotobacter* sp. se obtuvieron diferencias significativas en el número de hojas de plantas de la especie *M. pruriens*. Un efecto similar fue reportado por González *et al.* (2012) en *P. vulgaris*, donde hubo un aumento en el número de hojas trifoliadas en relación con el testigo sin inoculación. A diferencia de lo encontrado en este estudio con la aplicación de los inoculantes comerciales, ya que no se encontraron cambios significativos en el número de hojas, pero incrementó el peso fresco y la longitud de raíz de *P. vulgaris*,



lo que coincide con lo reportado por Dardanelli *et al.* (2008) quienes reportaron un aumento en el peso fresco y la longitud raíz.

En el caso de la presencia de nódulos en las raíces de las leguminosas, es un proceso de importancia fundamental en la fijación biológica de N, debido a la relación simbiótica entre la planta y la bacteria. Con la aplicación de los biofertilizantes comerciales *Rhizobium* o *Azotobacter* sólo se observaron nódulos en la especie *P. vulgaris*. Sin embargo, hubo una menor cantidad de nódulos por planta con respecto al testigo. Específicamente en este trabajo se obtuvieron 21 nódulos en promedio con el tratamiento de *Azotobacter* y 11 con el tratamiento de *Rhizobium*, a diferencia de un estudio realizado por Kumar *et al.* (2016), quienes reportaron 23.4 nódulos por planta; aunque en otra investigación se cuantificaron 10 nódulos por planta en la misma especie (Dardanelli *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que la eficiencia de la nodulación podría estar asociada a la diversidad genética de las variedades de frijol, debido a que se ha encontrado que algunos genotipos de frijol pueden tener una afinidad diferente con distintos simbiontes de rizobios. A su vez, ciertas cepas de rizobios pueden tener una menor eficiencia de nodulación en diferentes variedades o especies de leguminosas, por lo que es probable que existan bacterias que sean específicas de cada variedad o especie de frijol (Menge *et al.*, 2018). Lo cual se comprueba con lo reportado por Triplett & Sadowsky (1992) y Mhamdi *et al.* (2002), quienes demostraron que los diferentes genotipos de frijol presentaron variabilidad en la nodulación. Un incremento en la nodulación, en plantas de frijol con rizobios nativos, se asoció con el hecho de que estos microorganismos nativos están adaptados a los genotipos del frijol específicos y pueden competir eficazmente en la colonización de las raíces (Ben Romdhane *et al.*, 2007). Por esta razón, la selección de cepas es importante para generar un bioinsumo debido a que cada cepa tiene diferentes mecanismos que pueden tener un efecto importante en la nodulación, así como en su capacidad para sobrevivir en climas extremos, tolerar los pesticidas y sobrevivir en el inoculante (Menge *et al.*, 2018; Poveda & Eugui, 2022) o competir con otras bacterias noduladoras, como el caso de *Rhizobium etli*, que fue el tratamiento donde se encontró el menor número de nódulos en *P. vulgaris*.

Respecto a los valores de SPAD que representan el índice de clorofila en las hojas y sirven como indicador clave de la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos en los cultivos, con la aplicación de *Rhizobium* no se obtuvieron cambios significativos en el índice de clorofila en *M. pruriens* o en *P. vulgaris*. Lo que difiere de lo reportado en otro estudio con plantas *P. vulgaris*, donde sí hubo un aumento en el contenido de clorofila asociado a un mayor número de nódulos (Nápoles-García *et al.*, 2016). Aunque los valores SPAD son similares a los obtenidos con el biofertilizante *Rhizobium*, no fue significativo y tampoco se generó un aumento en el número de nódulos.

Con el biofertilizante comercial *Azotobacter* no aumentó el índice de clorofila en las hojas en ambas especies, al contrario, en *P. vulgaris* se encontró un menor índice con respecto al testigo. Por su parte, Nava López *et al.* (2017) reportaron que en plantas de caña no encontraron cambios en los valores SPAD, utilizando *Azotobacter* como biofertilizante. En ese estudio destacan que los niveles de clorofila están asociados a la disponibilidad del N; sin embargo, esto puede cambiar cuando se alcanza un punto de saturación de N en donde se pueden afectar los niveles de clorofila a pesar de que las cantidades de N sean mayores en la fijación bacteriana.

