



# Efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Capsicum Annuum* en condiciones de laboratorio

Effect of *Trichoderma viride* and *Bradyrhizobium yuanmingense* on growth of *Capsicum annuum* under laboratory conditions

Rosa Salinas Ventura y Bertha Soriano Bernilla

<sup>1</sup>Tesista, Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de *Trichoderma viride* FP-UNT 01 nativa coinoculado con *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 455-02 en el crecimiento de *Capsicum annuum* "ají paprika" en condiciones de laboratorio. Para lo cual se reactivaron los cultivos microbianos, *B. yuanmingense* en medio agar extracto de levadura manitol rojo de congo a 28°C por 7 días y *T. viride* en agar Sabouraud a temperatura ambiente de 20-22 °C por 4 a 5 días. Los grupos de estudio consistieron en inóculos de *T. viride* y *B. yuanmingense* puros (controles positivos) y combinados (grupo experimental) así como un grupo control negativo inoculado con agua destilada estéril, aplicados a las semillas de *C. annuum* "ají paprika". Se realizó la evaluación a los 20 y 30 días después de la inoculación, en donde se determinó que las plántulas coinoculadas con *T. viride* y *B. yuanmingense* (grupo experimental) presentó valores estadísticamente significativos respecto al control negativo en las variables agronómicas evaluadas como longitud de raíz y peso seco de la parte radicular. El grupo control inoculado con *B. yuanmingense* (control positivo), presentaron valores estadísticamente significativos en comparación con el control negativo para las variables agronómicas evaluadas como: longitud de tallo, hoja, raíz; número de raíces laterales y peso seco de la parte aérea y parte radicular; mientras que el grupo control inoculado con *T. viride* presentó valores estadísticamente significativos respecto al control negativo en las variables agronómicas evaluadas como longitud de raíz, número de raíces laterales y peso seco de la parte radicular.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, *Capsicum annuum*, inoculación

## ABSTRACT

The effect of *Trichoderma viride* FP- UNT 01 native coinoculated with *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 455-02 in the growth of *Capsicum annuum* " paprika pepper " in laboratory conditions was evaluated. For microbial cultures which were reactivated *B. yuanmingense* extract agar medium of congo red yeast mannitol at 28 ° C for 7 days and *T. viride* in agar Sabouraud at room temperature of 20-22 ° C for 4 to 5 days. The study groups consisted of *T. viride* inoculum and *B. yuanmingense* pure (positive controls) and combined (experimental group) and a negative control group inoculated with sterile distilled water, applied to the seeds of *C. annuum* " pepper paprika". Assessment at 20 and 30 days after inoculation , where it was determined that seedlings co-inoculated with *T. viride* and *B. yuanmingense* (experimental group) showed statistically significant values relative to negative control in agronomic variables such as length was performed root dry weight of the root part . The control group inoculated with *B. yuanmingense* (positive control), statistically significant values compared with the negative control for agronomic variables such as length of stem, leaf, root; number of lateral roots and dry shoot and root weight part; while the control group inoculated with *T. viride* showed statistically significant values relative to negative control in agronomic variables such as root length, number of lateral roots and root dry weight of the part.

**Keywords:** *Bradyrhizobium*, *Trichoderma*, *Pisum sativum*, inoculation

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Capsicum annuum* “ají paprika”, la solanácea más importante después de la papa debido a su agradable sabor, poder estimulante y elevado contenido en vitaminas, tiene importancia debido a los altos ingresos económicos que es posible obtener por unidad de superficie con tres destinos de consumo: pimiento en fresco, para pimentón y para conserva<sup>1,2</sup>. Sin embargo, el sector pimentonero enfrenta dificultades económicas debido a la baja rentabilidad del cultivo debido a las malas prácticas culturales (nivelado, preparación del suelo, rotaciones, trasplante, fertilización, control sanitario, etc.) y a las plagas: insectos (pulguilla, polilla del Pimiento, bicho moro, trips, chinche verde y vaquitas) y nematodos<sup>3,4,5</sup>.

Los residuos tóxicos productos del uso continuo de pesticidas que afectan la salud de los trabajadores, animales y deterioran el ambiente, ha conducido a la aplicación de controladores biológicos, entre ellos, especies del género *Trichoderma* que posee buenas cualidades para el control de enfermedades causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*<sup>5,6,7,8,9,10</sup>. Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa<sup>7,8,9,10</sup>.

Al mismo tiempo, la producción de leguminosas y hortalizas se ve afectada por las condiciones de bajo contenido de nitrógeno en el suelo que, a pesar de su gran abundancia en el aire, de poco les sirve a las plantas y animales debido a que son incapaces de fijarlo y aprovecharlo; por fortuna, existen microorganismos que sí son capaces de fijar ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables<sup>9,10,11,12,13</sup>. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno (f<sub>bn</sub>) y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos, ya que su uso ha ocasionado graves problemas de contaminación<sup>9,12,13,14</sup>.

Los organismos que forman simbiosis con plantas leguminosas pertenecen al subgrupo de las proteobacterias: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (recientemente incluido en *Ensifer*) y se reciben en conjunto la denominación genéricamente de rizobios<sup>14,15,16</sup>. *Rhizobium* forma nódulos con leguminosas de origen templado, presenta un crecimiento rápido en vida libre y los genes relacionados con la fijación se encuentran en plásmidos, en tanto que *Bradyrhizobium* ha conservado la capacidad de fijar nitrógeno en condición de endosimbiosis en las leguminosas y, por ello, se ha constituido en uno de los microorganismos de mayor utilidad en la práctica agrícola<sup>17,18</sup>.

