

Efectos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y Azofert® sobre el crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L.



Effects of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg and Azofert® on growth and development of *Phaseolus vulgaris* L.

<https://eqrcode.co/a/mphkmM>

✉ Ivonne González-Marquetti¹, ✉ Danay Ynfante-Martínez¹, ✉ Susana Gorrita¹, ✉ Belkis Morales-Mena²,
✉ María Caridad Nápoles², ✉ Belkis Peteira Delgado-Oramas¹, ✉ Benedicto Martínez-Coca¹

¹Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Fisiología y Bioquímica Vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INCA). San José de las Lajas. Provincia Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto combinado de tres cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (*Ta.* 13, *Ta.* 78 y *Ta.* 90) con Azofert® (*Rhizobium leguminosarum* cepa CF1) sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol común *Phaseolus vulgaris* L. (cv. 'BAT-304') en condiciones semicontroladas. Las evaluaciones se realizaron en plantas de 32 días, sembradas en dos momentos: 1) siembra e inoculación de *Trichoderma* en el suelo al unísono; 2) siembra de las plantas siete días después de la inoculación del suelo con el hongo. Se determinó la altura de las plantas, la longitud de la raíz, el número de hojas, flores, zarcillos y vainas, la masa fresca y seca del área foliar y radicular, la capacidad endófitica de *Trichoderma* en las raíces, la efectividad de nodulación de *Rhizobium* y la inducción de enzimas peroxidadas (POD), polifenoloxidasas (PPO) y fenilalanina amonio liasas (PAL). Los resultados de los tratamientos, en ambas formas de inoculación, se contrastaron según análisis de varianza simple seguido de la prueba de mínima diferencia significativa. Se comprobó la capacidad de las cepas de *T. asperellum* estudiadas de colonizar endofíticamente las raíces de *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') y su compatibilidad con Azofert®, en condiciones controladas. De manera general, los tratamientos a los que se les aplicó *T. asperellum* desde el momento de la siembra presentaron los mejores valores de los parámetros de crecimiento y desarrollo evaluados. La coinoculación de las cepas *Ta.* 13 y *Ta.* 78 con Azofert® tuvo un efecto sinérgico sobre la estimulación del crecimiento y la expresión de enzimas de defensa PAL, PPO y POD de *P. vulgaris*.

Palabras clave: enzimas vegetales, frijol, hongo endófito, promoción del crecimiento vegetal, *Rhizobium*.

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate the effect of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (*Ta.* 13, *Ta.* 78 and *Ta.* 90) combined with Azofert® on growth and development of *Phaseolus vulgaris* L. (cv. 'BAT-304') under semi-controlled conditions. Evaluations were carried out in 32-day-old plants sown at two times: 1) plant sowing and soil inoculation with *Trichoderma* at the same time, 2) plant sowing seven days after soil inoculation with the fungus. The plant height, root length, number of leaves, number of flowers, number of tendrils and pods, fresh and dry weight of plant aerial parts and roots, *Trichoderma* endophytic capacity in roots, nodulation effectiveness by *Rhizobium* and the induction of peroxidase enzymes (POD), polyphenoloxidases (PPO), and phenylalanine ammonium lyases (PAL) were determined. All results were contrasted according to simple analysis of variance followed by the least significant difference test. The co-inoculation of *Ta.* 13 and *Ta.* 78 with Azofert® had a synergist effect on growth and defense enzymes stimulation of *P. vulgaris*. The ability of the *T. asperellum* strains studied to endophytically colonize the roots of *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') and their compatibility with Azofert® were verified, under controlled conditions. In general, the treatments to which *T. asperellum* was applied from the moment of sowing presented the best values of the growth and development parameters evaluated. The co-inoculation of *Ta.* 13 and *Ta.* 78 with Azofert® had a synergistic effect on growth stimulation and expression of defense enzymes PAL, PPO and POD of *P. vulgaris*.

Keywords: plant enzymes, bean, endophyte fungus, plant growth promotion, *Rhizobium*.

* Autor por correspondencia: Benedicto Martínez Coca: bmcooca@censa.edu.cu; benedicto.martinez21@gmail.com

Recibido: 27/09/2121

Aceptado: 31/10/2021

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se considera uno de los alimentos claves para la seguridad alimentaria mundial por ser un cultivo de ciclo corto, exquisito sabor y elevado valor nutricional. Este grano forma parte de la dieta diaria del cubano y, por esta razón, en Cuba se implementan estrategias para el incremento de su rendimiento (1). No obstante, aún la producción nacional no ha sido capaz de suplir las necesidades de la población debido a las diversas afectaciones por estrés abiótico o biótico que sufre esta leguminosa (2).

La aplicación de bioproductos a los cultivos va teniendo cada vez más importancia en la obtención de alimentos con mejor calidad biológica, altos rendimientos, reducción de los costos de producción y menores daños a los ecosistemas. Estos bioproductos pueden actuar como biofertilizantes, bioestimulantes y/o bioplaguicidas (3). En el proceso productivo del frijol, usualmente se incorpora el biofertilizante Azofert®. Este inoculante, a base de bacterias del género *Rhizobium*, es capaz de asociarse con las plantas leguminosas y formar nódulos en sus raíces, dentro de los cuales fijan el nitrógeno del aire y lo brindan directamente a la planta (4).

Por su parte, *Trichoderma* spp. se encuentra entre los antagonistas más atractivos debido a su amplio espectro de acción para el control de plagas. Este antagonista se reconoce por su elevada capacidad reproductiva, plasticidad ecológica y por actuar a través de mecanismos directos e indirectos que proporcionan a la planta mejor adaptabilidad en el medio y resistencia a diferentes patógenos (5). Durante el proceso de colonización de las raíces, *Trichoderma* estimula los mecanismos de defensa de las plantas contra numerosos microorganismos fitopatógenos (6).

