



Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología.



TESIS

“Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación con *Trichoderma harzianum* dosis 50% de fertilizante nitrogenado”

Presenta:

Miguel Angel Rizo León

Grado a obtener: Licenciado en Químico Farmacobiología

Asesor

D.C. Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Laboratorio de Microbiología Ambiental.

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

Morelia, Mich. Febrero de 2018

Índice

	Pagina
I. Acrónimos	5
II. Resumen	6
III. Abstract	7
IV. Introducción	8
V. Antecedentes	10
VI. Hipótesis	13
VII. Objetivos - Generales - Específicos	13
VIII. Materiales y métodos - Origen de la cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> - Inoculación de la semilla de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>Trichoderma harzianum</i> . - Variables respuesta de la inoculación de diferentes dosis de <i>Trichoderma harzianum</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> .	14
IX. Resultados	19
X. Discusión	25
XI. Conclusión	27
XII. Bibliografía	28

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, con el apoyo del Proyecto 2.7 (2017), de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Agradecimientos

- Al Proyecto 2.7 (2017) de la CIC “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de desierto y bosque”, con el apoyo de la Investigación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- A BIONUTRA, S.A de C.V, Maravatío Michoacán.
- A CONACYT-FORDECYT-SICDET del Gobierno del Estado de Michoacán.



**Secretaría de
Innovación, Ciencia
y Desarrollo Tecnológico**
Gobierno del Estado de Michoacán



- A mis padres, por el apoyo incondicional.

1.- Acrónimos

Tabla 1. Lista de acrónimos y significado para evaluar el efecto de la inoculación con *Trichoderma harzianum* sobre *Phaseolus vulgaris* a dosis 50% de fertilizante nitrogenado

FN	Fertilizantes Nitrogenados
MIPOCEVE	Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal
SUPOCEVE	Sustancias Promotoras de Crecimiento Vegetal
HOPOCEVE	Hongos Promotores de Crecimiento Vegetal
AP	Altura de Planta
CA	Control Absoluto
CR	Control Relativo
LR	Longitud Radical
PFA	Peso Fresco Aéreo
PFR	Peso Fresco Radical
PSA	Peso Seco Aéreo
PSR	Peso Seco Radical
PST	Peso Seco Total
PG	Porcentaje de Germinación
SOMI	Solución mineral

2.- Resumen

La producción de *Phaseolus vulgaris* (frijol) requiere de fertilizante nitrogenado (**FN**) en forma de NH₄NO₃ (nitrato de amonio), que en exceso, causa perdida de productividad del suelo. Una alternativa para optimizar el uso de FN reducido al 50 % en *P. vulgaris* es inocularlo con hongos promotores del crecimiento vegetal (**HOPOCEVE**) del tipo *Trichoderma harzianum*. El objetivo de la investigación fue analizar la respuesta de *P. vulgaris* a la inoculación con 3 distintas dosis de *T. harzianum* al 50 % de NH₄NO₃. Para ello *P. vulgaris* se inoculó con *T. harzianum* a 3 diferentes dosis, 10 g / 100 g de semilla de *P. vulgaris*, 20 g / 100 g de semilla de *P. vulgaris* y 30 g / 100 g de semilla de *P. vulgaris*, en jarras de Leonard con el FN al 50 % bajo un diseño experimental de bloques al azar, con 5 tratamientos y 3 repeticiones; las variables respuesta fueron: porcentaje (%) y días de germinación; fenología: altura de plántula (**AP**) y longitud radical (**LR**), y biomasa: peso fresco/seco aéreo y radical (**PFA/PFR**) / (**PSA/PSR**) a plántula, floración y madurez fisiológica; los datos experimentales se analizaron por ANOVA / Tukey HSD P < 0.01 %. Se observó una respuesta positiva de *P. vulgaris* a *T. harzianum* y el 50 % de NH₄NO₃ lo que sugiere la conversión de exudados de las raíces en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (**SUPOCEVE**) que optimizaron el FN al aumentar la cantidad de raíces y su capacidad de absorción radical.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, dosis inoculante, *Trichoderma harzianum*, fertilizante nitrogenado, absorción radical, fitohormonas.