Las interacciones entre plantas y las llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) en la rizosfera (rizobacterias), entonces, pueden mejorar los rendimientos de la cosecha en razón de que estimulan directamente el crecimiento de plantas mediante la producción de fitohormonas y mediante el aumento de la absorción de nutrientes, microelementos, y sustancias de utilizad como K, P, en forma de ácido fosfórico y N atmosférico; este proceso, llamado fijación biológica de nitrógeno, sólo se presenta en procariontes y depende de la capacidad de los microorganismos de convertir el N<sub>2</sub> atmosférico en formas asimilables para las plantas (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), para ser incorporado de esta forma a componentes nitrogenados de la célula<sup>12,20,21,22,23</sup>.

La capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada por varias décadas, sin embargo, en los últimos años este estudio ha sido intensificado porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de las simbiosis a otros cultivos no leguminosas<sup>24,25,26,27</sup>. Así, por ejemplo, se evaluó el efecto de 19 cepas de *Rhizobium* en la germinación y en el crecimiento de plantas de *Lycopersicon esculentum* en condiciones de invernadero verificándose que varias cepas de *Rhizobium* pueden estimular la germinación de semillas de tomate y promover su crecimiento<sup>16</sup>, similares resultados se encontraron en plantas no leguminosas: *R. leguminosarum* bv *trifolii* y *Bradyrhizobium* en raíces de arroz y *R. etli* en raíces de maíz<sup>21,28</sup>.

En relación a la inoculación mixta de microorganismos, se conoce que *Bradyrhizobium* o *Rhizobium*, en combinación con cepas de *Azotobacter* y *Azospirillum*, promueven el crecimiento vegetal, mejoran la nodulación, la actividad de la nitrogenasa y aumentan el contenido de nitrógeno<sup>29,30,31,32,33,34,35</sup>. Sin

embargo, el efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Capsicum annuum* no es conocida.

Considerando que actualmente se pretende disminuir la contaminación producida por el aporte de pesticidas y fertilizantes nitrogenados, la presente investigación busca determinar el efecto de *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* en el crecimiento de plántulas de *C. annuum* “ají paprika” en condiciones de laboratorio mediante la evaluación de las variables agronómicas: la longitud (de tallo, hoja y raíz), número de raíces laterales, peso seco de la parte aérea y de la parte radicular de las plántulas en mención.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

- Cultivo puro de *Trichoderma viride* FP-UNT 01 nativa caracterizado e identificado en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Cultivo puro de *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 455-02 aislado y caracterizado en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo, e identificado molecularmente en Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología "Marino Tabusso" de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Semillas certificadas de *Capsicum annuum* “ají paprika” adquiridas de la casa comercial Agrotec, Trujillo, La Libertad
- 10 kg de suelo agrícola obtenido de los campos de cultivo del distrito de Moche.

### Reactivación, propagación y estandarización del inóculo de esporas de *T. viride* FP-UNT 01 nativa.

La reactivación de *T. viride* FP-UNT 01 nativa, a partir del cultivo puro se procedió a resembrar por puntura en frascos planos inclinados con Agar Sabouraud (AS), se incubó durante 4 a 5 días a temperatura del laboratorio. Luego se propagó en 3 frascos planos conteniendo AS, se incubó durante 4 a 5 días a temperatura del laboratorio. El inóculo de esporas se obtuvo agregando 20 mL de agua destilada estéril a cada frasco plano con AS que contiene a *T. viride* FP-UNT 01 nativa. Se agitó moderadamente con el fin de liberar las esporas del hongo y la suspensión resultante se colocó en un frasco estéril, luego se determinó la concentración de esporas mediante el recuento en Cámara de Neubauer. Esta suspensión fue diluida con agua destilada estéril hasta obtener 100 mL a una concentración final de  $9 \times 10^8$  esporas/mL.

### Reactivación y propagación del cultivo de *B. yuanmingense* Rc 455-02.

Para la reactivación de *B. yuanmingense*, a partir del cultivo puro se procedió a resembrar en placas petri conteniendo Agar Manitol Extracto de Levadura Rojo de Congo (ELMARC) se incubó durante 7 días a 28 °C. A partir de los cultivos puros de *B. yuanmingense* resembrados, se propagó en cuatro frascos de superficie plana estériles conteniendo Agar Extracto de Levadura Manitol (ELMA) y se incubarán durante 7 días a 28°C.

### Estandarización de la suspensión bacteriana de *B. yuanmingense* Rc 455-02.

A partir de los cultivos propagados se realizó la suspensión de *B. yuanmingense* en un volumen de 10 mL de SSF, se diluyó hasta obtener 100 a una concentración aproximada de  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL, comparando con el tubo N° 04 del sistema de Mac Farland. Luego se hizo diluciones seriadas de la suspensión y la siembra de 0.1 mL por superficie en placas conteniendo agar ELMARC luego se incubaron a 28 °C por 7 días para realizar el recuento en placa y obtener el inóculo inicial, el cual nos dio  $1.9 \times 10^9$  UFC/mL.

### Obtención y preparación del suelo agrícola para los tratamientos de estudio.

El suelo que se utilizó fue de uso agrícola. Se recolectó 10 Kg de suelo, tomando a partir de 2 cm de la superficie hasta una profundidad de 15 cm, el cual se tamizó; esterilizó en autoclave a 121 °C a 15 lb de presión por 15 minutos por 3 veces, luego fue secado a 60 °C por 24 horas en el horno. Se determinó los parámetros físicos y químicos del suelo como: textura, pH, materia orgánica, concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en Laboratorio de Servicios a la Comunidad e Investigación (LASACI) de la Universidad Nacional de Trujillo. Finalmente se distribuyó 10 g de suelo en cada pocillo del germinador.

### **Tratamiento y porcentaje de germinación de las semillas de *C. annuum***

Las semillas se lavaron dos veces con agua de mesa, posteriormente con agua destilada estéril (ADE), después fueron sumergidas en alcohol al 70% durante 45 segundos y se lavaron cinco veces con ADE; luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2 % por 2 minutos y finalmente se lavó con ADE cinco veces. Luego de la desinfección de las semillas se colocaron 50 semillas en placas Petri conteniendo 1 capa de papel filtro sobre una base de algodón humedecido con agua destilada estéril hasta observar el 86 % ó 100% de germinación.