El cepario del laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) dispone de cepas de *T. asperellum* que están caracterizadas morfofisiológica, patogénica y molecularmente (7, 8). Estas cepas son endófitas de las raíces de *P. vulgaris*, estimulan la germinación y el crecimiento del cultivo y aumentan la actividad de algunos grupos enzimáticos relacionados con la defensa vegetal (9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cepas seleccionadas de *T. asperellum* combinadas con Azofert® sobre el crecimiento y desarrollo de *P. vulgaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en una casa de malla del CENSA (22°59'29.1"N 82°09'12.3"W), a temperatura de 25±2°C, humedad relativa entre el 80-85 % y fotoperiodo natural. Se usaron macetas que contenían como sustrato 400 g de suelo (ferralítico rojo típico) (10)

y abono orgánico en proporción 3:1 (v/v), esterilizado por un intervalo de 30 minutos en autoclave a 120°C, repitiendo la operación a las 24 horas.

Las cepas *Ta.* 13, *Ta.* 78 y *Ta.* 90 de *T. asperellum*, provenientes del Laboratorio de Micología Vegetal del CENSA, se conservaron en placas Petri de 9 cm de diámetro (Ø) contentivas de Agar Malta (AM) (Bio-Cen) y se incubaron a una temperatura de 28°C±2°C en una incubadora (Friocell) y oscuridad constante. Posteriormente se sembraron en Papa Dextrosa Agar (PDA) (BioCen) durante cinco días, tiempo para el cual las placas se encontraron completamente esporuladas. A partir de estos cultivos puros, se prepararon los inóculos de las cepas de *T. asperellum* en forma de suspensión a una concentración de 10⁷ conidios.ml⁻¹ según cámara de conteo.

Para la siembra se usaron semillas de *P. vulgaris* cv. 'BAT-304', proporcionadas por el Instituto de Granos (Cuba) con 100 % de viabilidad. Se evaluaron dos momentos de siembra: 1) las semillas se sembraron inmediatamente después de la inoculación del suelo con *T. asperellum* y 2) la siembra de las semillas se realizó siete días después de la inoculación de *T. asperellum*.

Para evaluar el efecto combinado de Azofert® con las diferentes cepas de *T. asperellum* se estableció un grupo control de plantas no inoculadas. Por su parte, se consideraron tratamientos las plantas inoculadas con Azofert®, las inoculadas con cada una de las cepas de *T. asperellum*, así como las variantes combinadas (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos usados para evaluar los efectos de las cepas de *T. asperellum* y Azofert® sobre *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304')/ *Treatments used to evaluate the effects of the T. asperellum strains and Azofert® on P. vulgaris* (cv. 'BAT-304')

Tratamientos	Descripción
Control	Frijol sin inocular
F+A	Frijol inoculado con Azofert®
F+Ta.13	Frijol inoculado con <i>Ta.</i> 13
F+Ta.78	Frijol inoculado con <i>Ta.</i> 78
F+Ta.90	Frijol inoculado con <i>Ta.</i> 90
F+A+Ta.13	Frijol inoculado con Azofert® y <i>Ta.</i> 13
F+A+Ta.78	Frijol inoculado con Azofert® y <i>Ta.</i> 78
F+A+Ta.90	Frijol inoculado con Azofert® y <i>Ta.</i> 90

La inoculación con Azofert® se llevó a cabo mediante adición directa a las semillas a razón de 200 ml del producto por cada 50 kg de semillas, cinco minutos antes de la siembra.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Para todos los análisis se realizaron tres réplicas y tres repeticiones para cada tratamiento, incluido el control.

Durante el experimento, las plantas se regaron en días alternos con 20 ml de agua potable. Las plantas se retiraron de las macetas cuando alcanzaron el es-

tadio de la floración a los 32 días posteriores a la germinación y se les midieron los siguientes indicadores: longitud de la parte aérea (cm), longitud de la raíz (cm), número de hojas, flores, zarcillos y vainas, masa fresca foliar y radicular (g), masa seca foliar y radicular (g). La longitud de la parte aérea y la raíz se midió mediante regla milimetrada. Por su parte, las masas frescas se determinaron en una balanza de precisión (Kern), mientras, las masas secas se obtuvieron mediante balanza infrarroja (Kern).

Para evaluar la colonización endofítica de las cepas de *T. asperellum*, las muestras de raíces se lavaron con agua corriente cuidadosamente y se secaron con papel de filtro Whatman No. 4. Las raíces se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 segundos y posteriormente con alcohol al 70 % durante un minuto. Entre cada desinfección, las muestras se lavaron con agua destilada estéril tres veces. Seguidamente se cortaron con un bisturí estéril en secciones de 1 cm y se homogenizaron. Por último, se seleccionaron 12 segmentos al azar de los cuales se sembraron tres en placas Petri de 9 cm (Ø), contentivas con PDA, y se incubaron a 28°C±2°C y oscuridad constante. Se sembraron tres placas por cada tratamiento. Las evaluaciones se realizaron hasta la aparición de las estructuras del hongo.

Para evaluar la efectividad nodular de *Rhizobium*, se analizó el porcentaje de nódulos efectivos (%) según la coloración en el interior de los nódulos a través del corte transversal de estos (11).

Por su parte, las actividades enzimáticas específicas peroxidasa (POD), polifenoloxidasas (PPO), fenilalanina amonio liasa (PAL) se analizaron según métodos descritos por Peteira *et al.* (12).