3.- Abstract

The production of *Phaseolus vulgaris* (bean) requires nitrogen fertilizer (NF) as a NH_4NO_3 (ammonium nitrate), NF in excess causes soil's lost productivity. An ecological alternative to optimize the use NF reduced at 50% in *P. vulgaris* is to inoculate it with a plant growth promoting microorganisms (PGPM) as well as *Trichoderma harzianum*. The objective of this research was to analyze *Phaseolus vulgaris*'s response to *T. harzianum* at of NH_4NO_3 doses reduced at 50%. In that way *P. vulgaris* was inoculated with *T. harzianum* at 3 different doses 10 g, 20 g and 30 g/ 100 g of *P. vulgaris*. In that sense bean was sowing in Leonard jars with 50% NF under an experimental design of random blocks: 5 treatments and 4 replicates. While the variable-variables used were: percentage (%), days of germination, phenology: plant height (SH) and root length (RL), and biomass: aerial and root fresh weight as well as dry weight (AFW / ADW) / (RFW / RDW) at seedlings, flowering and physiological maturity stages, experimental data were analyzed by ANOVA / Tukey HSD P <0.01%. A positive response of *P. vulgaris* to *T. harzianum* and 50% of NH_4NO_3 was observed, which suggests the conversion of root exudates into plant growth promoting substances (SUCROCEVE) that optimized the NF by increasing the number of roots and their radical absorption capacity

4.- Introducción

La producción de *Phaseolus vulgaris* (frijol) es de gran importancia, pues es la leguminosa de mayor consumo humano en México (representando un 36 % de la ingesta diaria de proteínas), como *Zea mays* (maíz), el frijol es base de la alimentación en México, su cultivo es de suma importancia socioeconómica, tanto por la extensión de tierra que se ocupa para su producción, así como por el consumo *per cápita* (Flores Lara. 2015). *P. vulgaris* para alcanzar un rendimiento rentable requiere de la aplicación de fertilizante nitrogenado (**FN**), en forma de NH_4NO_3 (nitrato de amonio), el estado mineral más sencillo de absorción por el sistema radical de cualquier planta, no obstante, cuando el FN se aplica en exceso causa la pérdida de la productividad del suelo al acelerar la mineralización de la materia orgánica que es la reserva de C (carbono) en el suelo y al mismo tiempo el NH_4NO_3 que no es absorbido contamina el agua superficial y los mantos acuíferos cuando éste se lixivia (Palafox-Caballero *et al.* 2005; Armenta-Bojórquez *et al.* 2010).

Una alternativa de solución para una efectiva absorción del FN en la producción de *P. vulgaris* es reducir y optimizar la dosis del FN con hongos promotores del crecimiento vegetal (**HOPOCEVE**) del tipo; *Trichoderma harzianum* (Cubillos-Hinojosa *et al.* 2009; Villacís-Aldaz *et al.* 2016), que tiene la capacidad de convertir los exudados de raíz en sustancias promotoras del crecimiento vegetal

(**SUPOCEVE**), como el ácido 3-indol acético (**AIA**), que incrementa la cantidad de pelos radicales que exploran el suelo por lo que mejora la absorción del NH_4NO_3 para de esa forma poder optimizar la dosis del FN reducido al 50 % (Sánchez *et al.* 2005).

T. harzianum es un hongo cosmopolita saprófito de suelo y madera que se ha podido aislar con facilidad. Normalmente *T. harzianum* es bien conocido por su control de hongos y bacterias fitopatógenos en diversos cultivos, pero poco en relación como HOPOCEVE (Suárez Meza *et al.* 2008), en especial el efecto de la densidad del inoculo en la respuesta de *P. vulgaris* junto a la reducción del FN al 50 %, sin afectar el sano crecimiento; por lo anterior, el objetivo del trabajo fue analizar la respuesta de *P. vulgaris* a la inoculación de distintas dosis de *T. harzianum* 10 g, 20 g y 30 g / 100 g de semilla al 50 % del FN.

5.- Antecedentes

T. harzianum es conocido por ser un hiperparásito o agente de control biológico de enfermedades fúngicas en plantas, sin embargo poca es la información como un HOPOCEVE en cultivos agrícolas, en la literatura consultada se reporta el efecto benéfico de la inoculación con microorganismo promotor del crecimiento vegetal (**MIPOCEVE**).