### **Inoculación de semillas germinadas de *C. annuum* con *B. yuanmingense* Rc 455-02 y esporas de *T. viride* FP-UNT 01 nativa.**

Al transcurrir 6 días y observar que las semillas han germinado, se seleccionaron por uniformidad en tamaño y color para inocular *B. yuanmingense* y *T. viride* según los grupos de estudio definidos. Se utilizó 240 semillas las cuales fueron distribuidas en 120 semillas para tres repeticiones en la primera evaluación a los 20 días y 120 semillas para tres repeticiones en la segunda evaluación a los 30 días.

#### **Grupos Controles**

- **Control negativo (C<sub>0</sub>):** se inoculó 1mL de agua destilada estéril a cada semilla germinada.
- **Control positivo 1 (C<sub>1</sub>):** se inoculó 1mL de la suspensión de *B. yuanmingense* en concentración de  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL a cada semilla germinada.
- **Control positivo 2 (C<sub>2</sub>):** se inoculó 1mL de la suspensión de esporas de *T. viride* en concentración de  $9 \times 10^8$  esporas/mL a cada semilla germinada.

**Grupo experimental (G<sub>E</sub>):** Se inoculó 0.5ml de la suspensión de *B. yuanmingense* en concentración de  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL y 0.5ml de la suspensión de esporas de *T. viride* en concentración de  $9 \times 10^8$  esporas/mL a cada semilla germinada.

#### **Siembra de semillas de *C. annuum***

Cada semilla inoculada fue sembrada en un respectivo pocillo del germinador conteniendo 10 g de suelo agrícola estéril, a una profundidad de 1 cm. Se mantuvo una temperatura aproximada de  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$  y se regó periódicamente con 1 mL de solución nutritiva de Jensen modificada libre de nitrógeno, diluida al  $\frac{1}{4}$ .

#### **Evaluación del efecto de *B. yuanmingense* Rc 455-02 y coinoculado con *T. viride* FP-UNT 01 nativa en el crecimiento de *C. annuum***

Transcurrido 20 y 30 días después de inoculadas las semillas germinadas se realizó la primera y segunda evaluación respectivamente. Para ello se cosecharon las plántulas de *C. annuum* y se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de suelo, luego se realizó la evaluación del efecto de *B. yuanmingense* y *T. viride* por separado y mezcla de ambos, para lo cual se obtuvo los valores de las seis variables agronómicas como: longitud de tallo, hoja, raíz, número de raíces laterales, peso seco de la parte aérea y de la parte radicular del vegetal.

#### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se procesaron mediante la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA) y la Mínima Diferencia Significativa (MDS) o llamada prueba de Tukey, para determinar las diferencias significativas de cada variable agronómica entre los grupos experimentales con respecto al control.

## **RESULTADOS**

En relación a la longitud promedio de tallo de las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días después de la inoculación (Fig. 1), se observó que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son semejantes en comparación con el control inoculado con *T. viride* y el control negativo, y menor en comparación con el control inoculado con *B. yuanmingense* ( $p > 0.05$ ).

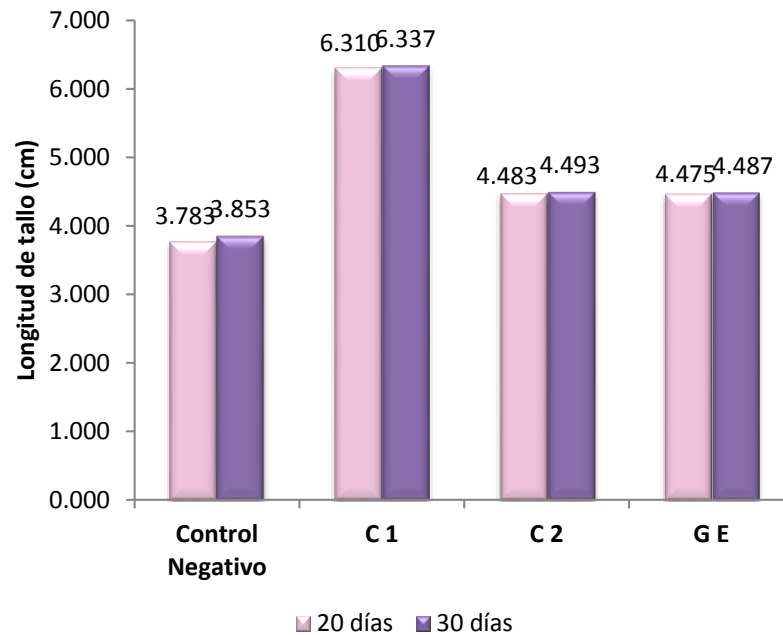
Respecto de la longitud promedio de hoja de las plántulas a los 20 y 30 días después de la inoculación (Fig. 2), se observó que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son semejantes al control inoculado con *T. viride* y el control negativo y menor comparado con el control inoculado con *B. yuanmingense* ( $p > 0.05$ ).

El análisis del promedio de longitud de raíz de las plántulas a los 20 y 30 días después de la (Fig. 3) permitió observar que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son semejantes comparados con el control inoculado con *T. viride* y estos dos a su vez son mayores comparados con el control negativo ( $p < 0.05$ ) pero menores comparados con el control inoculado con *B. yuanmingense* ( $p > 0.05$ ).