Todos los análisis se realizaron mediante comparación con el Análisis de Varianza Simple y la prueba de mínima diferencia significativa LSD Fisher ($\alpha=0.10$) usando el programa InfoStat versión 2017 (13).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas tratadas germinaron al tercer día mientras que las plantas control lo hicieron al quinto día después de la siembra. No se observaron diferencias en los tiempos de germinación entre las plantas que se trataron con las cepas de *Trichoderma*, Azofert® o la combinación de microorganismos. Estos resultados coinciden con los de Yadav *et al.* (14), quienes observaron un incremento significativo de la germinación de semillas de *Cicer arietinum* L. y *P. vulgaris* que se habían inoculado con *T. asperellum* T42 y/o *Rhizobium* sp. RH4, pero no encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas. El momento de siembra tampoco influyó en los tiempos de germinación de las plantas tratadas, debido a que en todos los casos la germinación se evidenció al tercer día posterior a la siembra.

En cuanto a la estimulación del crecimiento y desarrollo de las plantas de *P. vulgaris*, se observó que la inoculación con ambos agentes biológicos produjo el aumento del número de flores y zarcillos, así como el incremento de las masas frescas foliar y radicular, mientras que el resto de los parámetros evaluados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos cambios se produjeron, principalmente, durante el primer momento de siembra (Tabla 2).

La inoculación con la cepa *Ta.13* logró el incremento del número de flores y la masa fresca de la raíz cuando se aplicó de forma independiente. Esto podría deberse a la capacidad de solubilización de nutrientes de algunas cepas de *T. asperellum* contribuyendo a la asimilación de estos por la planta y/o al incremento de las concentraciones del ácido giberélico en las hojas, fitohormona relacionada con la floración (15).

En aquellas plantas inoculadas con Azofert® y *Ta. 13*, además del aumento en el número de flores, se pudo apreciar un incremento significativo del número de zarcillos y de la masa fresca foliar. Esto mostró que *R. leguminosarum*, como bacteria fijadora de N, incrementó la síntesis de proteínas y de la biomasa foliar propiciando la formación de las estructuras reproductivas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con los de investigaciones previas las cuales mostraron que la aplicación de *Ta. 13*, al momento de la siembra, incrementó significativamente la altura de las plantas de frijol de 15 días de edad (9). Estas diferencias sugieren que el incremento de la longitud en la parte aérea de la planta producida con la inoculación de *Trichoderma* pudiera ser más notable en estadios tempranos del desarrollo del frijol. Por su parte, las plantas inoculadas con *Ta. 90* incrementaron significativamente el número de zarcillos en las plantas, mientras que, las que se trataron con Azofert® combinado con las cepas *Ta. 78* y *Ta. 90*, mostraron aumentos significativos en los números de flores y zarcillos con respecto a las plantas control (Tabla 2).

La inoculación con *Trichoderma* y/o *Rhizobium* no condujo a un incremento significativo de la biomasa de las plantas. Estos resultados coincidieron con los de Grabe *et al.* (16), quienes no apreciaron un incremento significativo en las masas secas foliar y radicular en plantas de *P. vulgaris* (en estadio R6 o floración) que habían sido inoculadas con *T. asperellum*, *Rhizobium tropici* y *T. asperellum* + *Rhizobium tropici* al momento de la siembra. Sin embargo, se observó que la aplicación conjunta de la cepa *Ta. 78* y Azofert® condujo a la acumulación de biomasa de la raíz comparado con las plantas que solo recibieron la inoculación con Azofert®. Este comportamiento pudiera estar relacionado con que las plantas coinoculadas con estas cepas también mostraron la mejor efectividad de la nodulación con respecto al control para ese momento de siembra (Fig. 1).

Tabla 2. Efectos de cepas de *T. asperellum* y Azofert® sobre el crecimiento y desarrollo de *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') / *Effect of T. asperellum strains and Azofert® on growth and development indicators of P. vulgaris* (cv. 'BAT-304')