Por otro lado, diferentes especies del género *Trichoderma* son conocidas como hongos promotores del crecimiento vegetal debido a su producción de enzimas solubilizadoras de fosfato y fitohormonas como el ácido indol acético y citoquininas (Poveda & Eugui, 2022). En el segundo ensayo experimental la aplicación de *T. asperellum* tuvo un efecto bioestimulante en el crecimiento de las plantas, reflejándose en mayor altura, peso fresco y seco del vástago en la especie *M. pruriens*. Contrario a lo obtenido en *P. vulgaris*, donde no se obtuvieron cambios significativos en ninguna de las variables evaluadas. A diferencia de lo reportado en otro estudio, donde incrementó la altura de la planta de *P. vulgaris* con la inoculación de *T. asperellum* (González-Marquetti *et al.*, 2021). Esta diferencia pudiera atribuirse al tiempo de inoculación con el hongo, que fue de siete días antes de la siembra de las semillas, lo que permitió un mayor desarrollo de la raíz y como consecuencia mejor absorción de nutrientes en etapas tempranas de crecimiento (González-Marquetti *et al.*, 2021). En otros estudios se reportó un mejor desarrollo y crecimiento en plantas de maracuyá con la aplicación de *T. harzianum*, ejerciendo un efecto positivo en el número de hojas, altura de planta, longitud de raíz, peso seco de la parte aérea y de la raíz con respecto al testigo (Padilla *et al.*, 2020).

En el presente estudio la inoculación de las semillas durante 3 h en una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL no se encontraron diferencias significativas el crecimiento de las plantas de *P. vulgaris*. Mientras que en otra investigación con *P. vulgaris* hubo resultados significativos en el crecimiento de las plantas con 24 h de remojo de las semillas (González-Marquetti *et al.*, 2021). También es probable que el tamaño y la morfología de las semillas influya en el efecto del hongo, aunque el tiempo de contacto con la suspensión fue similar en ambas especies.

Se obtuvo un mayor índice de clorofila en *M. pruriens* con la inoculación de *T. asperellum*, con un valor de 39.2 equivalente a un aumento del 20% con relación al testigo. En el caso *P. vulgaris* no hubo cambios significativos. Se ha reportado que *Trichoderma* aumenta la capacidad fotosintética de las plantas. En un estudio realizado por Colla *et al.* (2015) se encontraron diferencias significativas en el valor SPAD de plantas de lechuga, pepino, chile y melón, aplicando *T. atroviride*, concluyendo que



ese aumento fue resultado de una mayor eficiencia en la biosíntesis de la clorofila debido a la aplicación del bioestimulante.

Zang *et al.* (2014) investigaron la eficiencia de la aplicación de *T. longibrachitum* y observaron un incremento en la cantidad de clorofila, así como en los niveles de enzimas relacionadas con el mecanismo de defensa de la planta (peroxidasa, polifenol oxidasa y la fenilalanina amonio-liasa). En su caso asociaron el crecimiento de la planta con parámetros relacionados con la altura, peso fresco y seco de la planta, así como un aumento en la defensa de la planta con la aplicación del hongo, mejorando su competitividad debido a su efecto en la solubilización de macronutrientes esenciales para el metabolismo de las plantas (Zang *et al.*, 2014).

El desarrollo de bioinoculantes está surgiendo como una estrategia clave para una agricultura sustentable. Este trabajo junto con otros estudios ha demostrado que, de manera individual, tanto las bacterias *Rhizobium* y *Azotobacter* como el hongo *Trichoderma* tienen un efecto positivo como promotores del crecimiento de las plantas cultivadas. Esto está dando pauta a que su combinación puede ofrecer una sinergia entre *Trichoderma* y las bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que resultaría en más beneficios para los cultivos y lo convierte en una alternativa prometedora para el crecimiento y para el control de enfermedades de las plantas, incluyendo las provocadas por virus y la tolerancia al estrés abiótico (Poveda & Eugui, 2022). Sin embargo, se requiere de más estudios para comprender los mecanismos que se desencadenarían por el efecto sinérgico de estos microorganismos, lo que sería crucial para el desarrollo de formulaciones de bioinsumos eficaces.