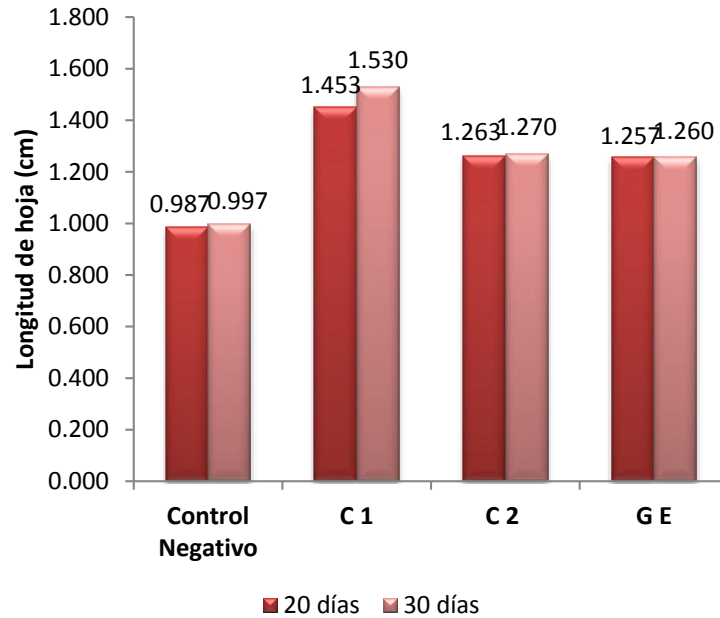
En la Fig 4 se muestra el promedio del número de raíces laterales de las plántulas a los 20 y 30 días después de la inoculación. Se observa que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son menores en comparación a los control inoculados con *B. yuanmingense* y con *T. viride* respectivamente y semejante al control negativo ( $p > 0.05$ ).

En la Fig. 5 se muestra el promedio del peso seco de la parte aérea de las plántulas a los 20 y 30 días después de la inoculación. Se observa que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son semejantes en comparación con el control inoculado con *T. viride* y el control negativo, y menor en comparación con el control inoculado con *B. yuanmingense* ( $p > 0.05$ ).

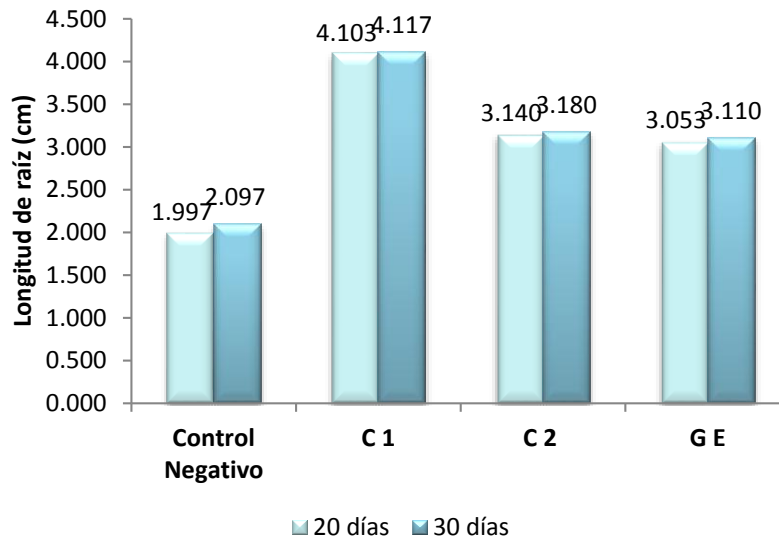
En la Fig. 6 se muestra el promedio del peso seco de la parte radicular de las plántulas a los 20 y 30 días después de la inoculación. Se observa que los valores obtenidos en el grupo experimental: *T. viride* coinoculado con *B. yuanmingense* son semejantes en comparación con el control inoculado con *T. viride* y estos dos a su vez son mayores en comparación con el control negativo ( $p < 0.05$ ) pero menores en comparación con el control inoculado con *B. yuanmingense* ( $p > 0.05$ ).



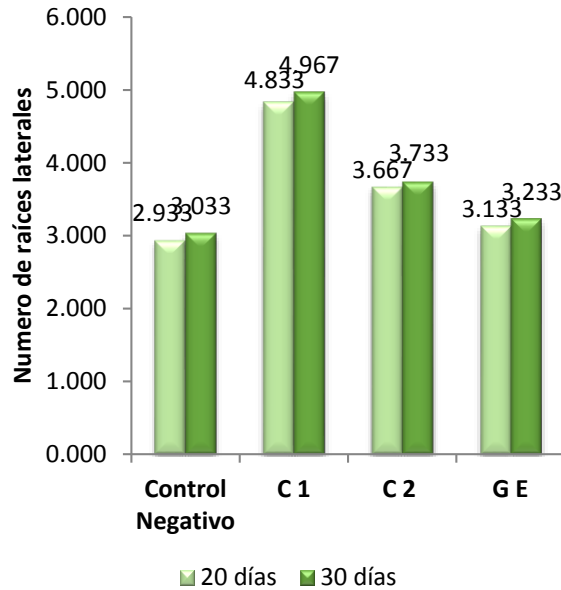
**Fig. 1.** Longitud promedio del tallo de *Capsicum annuum* “aji paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trychoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles inoculados *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p < 0.05$ ).



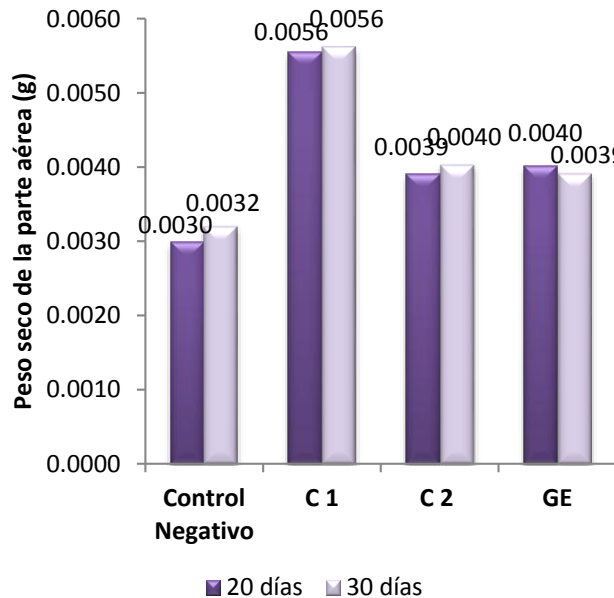
**Fig. 2.** Longitud promedio de hojas *Capsicum annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trichoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles inoculados *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p < 0,05$ ).