Momento de siembra	Tratamiento	Longitud parte aérea (cm)	Longitud Raíz (cm)	No. Hojas	No. Flores	No. Zarcillos	No. Vainas	Masa Fresca Foliar (g)	Masa Fresca Raíz (g)	Masa Seca Foliar (g)	Masa Seca Raíz (g)	
I	Control	98,16 ±	23,64 ±	24,67 ±	1,56 ±	0,00 ±	0,33 ±	9,57 ±	3,97 ±	1,69 ±	0,53 ±	
		6,51a	2,25ab	1,77a	0,59c	1,44b	0,24ab	2,10bc	1,15b	0,47a	0,15ab	
	F+Ta.13	102,42 ±	28,33 ±	24,11 ±	3,44 ±	0,00 ±	0,44 ±	14,62 ±	7,23 ±	2,54 ±	0,60 ±	
		6,51a	2,25a	1,77a	0,59ab	0,83b	0,24ab	2,10ab	1,15a	0,47a	0,15ab	
	F+Ta.78	105,21 ±	26,64 ±	19,44 ±	2,33 ±	0,22 ±	0,00 ±	10,83 ±	5,90 ±	1,69 ±	0,55 ±	
		6,51a	2,25ab	1,77b	0,59bc	0,83b	0,24b	2,10abc	1,15ab	0,47a	0,15ab	
	F+Ta.90	93,29 ±	24,66 ±	21,33 ±	2,44 ±	4,33 ±	0,44 ±	10,82 ±	4,23 ±	1,79 ±	0,54 ±	
		6,51a	2,25ab	1,77ab	0,59bc	0,83a	0,24ab	2,10abc	1,15b	0,47a	0,15ab	
	F+A	106,73	23,33 ±	24,33 ±	2,00 ±	0,22 ±	0,44 ±	8,90 ±	3,95 ±	1,68 ±	0,42 ±	
		6,51a	2,25ab	1,77a	0,59c	0,83b	0,24ab	2,10c	1,15b	0,47a	0,15 b	
	F+A+Ta.13	101,54 ±	25,29 ±	24,11 ±	4,56 ±	3,44 ±	0,56 ±	15,53 ±	6,56 ±	2,72 ±	0,78 ±	
		6,51a	2,25ab	1,77a	0,59a	0,83a	0,24ab	2,10a	1,15ab	0,47a	0,15ab	
	F+A+Ta.78	92,01 ±	21,99 ±	19,56 ±	4,11 ±	5,00 ±	0,56 ±	14,33 ±	5,97 ±	2,52 ±	0,82 ±	
		6,51a	2,25b	1,77b	0,59a	0,83a	0,24ab	2,10ab	1,15ab	0,47a	0,15a	
	F+A+Ta.90	102,66 ±	21,98 ±	21,89 ±	4,00 ±	4,44 ±	0,67 ±	13,04 ±	4,66 ±	2,72 ±	0,59 ±	
		6,51a	2,25b	1,77ab	0,59a	0,83a	0,24a	2,10abc	1,15ab	0,47a	0,15ab	
	II	Control	114,82 ±	26,22 ±	29,60 ±	6,80 ±	5,20 ±	1,40 ±	14,29 ±	4,89 ±	1,95 ±	0,57 ±
			11,93a	3,24ab	2,78a	1,26bc	0,66a	0,40ab	2,30ab	1,28abc	0,30a	0,13abc
F+Ta.13		94,26 ±	26,24 ±	28,80 ±	6,60 ±	4,40 ±	1,00 ±	10,82 ±	2,66 ±	1,55 ±	0,35 ±	
		11,93abcd	3,24ab	2,78ab	1,26bc	0,66abc	0,40abc	2,30ab	1,28bc	0,30ab	0,13bc	
F+Ta.78		94,06 ±	19,86 ±	23,86 ±	8,14 ±	4,71 ±	0,43 ±	15,24 ±	5,49 ±	1,59 ±	0,66 ±	
		10,08abcd	2,74b	2,35abc	1,07ab	0,56ab	0,34c	2,30ab	1,28ab	0,30ab	0,13ab	
F+Ta.90		72,38 ±	24,15 ±	22,25 ±	4,25 ±	2,75 ±	0,25 ±	8,88 ±	3,94 ±	0,62 ±	0,29 ±	
		13,34cd	3,63ab	3,11bc	1,41c	0,73c	0,45c	2,81b	1,57abc	0,36c	0,16c	
F+A		98,34 ±	27,38 ±	24,00 ±	7,00 ±	3,60 ±	1,80 ±	11,79 ±	2,49 ±	1,25 ±	0,44 ±	
		11,93abc	3,24a	2,78abc	1,26bc	0,66bc	0,40a	2,30ab	1,28bc	0,30abc	0,13abc	
F+A+Ta.13		83,03 ±	25,18 ±	23,88 ±	8,50 ±	3,50 ±	1,00 ±	15,74 ±	6,45 ±	1,93 ±	0,76 ±	
		9,43bcd	2,56ab	2,20abc	1,00ab	0,52bc	0,32abc	2,30a	1,28a	0,30a	0,13a	
F+A+Ta.78		104,48 ±	25,88 ±	27,75 ±	11,00 ±	2,75 ±	0,50 ±	10,31 ±	3,06 ±	1,62 ±	0,51 ±	
		13,34ab	3,63ab	3,11abc	1,41a	0,73c	0,45bc	2,81ab	1,57abc	0,36ab	0,16abc	
F+A+Ta.90		71,84 ±	25,39 ±	21,56 ±	10,11 ±	3,00 ±	0,33 ±	9,74 ±	2,17 ±	1,08 ±	0,42 ±	
		8,89d	2,42ab	2,07c	0,94a	0,49c	0,30c	2,30b	1,28c	0,30bc	0,13bc	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,10$) /
 Media with a common letter are not significantly different ($p > 0.10$)

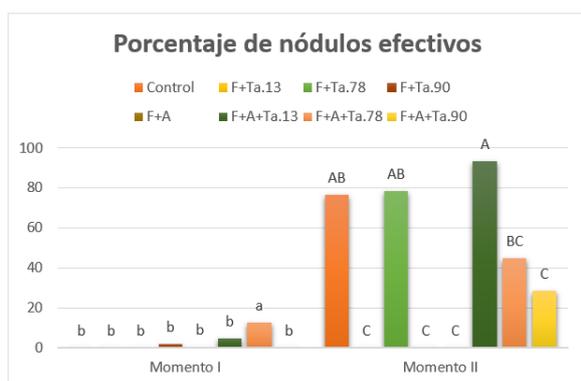


Fig. 1. Efectividad de la nodulación en raíces de *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') inoculadas con Azofert® y cepas de *T. asperellum*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,10$) / Effectiveness of nodulation in *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') roots inoculated with Azofert® and *T. asperellum* strains. Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,10$)

De manera general, los tratamientos a los que se les aplicó *T. asperellum* desde el momento de la siembra presentaron los mejores valores de los parámetros de crecimiento y desarrollo evaluados. Este hecho indica que el estadio fenológico de la planta pudiera influir en su mejor asimilación a los microorganismos benéficos, probablemente porque en estos primeros estadios aún no se han desarrollado respuestas defensivas lo suficientemente fuertes que limiten la colonización de los mismos.