## Conclusiones

Los biofertilizantes comerciales que contienen *Azotobacter* o *Rhizobium* favorecieron de manera diferencial el crecimiento de las plantas, en *P. vulgaris* hubo mayor peso fresco de la raíz y en *M. pruriens* estimularon la formación de hojas. El mayor potencial en el crecimiento vegetativo se encontró con la inoculación de *T. asperellum* al mejorar los parámetros de crecimiento de la parte aérea de las plantas de *M. pruriens* (mayor altura de planta, peso fresco y seco del vástago e índice de clorofila).

Las bacterias *Azotobacter* y *Rhizobium*, así como el hongo *T. asperellum*, mostraron efectos positivos en algunas variables del crecimiento de las leguminosas *P. vulgaris* y *M. pruriens* durante la etapa vegetativa. Debido a estos resultados, los próximos estudios tendrían que estar enfocados en identificar el efecto de estos microorganismos en el rendimiento de los cultivos y en la calidad de las semillas.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.



## Financiamiento

Se agradece a CIATEJ por el financiamiento del proyecto “Maximizando el potencial del frijol *Mucuna*: estudio de su potencial nutracéutico y agronómico para su uso integral” (*Mucuna*), en el marco de la convocatoria PIICs 2023.

## Agradecimientos

Se agradece a la M.C. Edna Esquivel Miguel por la cepa de *T. asperellum* y su identificación molecular.

## Referencias

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in microbiology*, *12*, 628379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>
- Alcázar-Valle, M., García-Morales, S., Mojica, L., Morales-Hernández, N., Sánchez-Osorio, E., Flores-López, L., Enríquez-Vara, J. & Lugo-Cervantes, E. (2021). Nutritional, antinutritional compounds and nutraceutical significance of native bean species (*Phaseolus* spp.) of mexican cultivars. *Agriculture*, *11*(11), 1031. <https://doi.org/10.3390/agriculture11111031>
- Botello-Villagrana, F., & Martínez-Ramírez, D. (2021). *Mucuna pruriens* as adjunct therapy to levodopa in advanced Parkinson's disease. *Revista mexicana de neurociencia*, *22*(5), 180-183. <https://doi.org/10.24875/rmn.21000010>
- Ben Romdhane, S., Tajini, F., Trabelsi, M., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007). Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 1195-1201. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9325-z>
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(8), 1706-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Dardanelli, M. S., de Cordoba, F. J. F., Espuny, M. R., Carvajal, M. A. R., Díaz, M. E. S., Serrano, A. M. G., Ocon, Y. & Megías, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(11), 2713-2721. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.06.016>
- González, R. L., Sosa, B. N., & Díaz, R. B. (2012). Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y *Mycorriza* en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9