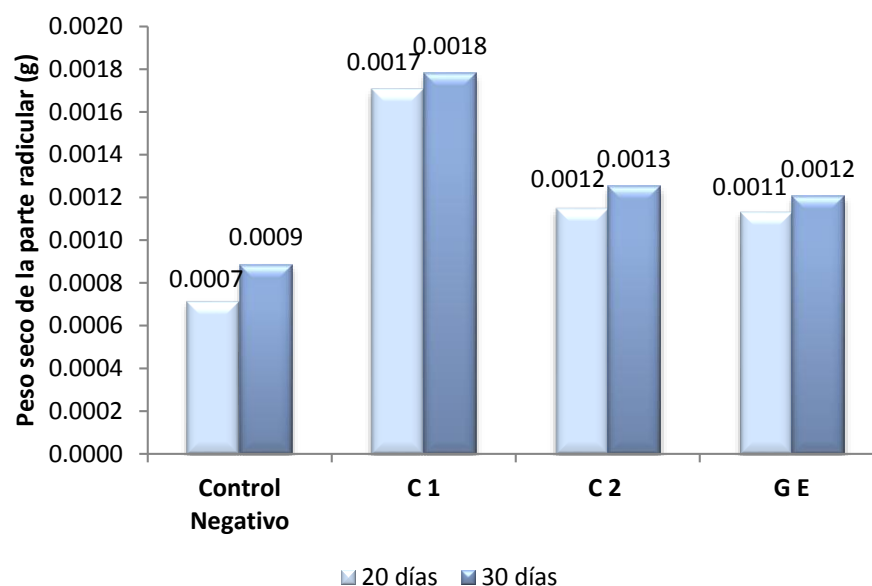
**Fig. 3.** Longitud promedio de raíz de *Capsicum annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trichoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles inoculados *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p > 0,05$ ).



**Fig. 4.** Promedio del número de raíces laterales de *Capsicum annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trichoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 5.** Promedio de peso seco de la parte aérea de *Capsicum annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trichoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 6.** Promedio peso seco de la parte radicular de *Capsicum annuum* “ají paprika” a los 20 y 30 días de coinoculadas con *Trichoderma viride* FP - UNT 01 y *Bradirhizobium yuanmingense* Rc 455 – 02 (GE) en comparación con los grupos controles *B. yuanmingense* Rc 455 – 02 (C1), *T. viride* FP - UNT 01 (C2) y un control negativo en condiciones de laboratorio ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Hoy en día, los biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera<sup>26,30,31</sup>.

Las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” coinoculadas con *T. viride* y *B. yuanmingense* no mostraron valores estadísticamente significativos para las variables evaluadas: longitud de tallo, hoja, número de raíces laterales y peso seco de la parte aérea en comparación con los tres grupos controles. Estos resultados pueden deberse a la existencia de la llamada competencia biológica donde hay interacción biológica entre seres vivos en donde se descubre que la adecuación biológica de uno es reducida a consecuencia de la presencia del otro al disputarse alguna fuente de nutrientes o ubicación espacial<sup>16,33</sup>.

El término ‘competencia’ comprende un enorme rango de fenómenos. De allí se entiende que la adaptación de *T. viride* contribuyó al éxito competitivo con *B. yuanmingense*. Dado que es en la rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patógenas, normalmente, compiten por espacio y por nutrientes<sup>34,35</sup>.

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica; y la multifuncionalidad de estos en los sistemas agrícolas, se expresa de acuerdo a una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta-microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como la climatología, las características físicas y químicas del



suelo, que influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o detrimentales, determinantes en el desarrollo de las especies vegetales<sup>8,15,24</sup>.

La interacción de las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) como *B. yuanmingense* y hongos del género *Trichoderma*, dependen de este tipo de factores para expresar sus potenciales efectos benéficos; sin embargo, las interacciones entre los microorganismos son complejas y se pueden presentar efectos sinérgicos que potencialicen los beneficios para la planta o por el contrario, como en este trabajo, efectos antagónicos, reflejándose en los resultados donde las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” coinoculadas con dichos microorganismos no mostraron efectos estimulante en su crecimiento para algunas variables agronómicas como longitud de tallo, hoja, número de raíces laterales y peso seco de la parte aérea en comparación con los grupos controles. La respuesta de las plántulas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así presenta diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos<sup>8,15,24,35</sup>.

Es así que el ejemplo más conocido de antagonismo entre microorganismos es la producción de antibióticos, al disputarse alguna fuente de nutrientes o ubicación espacial. En un estudio químico de los metabolitos antibióticos segregados por *Trichoderma* se demostró que estos son segregados cuando existe una verdadera competencia con otros microorganismos para asegurar su crecimiento y supervivencia en el suelo<sup>32,35</sup>. Lo cual se comprueba en esta investigación dado que, las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” coinoculadas con *B. yuanmingense* y *T. viride* no mostraron efectos en su crecimiento para algunas variables agronómicas, es decir no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) respecto a los grupos controles, esto pudo haberse debido a que *T. viride* haya producido metabolitos antibióticos evitando el crecimiento y adecuación de *B. yuanmingense* y por ende su efecto estimulante.