Se constató la capacidad de colonizar endofíticamente las raíces de *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') por parte de las cepas de *T. asperellum* utilizadas en este estudio (Fig. 2). Se conoce que varias especies de *Trichoderma* pueden crecer dentro de las raíces y funcionar como endófitos facultativos (17). La colonización por parte de microorganismos endófitos se ha asociado con la supresión de una amplia variedad de enfermedades en las plantas y con la promoción del crecimiento vegetal (18).

La observación de nódulos en las raíces permitió apreciar que la inoculación con *Trichoderma* no afectó totalmente la colonización de *Rhizobium* (Fig. 1). Sin embargo, al menos durante el primer momento de siembra, la efectividad nodular fue baja; la combi-

nación de Azofert® y *Ta. 78* fue el tratamiento que mostró el mayor porcentaje (12 %). Freitas *et al.* observaron que la aplicación *Trichoderma* spp. no inhibió el proceso de nodulación en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cuando el hongo fue inoculado con rizobios (19). Se ha demostrado que algunas especies de *Trichoderma* afectan la interacción entre las leguminosas y las rizobacterias, y se han observado efectos positivos, negativos o neutros (20).

En cambio, los nódulos presentes en las raíces de aquellas plantas sembradas después de siete días de la inoculación del suelo con *T. asperellum*, mostraron mayores porcentajes de efectividad nodular, aunque estos valores no tuvieron diferencias significativas con respecto al control. Además, para este momento de siembra, la coinoculación mostró valores de porcentaje de nódulos efectivos significativamente superiores al tratamiento con Azofert®. Hoyos-Carvajal *et al.* (21) plantearon que algunos aislamientos de *T. asperellum*, al solubilizar el fosfato a partir de Ca_3PO_4 y/o roca fosfórica, aumentan su disponibilidad para las plantas. Por lo tanto, el incremento en la efectividad de los nódulos en los tratamientos coinoculados podría ser consecuencia del aumento de fósforo, nutriente clave para el éxito de la nodulación (22).

En ambos momentos de siembra se encontraron nódulos en plantas provenientes de semillas que no habían recibido la aplicación de Azofert®. Esto sugiere presencia de rizobacterias endófitas en las semillas usadas en el experimento. En este sentido, Mora *et al.* (23) y Peralta *et al.* (24) informaron que varias cepas de rizobios fijadoras de nitrógeno fueron capaces de colonizar semillas de *P. vulgaris*, lo que podría explicar la aparición de nódulos pequeños, en ocasiones inefectivos, en las raíces de plantas no inoculadas.

Por otra parte, la aplicación combinada de Azofert® y *T. asperellum* incrementó marcadamente la expresión de enzimas de defensa PAL, PPO y POD en el primer momento de siembra (Fig. 3). Las plantas tratadas con Azofert® y *Ta. 78* mostraron las mayores actividades enzimáticas en los tres complejos enzimáticos estudiados, con diferencias significativas con respecto al control.

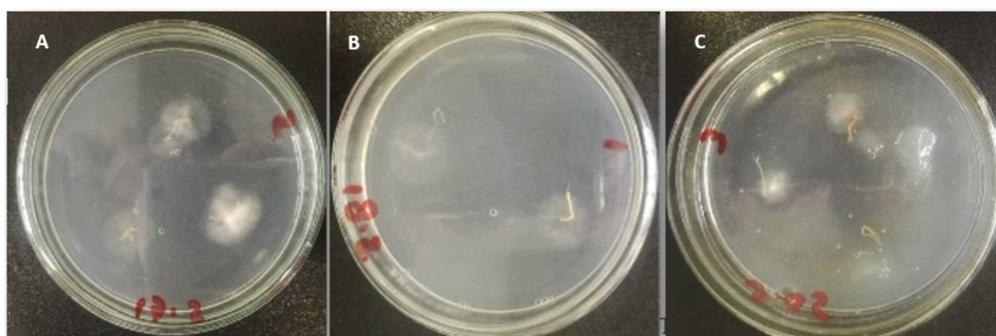


Fig. 2. Colonización de las raíces de *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') por *T. asperellum* (A, B y C: *Ta. 13*, *Ta. 78* y *Ta. 90*, respectivamente) / Endophytic colonization of roots of *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') by *T. asperellum* (A, B and C: *Ta. 13*, *Ta. 78* and *Ta. 90*, respectively)