- negro. *Centro Agrícola*, 39(4), 17-20. Recuperado de <https://biblat.unam.mx/es/revista/centro-agricola/articulo/efecto-de-la-aplicacion-de-rhizobium-y-mycorriza-en-el-crecimiento-del-frijol-phaseolus-vulgaris-l-variedad-cc-25-9-negro>
- González-Marquetti, I., Ynfante-Martínez, D., Gorrita, S., Morales-Mena, B., Nápoles, M. C., Delgado-Oramas, B. P., & Martínez-Coca, B. (2021). Efectos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y Azofert® sobre el crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. *Revista de Protección Vegetal*, 36(3), 1-9. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522019000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200004&lng=es&tlng=es).
- Hernández Melchor, D. J., Carmona Jiménez, J., Hidalgo Lara, M. E., Dendooven, L., Marsch Moreno, R., & Canizares Villanueva, R. O. (2016). Phylogenetic and morphological identification of a photosynthetic microbial consortium of potential biotechnological interest. *Hidrobiológica*, 26(2), 311-321. Recuperado de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972016000200311](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972016000200311)
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Isidra-Arellano, M. C., & Valdés-López, O. (2022). ¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo?. *Revista de Educación Bioquímica*, 41(2), 51-65. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=106596>
- Kumar, P., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2016). Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in both pot and field studies. *Rhizosphere*, 2, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.09.002>
- Lampariello, L. R., Cortelazzo, A., Guerranti, R., Sticozzi, C., & Valacchi, G. (2012). The Magic Velvet Bean of *Mucuna pruriens*. *Journal of traditional and complementary medicine*, 2(4), 331-339. [https://doi.org/10.1016/s2225-4110\(16\)30119-5](https://doi.org/10.1016/s2225-4110(16)30119-5)
- León-Rojas, G. I., Rodríguez-Soto, C., & Padilla-Loredo, S. (2020). La conservación *in situ* del frijol criollo: construyendo soberanía alimentaria en el sureste del Estado de México. *Revista CoPaLa. Construyendo Paz Latinoamericana*, 5(9), 125-141. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=6681709960112500-8870>
- Liu, L., Zhang, X., Xu, W., Liu, X., Li, Y., Wei, J., Gao, M., Bi, J., Lu, X., Wang, Z. & Wu, X. (2020). Challenges for global sustainable nitrogen management in agricultural systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(11), 3354-3361. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00273>

- Medina-García, G., Ruiz-Corral, J. A., Rodríguez-Moreno, V. M., Soria-Ruiz, J., Díaz-Padilla, G., & Zarazúa Villaseñor, P. (2016). Efecto del cambio climático en el potencial productivo del frijol en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(spe13), 2465-2474. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i13.461>
- Menge, E. M., Njeru, E. M., Koskey, G., & Maingi, J. (2018). Rhizobial inoculation methods affect the nodulation and plant growth traits of host plant genotypes: a case study of common bean *Phaseolus vulgaris* L. germplasm cultivated by smallholder farmers in Eastern Kenya. *Advances in Agricultural Sciences*, 6, 77-94. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/328886447>
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., & Amarger, N. (2002). Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1), 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00968.x>
- Miranda, M. D. S. (2022). Potencial de aislados de *Trichoderma* spp como promotor de crecimiento en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Nexo Revista Científica*, 35(04), 924-934. <https://doi.org/10.5377/nexo.v35i04.15529>
- Nápoles García, M. C., Cabrera Pino, J. C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández Forte, I., Martínez González, L., & Núñez Vázquez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4466.8405>
- Nava-López, L. F., Camacho-Millán, R., Aguilar-Medina, E. M., Romero-Navarro, J. G., Sosa-Pérez, R., Ruiz-Abitia, A. I., Cárdenas-Cota, H. & Ramos-Payán, R. (2017). Formulación de biofertilizantes a partir de aislados regionales de *Azotobacter* y *Azospirillum* y su efecto en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en casa sombra. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(2), 183-195. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.183>
- Padilla, G. D., Yzquierdo, G. A. R., Montana, L., Salas, T. C. M., Basso, C., & Montesuma, M. A. A. (2020). Efecto de la aplicación de bioestimulantes y *Trichoderma* sobre el crecimiento en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en vivero. *Bioagro*, 32(3), 195-204. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7901981>
- Poveda, J., & Eugui, D. (2022). Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. *Biological Control*, 176, 105100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100>
- Quiñones-Reyes, G., Ayala-Luján, J. L., & Aguayo-Rojas, J. (2021). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de variedades de frijol sem-



- bradas en el estado de Zacatecas. *Acta universitaria*, 31, e3059. <https://doi.org/10.15174/au.2021.3059>
- Rodríguez-García, D., & Vargas-Rojas, J. (2022). Efecto de la inoculación con *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetativo del tomate (*Solanum lycopersicum*). *Agronomía Costarricense*, 46(2), 47-60. <https://doi.org/10.15517/rac.v46i2.52045>
- Triplett, E. W., & Sadowsky, M. J. (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual review of microbiology*, 46(1), 399-422. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002151>
- Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2014). Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *BioControl*, 59, 319-331. <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9566-y>