Cabe mencionar que a excepción de *B. yuanmingense*, otras tres especies en este género, *B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense* por diferencias en sus secuencias de ADN, en los patrones de enzimas metabólicas y de exopolisacáridos, en su contenido de ácidos grasos y hemoproteínas presentan diferencias en sus patrones de resistencia a antibióticos<sup>9,12,14</sup>, siendo así otra de las posibles causas a que *B. yuanmingense* no haya sobrevivido a la competencia a la que se vio enfrentado con *T. viride* y sus metabolitos antibióticos.

Este efecto no estimulante en plántulas de *C. annuum* “ají paprika” pudo haberse debido también que la coinoculación de *T. viride* y *B. yuanmingense* en semillas germinadas de *C. annuum* fue de 0.5 ml de cada suspensión a una concentración de  $9 \times 10^8$  esporas/ml y  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL UFC/ml respectivamente, por lo que se infiere que *T. viride* presentó un alto grado de competencia por nutrientes y espacio ante *B. yuanmingense*. Si bien es cierto que las bacterias son los organismos más numerosos en el suelo, los hongos dado su mayor tamaño aunque menor abundancia tienen la mayor biomasa en el suelo la cual bien podría significar mayor necesidad de nutrientes, se debe considerar que *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos antimicrobianos<sup>27,28,29,32</sup>. Además la población de bacterias inoculadas siempre disminuye en la rizosfera hasta estabilizarse, esto puede estar relacionado con el cambio de medio de crecimiento, o también que las bacterias, en general, presentan dificultades para adaptarse y desplazarse a lo largo de la raíz<sup>30</sup>. Como se demuestra en otras investigaciones donde se encontró que cepas de *Azospirillum zeae* y *A. canadense* (PGPR) fueron colonizadas por la cepa de *Trichoderma*; es decir hubo interacción negativa, con predominio de *Trichoderma*<sup>32,35</sup>.

En contraste, las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” coinoculadas con de *T. viride* y *B. yuanmingense* mostraron valores significativos en las variables como longitud de raíz y peso seco de la parte radicular en comparación con el control negativo y semejante a unos de los controles positivos donde se inoculó sólo a *T. viride* y menores al control donde se inoculó sólo a *B. yuanmingense*. Algunos investigadores, trabajando con experimentos en macetas, encontraron incrementos en la producción de materia seca debido a la coinoculación respecto de la inoculación simple, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo<sup>33,35</sup>. Otros investigadores informaron acerca de las ventajas de la coinoculación de plantas con rizobios y *Trichoderma* en *Vigna radiata*, leguminosa de importancia en la

alimentación del ganado<sup>26</sup>. También existen informes sobre las ventajas de la coinoculación de otras bacterias rizosféricas y *Trichoderma* en cultivos de frijol<sup>25</sup>.

Los resultados de la presente investigación permite afirmar que la coinoculación de *T. viride* y *B. yuanmingense* haya sido compatible debido a que no mostraron valores estadísticamente significativos en comparación al control negativo en otras variables como se mencionó anteriormente. Esto pudo haberse debido al efecto benéfico de *T. viride* solo debido que los valores obtenidos son semejantes al control donde se inoculó a *T. viride* por separado, dado que, este hongo puede encontrarse tanto fuera como dentro de la rizosfera; cuando está dentro de la rizosfera puede colonizar y proteger a la raíces de las plantas, varios autores han señalado el incremento en peso de las plántulas que se desarrollan en presencia de este hongo, otros investigadores encontraron que la coinoculación de hongos con *Azospirillum* sp en tomate, el hongo coloniza la raíz estimulando una mejor absorción de nutrientes<sup>25</sup>.

Los resultados hasta aquí expuestos, constituyen un aporte al estudio de la relación simbiótica entre hongos-PGPR-hortalizas, como una vía para mantener un estado nutricional adecuado de las plantas de *C. annuum* “ají paprika” con menor aplicación de fertilizante mineral. Es importante mencionar que las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” inoculadas con *B. yuanmingense* por separado (control positivo 1) mostraron valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para todas las variables agronómicas evaluadas en comparación con el control negativo, el control positivo inoculado con *T. viride* por separado y el grupo experimental en el cual está la coinoculación de ambos microorganismos; estos resultados darían a entender que *B. yuanmingense* tiene efecto en el crecimiento de las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” siempre que este solo y no en competencia con otros microorganismos y más aún que estos produzca antibióticos.

Estos resultados corroboran lo encontrado por diversos autores con relación al empleo del género *Bradyrhizobium* como lo es en el caso de Díaz Zorita quien encontró incremento en el rendimiento de soja con inoculación simple de *B. japonicum*, otros estudios y ensayos han detectado la acumulación de materia seca aérea y de masa radical es mayor en los casos de soja inoculada con *Bradyrhizobium* que en aquellos que no se ha realizado ningún tipo de biofertilización<sup>[59]</sup>. Por otro lado, hay que enfatizar que los efectos de los biofertilizantes en el desarrollo radicular, ayuda a una mayor solubilidad y conductividad de nutrientes; se traducen en un mayor aprovechamiento de la humedad del suelo y, por lo tanto, en el uso más racional del agua y una mayor resistencia a la sequía<sup>14</sup>. En otras investigaciones se encontró que la variable altura, también en plantas de soja al momento de la cosecha mostro diferencia con el tratamiento de inoculación simple de *B. japonicum* en comparación a otros tratamientos inoculados con micorrizas y una coinoculación con la cepa de bradyrhizobio<sup>13</sup>.