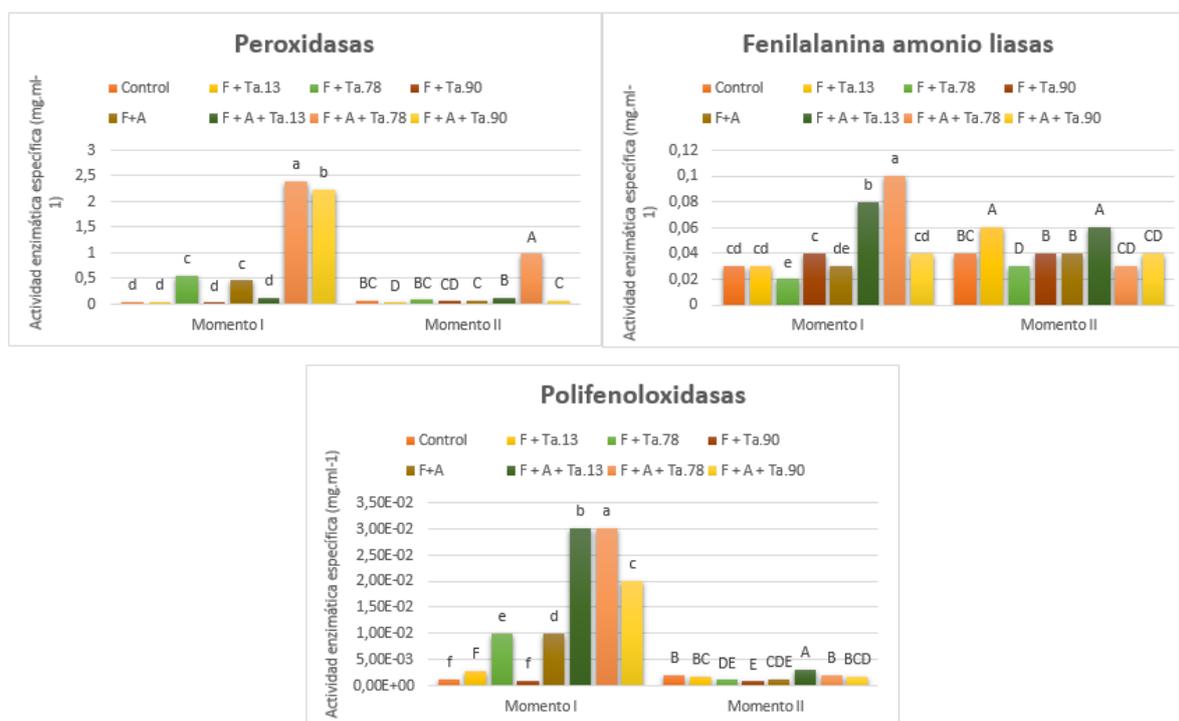


Fig. 3. Efecto de *T. asperellum* y Azofert® sobre la producción de enzimas defensivas en *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304'), en dos momentos de siembra de las semillas con relación a la aplicación del hongo al suelo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,10$) / Effect of *T. asperellum* and Azofert® on production of defence enzymes in *P. vulgaris* (cv. 'BAT-304') at two moments respect to the application of the fungus into the soil. Means with letters in common are not significantly different ($p > 0.10$)

Las plantas que fueron inoculadas con Azofert® y *Ta.* 13 expresaron elevadas actividades PAL y PPO, mientras que las que tenían Azofert® y *Ta.* 90 lo hicieron en el caso de los complejos PPO y POD

Las plantas inoculadas con Azofert® y *Ta.* 78 por separado, que se sembraron en el primer momento, presentaron valores de actividad enzimática PPO y POD superiores a las plantas control. En cambio, los tratamientos que habían sido plantados en el segundo momento mostraron niveles de actividades enzimáticas inferiores a los del primero. No obstante, algunos tratamientos tuvieron incrementos significativos con respecto al control; se destacó la combinación de la cepa *Ta.* 13 con Azofert® por producir una elevada expresión de PAL y PPO en las plantas.

La actividad de la PPO fue elevada para las tres combinaciones de *Rhizobium* con *T. asperellum* lo que coincidió con lo informado por Saber *et al.* (25), quienes observaron elevados niveles de la actividad de esta enzima con la aplicación dual de *R. leguminosarum* y *Trichoderma* en plantas de *Vicia faba* L. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles a quinonas con la consecuente formación de complejos de proteínas que evitan la depredación de los tejidos vegetales por parte de las plagas y propicia la formación de barreras estructurales para patógenos invasores (26).

El proceso evolutivo de las plantas les permitió desarrollar varios mecanismos para tolerar diferentes estreses bióticos y abióticos (27). Durante el proceso de colonización de las raíces de algunos microorganismos

benéficos se produce la inducción de un estado fisiológico único llamado cebado (de "priming" en inglés), que activa un conjunto de respuestas defensivas de mayor magnitud y duración que las causadas por microorganismos patógenos (28). Sarma *et al.* (26) plantearon que la inducción de la resistencia puede multiplicarse varias veces cuando este cebado se lleva a cabo por un consorcio consistente en dos o más cepas de microorganismos benéficos compatibles.

Los elevados niveles de actividad enzimática que presentaron las plantas tratadas con la combinación de las cepas de *T. asperellum* y Azofert® constatan el planteamiento anterior. La aplicación de ambos microorganismos de manera simultánea (primer momento de siembra) propicia un mayor efecto sinérgico en la expresión de actividad enzimática; mientras que, en el caso de las inoculaciones desfasadas, esta sinergia fue menos marcada.

Varias publicaciones justifican los beneficios de las coinoculaciones de microorganismos para la obtención de efectos sinérgicos que potencian el crecimiento y la resistencia al estrés en los cultivos (29, 30, 31). La mayoría de estos ejemplos se centran en las coinoculaciones con microorganismos promotores del crecimiento.

Aún son escasas las investigaciones donde se combinan los hongos con efecto antagonista, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma* con otros promotores del crecimiento. En este sentido, Bécquer *et al.* hallaron efectos positivos en el creci-

miento *Triticum aestivum* L. con la coinoculación de *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en condiciones de estrés por sequía (32). Por su parte, Freitas *et al.* observaron que la aplicación combinada de rizobios y *Trichoderma* spp. incrementó la sobrevivencia y eficacia de *V. unguiculata* contra *Rhizoctonia solani* Kühn (19).