Se ha atribuido que más de un mecanismo está involucrado en la asociación planta-rizobacteria y lo denominan “hipótesis aditiva” los cuales operan simultáneamente o en asociación<sup>34,35</sup>. El grupo de las rizobacterias también incluye a *B. yuanmingense* y la actividad de éstas; en general; se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente. Estos factores tienen gran importancia sobre la habilidad de colonizar la rizosfera y mantener la comunicación entre las células de la raíz con estas rizobacterias presentes en el suelo. Las rizobacterias capaces de interactuar con las raíces de plántulas no leguminosas como *C. annuum* son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, que ocasionan el movimiento de la bacteria hacia la raíz de la plántula y así dar inicio a una relación benéfica<sup>17,34</sup>.

Los efectos del uso de tratamientos biológicos con rizobacterias en plántulas se deben a la producción de fitohormonas, las cuales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plántulas. En estos grupos se incluyen auxinas, etileno, giberelinas (GA), citocinas y ácido abscísico<sup>35</sup>.

Es posible que *B. yuanmingense* haya producido estas fitohormonas y así hayan estimulan el crecimiento de los tallos, la densidad y longitud de los pelos radiculares; aumentando la capacidad de absorción de agua y nutrientes, permitiendo que las plántulas sean vigorosas y tolerantes a condiciones climáticas adversas. Por tal motivo, *B. yuanmingense* es un microorganismo capaz de fijar el nitrógeno ecológicamente favoreciendo la nutrición de la plántula cualidad que lo convierte en un microorganismo con capacidad de PGPR<sup>12,26,28</sup>.

Cabe destacar también que las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” inoculada solo con *T. viride* (control positivo 2) presentó valores estadísticamente significativos en las variables evaluadas: longitud de raíz, número de raíces laterales y peso seco de la parte radicular en comparación con el control negativo. Algunos investigadores plantean que existen evidencias experimentales de que *Trichoderma* sp. puede inducir el crecimiento de las plantas, aún en condiciones en que el suelo esté libre de patógenos actuando como bioestimulador; otros investigadores reportaron incremento en el crecimiento y desarrollo que se atribuyen a la obtención de un mayor desarrollo radical, estimulado por el complejo enzimático que se origina en la rizosfera de las plantas ya que en general todas las especies de *Trichoderma* son buenos productores de celulasa<sup>19,21,23,24,25</sup>.

*T. viride* tiene la capacidad de biotransformar la celulosa, acelerar la reproducción celular, mineralizar el nitrógeno y algunas proteínas presentes en el suelo, permitiendo que estos procesos biológicos de degradación favorezcan el crecimiento de la planta [68]. Es un hongo, que actúa principalmente como agente antagonista de varias enfermedades en cultivos hortícolas; conjuntamente posee características inductoras de desarrollo de raíces y por consiguiente puede incrementar la productividad de las plantas<sup>23,25</sup>.

Es difícil entender por completo el funcionamiento de un sistema biológico. La complejidad de las interacciones planta – suelo – microorganismo - ambiente son variadas; una comprensión completa de todas las relaciones en cuestión es poco probable; sin embargo, los efectos benéficos de las interacciones biológicas que estimulan los rendimientos de los cultivos y mejoran la sanidad de las plantas pueden ser evaluados y quedar en evidencia algunas estrategias generales de la interacción. La sustentabilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes e inoculantes microbianos, así como los bioestimulantes son un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la calidad y cantidad de los recursos internos<sup>35</sup>. La continuidad de esta línea de investigación, contribuirá al conocimiento más certero de esta práctica agronómica.

## CONCLUSIONES

- El control inoculado con *B. yuanmingense* Rc 455-02 presentó efecto estimulante en el crecimiento de las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” evidenciándose en el incremento de longitud del tallo, hoja y raíz, número de raíces laterales, peso seco de la parte aérea y peso seco de la parte radicular que se evaluaron a los 20 y 30 días después de su inoculación, mostrando diferencia significativa con el grupo experimental (coinoculación de ambos microorganismos), el control inoculado con *T. viride* y el control negativo.
- El control inoculado con *T. viride* FP-UNT 01 nativa presentó efecto estimulante en el crecimiento de las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” reflejándose en el incremento de longitud de raíz, número de raíces laterales, peso seco de la parte radicular evaluadas a los 20 y 30 días después de su inoculación, mostrando diferencia significativa con el control negativo.
- La coinoculación de *T. viride* FP-UNT 01 nativa y *B. yuanmingense* Rc 455-02 presentó efecto estimulante en el crecimiento de las plántulas de *C. annuum* “ají paprika” observándose en el incremento de longitud de raíz y peso seco de la parte radicular evaluadas a los 20 y 30 días después de su inoculación, mostrando diferencia significativa con el control negativo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Montaña N, Cedeño E. Evaluación agronómica de siete cultivares de pimentón (*Capsicum annum L.*). UDO Agrícola; 2002; 2 (1): 95-100
2. Zúñiga Dávila. Leguminosas y producción de biofertilizantes en el Perú. Ecol Apl. 2006; 5(1,2)
3. Marcela M, Mercedes M, Marcela F. Aislamiento de *Trichoderma sp.* y Actinomicetes a Partir de Suelos de Clavel (*Dianthus caryophyllus* in vitro sobre *Fusarium oxysporum*. f. sp. Dianthi. Agronomía Colombiana. 2002; 19 (1-2): 81-87.
4. Reed MLE, Glick BR. Applications of Free Living Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek J.G. M. 2004; 86: 1-25.
5. Sandoval I, Lopéz M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y Otros Patógenos Fúngicos del Fríjol. Fitosanidad. 2002; 4 (3-4): 69-72.
6. Mohammed E, Pérez S, Emilia R, Emilia C. *Trichoderma harzianum* como Biofungicida para el Biocontrol de *Phytophthora capsici* en Plantas de Pimiento (*Capsicum annum L.*). Anales de Biología 2004; 26: 35-45.
7. Haram S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I. Differential Expression of *Trichoderma harzianum* chitinases During Mycoparasitism. Phytopathol. 1996; 86: 980-985.
8. Zimand G, Elad Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* Pathogenicity. Phytopathol. 1996; 86: 125-126.
9. Russelle MP y Birr AS. Biological Nitrogen Fixation. Large-Scale Assessment of Symbiotic Dinitrogen Fixation by Crops: Soybean and Alfalfa in the Mississippi River Basin, J. Agron. 2004.
10. Bernarda C, Guillermo R, Winston S. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) Seleccionados de los Cultivos de Fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como Potenciales Bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2009; 38 (1): 78-104.
11. Soriano BS, Gonzales A, Guevara J, Munsibay JY. Tolerancia de *Rhizobium phaseoli* Cb-9 al herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético y fungicida Propileno-bis-ditiocarbamato de zinc “Antracol 70PM” en condiciones de laboratorio. REBIOL 2008; 28 (1): 34-34
12. Matos G, Zúñiga D. Comportamiento de Cepas Nativas de Rizobios Aisladas de la Costa del Perú en Dos Cultivares de Pallar (*Phaseolus lunatus* L). Ecol Apl. 2002; 1 (1): 19-24.
13. Matos G, Zúñiga D. Viabilidad de Cepas de Rizobios en Inoculantes Basados en Soportes no Estériles. Ecol Apl. 2003; 2(1): 81-85.
14. Molouba F, Lorquin J, Willems A, Hoste B, Giraud E, Dreyfus B, et al. Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. are Specific to Stem-Nodulated Species and form a Separate 16S Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Group. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 3084-3094.
15. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okón Y. Plant-Growth Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. Crit Rev Plant Sci. 2003; 22: 107-149.
16. Santillana N, Arellano C, Zúñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de Promover el Crecimiento en las plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecol Apl. 2005; 4(1): 47 – 51.
17. Rincon JJ, Clavero T, Razz R, Pietrosevoli S, Mendez F, Noruega N. Efecto de la Inoculación de Cepas Nativas e Introducidas de *Rhizobium* Sobre la Producción de Materia Seca en *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). Rev Fac Agron. 2000; 17(1): 432-444.
18. Vessey K. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 2003; 205-207.
19. Cano MA. Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* ssp. y *Pseudomonas* ssp. Una Revisión. Rev. U.D.C.A Act. and Div. Cient. 2011; 14 (2): 15 – 31.
20. Marschner P, Timonen S. Interactions between Plant Species and mycorrhizal Colonization on the Bacterial Community Composition in the Rhizosphere. App Soil Ecol. 2005; 28: 23-36.
21. Hoitink J, Madden V, Dorrance E. Systemic Resistance Induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. Phytopath 2006; 96: 186-189.
22. Ghisalberti EL, Sivasithamparan K. Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma* spp. Sci Biol Biochem. 1991; 11: 1011.
23. Verma M, Brar K, Tyagi D, Surampalli Y, Valéro R. Antagonistic Fungi, *Trichoderma* spp. Panoply of Biological Control. Biochem. Engin 2007; 37: 1-20.
24. Bécquer C, Lazarovits G, Lalin I. Interacción In Vitro entre *Trichoderma harzianum* y Bacterias Rizosféricas Estimuladoras del Crecimiento Vegetal. Rev Cubana Ciencia Agrícola 2013; 47: 97-102.
25. Groppa MD, Zawoznik MS y Tomaro ML. Effect of Co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. Soil Biol. 1998; 34(2): 75-80.

26. Bécquer CJ, Ramos Y, Nápoles JA y Arioza MD. Efecto de la Interacción *Trichoderma*-rizobio en *Vigna luteola* SC-123. Pastos y Forrajes. 2004; 27: 139.
27. Saber WIA, Abd El-Hai KM. & Ghoneem KM. Synergistic Effect of *Trichoderma* and *Rhizobium* on Both Biocontrol of Chocolate Spot Disease and Induction of Nodulation, Physiological Activities and Productivity of *Vicia faba*. Res J Microbiol. 2009; 4: 286.
28. Clua A, Olgiati J, Beltrano J. Evaluación de la doble inoculación *Bradyrhizobium*-micorrizas y el Uso de Fitoterápicos de Semilla en el Crecimiento, Eficiencia de Inoculación y el Rendimiento de un Cultivo de Soja. RIA. 2013; 39 (3).
29. Corbera J, Núñez M. Evaluación Agronómica del Análogo de brasinoesteroides BB-6 en soya, inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* y HMA, cultivada en invierno sobre un suelo ferralsol. Cultivos Tropicales. 2004; 25(3): 9-13.
30. Camelo M, Vera S, Bonilla R. Mecanismo de Acción de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Caproica. 2011; 12(2): 159-166.
31. Diaz MA, Suárez PC, Pujol MY, Sánchez E, et al. Efecto de la Aplicación de *Azotobacter chroococcum* sobre el Desarrollo de Posturas de Cafeto (*Coffea arabica* L.). Centro Agrícola 1999; 26 (1).
32. Cupull SR, Sánchez CC, Andreu C, Cupull MC y Pérez NC. Efecto de *Trichoderma* y *Azotobacter* en el Control de *Rhizoctonia solani* y la Estimulación del Crecimiento de Posturas de Cafetos. Rev Fitopat y Entomol 2000; XVII (66): 203-206.
33. Cupull SR, Rodríguez CM, Pérez Navarro C, Delgado Pérez Y, Cupull Santana MC. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola 2003; 30(1): 21-25.
34. Carrasco MI, Paillán LH, Carrasco SG. Efecto del Uso de *Trichoderma* spp. en Cultivo de Pimentón Orgánico: Desarrollo Vegetativo y Producción, Universidad de Talca Chile. 2011.
35. Harman G, Petzoldt R, Comis A, Chen J. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 And Maize Inbred Line Mo17 And Effects of these interactions on Diseases Caused By *Pythium ultimum* And *Colletotrichum graminicola*. Phytopath. 2004; 94: 147-153.