Bizos *et al.* (33) declararon, tomando como ejemplo la coinoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y hongos micorrícicos arbusculares, que probablemente esta sería más beneficiosa, debido a que la rizobacteria puede mejorar el establecimiento del hongo micorrícico mediante la producción de vitaminas y enzimas o aumentando la permeabilidad de la pared celular de la epidermis de la raíz estimulando el crecimiento de las hifas y, consecuentemente, el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes. Por lo tanto, el éxito de las coinoculaciones podría basarse en la compatibilidad de los microorganismos coinoculados y en la especificidad microorganismo-planta, así como en la relación cooperativa que puede establecerse entre ellos para lograr la colonización y coexistencia en el nicho que ocupan.

Los resultados del presente trabajo también destacan la importancia del momento de inoculación de los microorganismos. Aportar ventaja a uno de los microorganismos benéficos, en este caso a *Rhizobium*, podría incrementar su competitividad frente a *Trichoderma*, así como generar cambios estructurales o fisiológicos en la planta que retarden su establecimiento y, por lo tanto, limiten sus beneficios para la planta. La interacción durante la coinoculación de dos microorganismos benéficos requiere de estudios que aclaren los mecanismos por los cuales dicha interacción se lleva a cabo.

La coinoculación de *Trichoderma* con Azofert® demostró un marcado efecto sinérgico en la estimulación de crecimiento y las respuestas defensivas de *P. vulgaris*, fundamentalmente la aplicación combinada de las cepas *Ta. 13* y *Ta. 78* con *Rhizobium*.

AGRADECIMIENTOS

El colectivo de autores de este artículo desea agradecer a los técnicos Dariana Castellón Miranda, Keylan Barbón Samón, Yudit Roque García, Noreydis Fernández Gálvez y Roberto Enrique Regalado su participación en las diferentes fases de montaje, muestreo y evaluaciones de resultados llevados a cabo en este estudio; a la MSc. Fraimarys de Moya Abich por su función clave en el mantenimiento de este experimento y en el muestreo. Este estudio fue financiado por los proyectos “Caracterización Molecular y Mecanismos Indirectos en Cepas Promisorias de *Trichoderma* Relacionados con la Fitosanidad” del Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal y “Re-cycling of biomass nutrients and carbon for advanced organic fertilization in an

ecosmart and climate positive agriculture on Cuba (Bio-C)”, del Schweizerischer National Fonds y el Fondo Nacional de Ciencia (FONCI) de Cuba.

REFERENCIAS

1. Hernández Morales A. (Coordinación y Revisión General). La cadena de valor del frijol común en Cuba. Estudio de su situación en siete municipios de las provincias de Sancti Spiritus y Villa Clara. Editado por Programa de apoyo al fortalecimiento de cadenas agroalimentarias a nivel local (AGROCADENAS). 2016:175 pp. ISBN: 978-959-296-045-9
2. Nuñez-Vázquez MC, Delgado-Acosta C, López-Padrón I, Martínez-González L, Reyes-Guerrero Y, Pérez-Domínguez G, *et al.* Nuevo bioestimulante y su influencia en la producción de frijol común. Cultivos Tropicales. 2020; 41(4):e08 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362020000400008&lng=es&nrm=i
3. Carreras Solís B. Bioplaguicidas y Biofertilizantes. Tendencia de uso en LABIOFAM, Cuba. Cultura Científica y Tecnología. 2018; 15(66):15-19. <http://dx.doi.org/10.20983/culcyt.2018.3.3>
4. Nápoles MC, Cabrera JC, Onderwater R, Wattiez R, Hernández I, Martínez L, Núñez M. Señales en la interacción *Rhizobium leguminosarum*-frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cultivos Tropicales. 2016; 37(2):37-44.
5. Martínez B, Infante D, Peteira B. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. Rev. Protección Veg. 2015; 30 (especial):11-22.
6. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology. 2012; 158:17-25. doi: 10.1099/mic.0.052274-0
7. Cruz A, Rivero D, Echevarría A, Infante D, Martínez B. *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). Rev. Protección Veg. 2015; 30(supl.1):87-87.
8. Martínez-Coca BV. Diagnóstico, caracterización y algunas alternativas de manejo de enfermedades en cultivos de importancia económica. Rev. Protección Veg. 2013; 28(3):237-237.
9. González-Marquetti I, Infante-Martínez D, Arias-Vargas Y, Gorrita-Ramírez S, Hernández-García T, de la Noval-Pons BM, *et al.* Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'BAT-304'. Rev. Protección Veg. 2019; 34(2):e05. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200004&lng=es.

10. Costales D, Nápoles MC, Núñez M, Falcón A. Influencia de un análogo de brasinoesteroide sobre la nodulación de plántulas de soya (*Glycine max* (L) Merril. Cultivos Tropicales. 2008; 29(2):65-69.
11. Febles-González JM, Vega MB, do Amaral-Sobrinho NMB. La degradación de los suelos ferralíticos rojos en el Occidente de Cuba. I Seminario Internacional de Manejo Sostenible de Suelos Agrarios y de Recursos Naturales. 2013.
12. Peteira B, Dueñas F, Arias Y, Martínez Y, Pino O. Caracterización de materiales promisorios de tomate obtenidos en el programa de mejoramiento para la resistencia al TYLCV. Fitopatología. 2008;43(3):105-119.
13. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [programa de cómputo]. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2017 [Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>].
14. Yadav SK, Dave A, Sarkar A, Singh HB, Sarma BK. Co-inoculated biopriming with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* improves crop growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Environ. Agric. Biotech. 2013; 6(2):255-259.
15. Zhao L. y Zhang Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. J. Integr. Agric. 2015; 14(8):1588-1597.
16. Gabre VV, Venancio WS, Moraes BA, Furmam FG, Galvão CW, Daniel Ruiz Potma Gonçalves, et al. Multiple Effect of Different Plant Growth Promoting Microorganisms on Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Crop. Braz. Arch. Biol. Technol. 2020; 63: e20190493.
17. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nat. Rev. Microbiol. 2011; 9:749-759.
18. Neelipally RTKR, Anoruo AO, Nelson S. Effect of Co-Inoculation of *Bradyrhizobium* and *Trichoderma* on growth, development, and yield of *Arachis hypogaea* L. (Peanut). Agronomy 2020; 10:1415. doi:10.3390/agronomy10091415.
19. Freitas-Chagas Junior A, Gonçalves de Oliveira A, Rodrigues dos Santos G, Barbosa-Reis H, França-Borges Chagas L, Oliveira-Miller L. Combined inoculation of rhizobia and *Trichoderma* spp. on cowpea in the savanna, Gurupi-TO, Brazil. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. 2015; 10(1):27-33.
20. Martinez-Medina A, Pozo MJ, Cammue BPA, Vos CMF. Belowground Defence Strategies in Plants: The Plant-*Trichoderma* Dialogue. In: Vos C., Kazan K. (eds) Belowground Defence Strategies in Plants. Signaling and Communication in Plants. Springer, Cham. 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42319-7_13
21. Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. Biological control. 2009; 51(3):409-416.
22. Mweetwa AM, Chilombo G, Gondwe BM. Nodulation, nutrient uptake and yield of common bean inoculated with *Rhizobia* and *Trichoderma* in an acid soil. J. Agric. Sci. 2016; 8(12):61-71.
23. Mora Y, Díaz R, Vargas-Lagunas C, Peralta H, Guerrero G, Aguilar A, et al. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. Applied and Environmental Microbiology. 2014; 80(18):5644-5654.
24. Peralta H, Aguilar A, Díaz R, Mora Y, Martínez-Batallar G, Salazar E, et al. Genomic studies of nitrogen-fixing rhizobial strains from *Phaseolus vulgaris* seeds and nodules. BMC Genomics. 2016; 17:711. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3053-z>
25. Saber WIA, Abd ELHal KM, Ghonocm 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(8):286-300
26. Boeckk T, Winters AL, Webb KJ, Kingston-Smith AH. Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? J. Exp. Bot. 2015; 66(12):3571-3579.
27. Sarma BK, Yadav SK, Singh S, Singh HB. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. Soil Biol. Biochem. 2015; 87:25-33. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.04.001
28. Peteira Delgado-Oramas B. La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. Rev. Protección Veg. 2020; 35(1):e07. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-275220000100001&lng=es.
29. Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Köves-Pechy K, Vörös I, Strasser RJ. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. Appl. Soil Ecol. 2000; 15(2):169-182. ISSN 0929-1393, [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00093-7](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00093-7)
30. Moreira H, Pereira SIA, Vega A, Castro PML, Marques APGC. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. J Environ Manage. 2020; 257:109982. ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109982>
31. Kavadia A, Omirou M, Fasoula DA, Louka F, Ehaliotis C, Ioannides IM. Co-inoculations with

- rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi alters mycorrhizal composition and lead to synergistic growth effects in cowpea that are fungal combination-dependent. Appl. Soil Ecol. 2021; 167:104013. ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104013>
32. Bécquer-Granados CJ, Puentes-Pérez AB, Ávila-Cordoví U, Quintana-Sanz M, Galdo-Rodríguez Y, Medinilla-Nápoles F, *et al.* Efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum* en triticale (X. Triticosecale Wittmack), en condiciones de estrés por sequía. Pastos y Forrajes. 2016; 39(1):19-26. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403942016000100003&lng=es&nrm=iso>.
33. Bizos G, Papatheodorou EM, Chatzistathis T, Ntalli N, Aschonitis VG, Monokrousos N. The role of microbial inoculants on plant protection, growth stimulation, and crop productivity of the olive tree (*Olea europea* L.). Plants (Basel). 2020; 9(6):743. doi:[10.3390/plants9060743](https://doi.org/10.3390/plants9060743).

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Ivonne González Marquetti** participó en el diseño y montaje del experimento, en el muestreo, evaluaciones de los parámetros estudiados y llevó a cabo la elaboración de las bases de datos y el análisis estadístico de los resultados. Realizó la redacción y corrección del manuscrito. **Danay Ynfante-Martínez** participó en el diseño y montaje del experimento, llevó a cabo la elaboración de las suspensiones de hongos realizados en el estudio, participó en el muestreo y evaluaciones de los parámetros estudiados. Fue la principal responsable de la evaluación de la capacidad endofítica de *T. asperellum* en las raíces frijol común. **Susana Gorrita-Ramírez** participó montaje del experimento, en el muestreo y evaluaciones de los parámetros estudiados. Fue responsable de la determinación de las masas secas foliar y radicular. **Belkis Morales-Mena** proporcionó el Azofert® utilizado en el estudio, asesoró sobre su uso y aportó literatura relacionada con el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento en frijol. **María Caridad Nápoles** participó en el análisis de los resultados relacionados con nodulación de *Rhizobium*, en la discusión e interpretación de los resultados e incidió en la redacción de la versión final del artículo. **Belkis Peteira Delgado-Oramas** participó en la concesión de la idea del experimento, en su diseño y orientó la realización de los muestreos. Participó en la discusión de los resultados, así como en la corrección del manuscrito. **Benedicto Martínez-Coca** fue el líder del proyecto que financió el estudio. Concibió el experimento, participó en su diseño, orientó la realización de los muestreos, participó en el montaje del mismo, en el muestreo y en las evaluaciones de los parámetros estudiados.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)