Cubillos-Hinojosa *et al* (2009), quienes con el propósito de evaluar el efecto de la cepa nativa TCN-014 y la cepa comercial TCC-005 de *T. harzianum* en la germinación y crecimiento temprano de *Passiflora edulis* (maracuyá) utilizando a *T. harzianum* como un MIPOCEVE, determinaron el efecto benéfico al observarse una mayor producción de raíces secundarias en *P. edulis* inoculada con la cepa de *T. harzianum* TCN-014, así como el aumento del grosor en un 45 % en los tallos de la misma, siendo mejor el uso de cepas nativas en relación a las comerciales, ya que están mejor adaptadas a las características del ecosistema en el que se desarrollan.

Jiménez *et al* (2011). Con el objetivo de evaluar y analizar en condiciones de umbráculo el efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas *Lycopersicon esculentum*, aplicaron *T. harzianum* en el semillero, en el trasplante, a los 15 días después del trasplante, en el semillero más el trasplante y en el semillero más el trasplante más los 15 días después del trasplante y sin aplicación del microorganismo. A pesar de no haber diferencias significativas en el

semillero, en las plantas se presentó un mejor desarrollo comparado con *L. esculentum* sin aplicación de *T. harzianum*, tanto en su parte aérea, como en la parte radical, ya que se incrementó significativamente la densidad de las raíces.

López *et al* (2012). Con el objetivo de analizar el efecto de *Trichoderma* sp en semillas de *Zea mays* con relación a su crecimiento, la semilla de *Z. mays* fue inoculada con *T. sp* y 65 días después de la siembra se determinó el crecimiento radical, los resultados obtenidos fueron que en su LR y PSR en las plantas inoculadas fue de 73.30 mm y 4.45 g respectivamente, valores que estadísticamente fueron diferentes comparados con *Z. mays* sin inocular, cuyos valores fueron 41.30 mm LR y 2.24 g PSR. En cuanto a la altura de la planta 60 días posteriores a la siembra, se obtuvo un valor de 90.01 cm de AP para *Z. mays* inoculado con *T. sp* valor estadísticamente distinto comparado con 51.87 cm de AP para *Z. mays* sin inocular.

Candelero *et al* (2015). Evaluaron el efecto de *Trichoderma* sp en *Capsicum chinense*, para esto inocularon *C. chinense* con *T. sp* y 45 días después de la inoculación, se evaluó el efecto de inoculo mediante el crecimiento vegetal. Los resultados obtenidos mostraron que el PSA a nivel de plántula *C. chinense* inoculado con *T. sp* tuvo una mayor ganancia de peso del 47.05 % comparado con *C. chinense* sin inocular a dosis recomendada de FN, en cuanto a la AP *C. chinense* inoculado con *Trichoderma* sp, obtuvo un incremento del 55.57 % con respecto a *C. chinensen* sin inocular a la dosis recomendada de FN. Estos resultados sugieren un

efecto positivo de *Trichoderma* sp en el crecimiento de *C. chinense* atribuido a la presencia del ácido indolacético, que es un regulador del crecimiento vegetal, así como a la acidificación de la rizósfera lo que ayuda a la solubilización de nutrientes para su absorción.

Otras investigaciones relacionadas como la de Romero-Garcia *et al* (2016), muestra el efecto positivo de 3 tipos de MIPOCEVE individuales y en consorcio, entre los que se encuentra *T. harzianum*, sobre el crecimiento y desarrollo de *P. vulgaris* inoculado con *Bacillus cereus* o *Rhizobium etli*, individual y consorcio junto con una disminución del fertilizante nitrogenado y *T. harzianum* inoculado en el suelo, donde los datos obtenidos indican que *T. harzianum*, *B. cereus* y *R. etli* tiene un efecto positivo en la temprana germinación de *P. vulgaris*, así como un mayor desarrollo radical en *P. vulgaris* inoculado con el consorcio de microorganismos y *T. harzianum* a dosis reducidas de FN, junto con una mayor producción de hojas que comparados con *P. vulgaris* sin inocular a dosis recomendadas de FN, son estadísticamente superiores, además de que existe la posibilidad de que no solo *Rhizobium etli* sea útil para la producción de *P. vulgaris*, con la ventaja de que *T. harzianum* puede proteger al cultivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias fitopatógenas.

6.- Hipótesis

Al inocular *T. harzianum* sobre *P. vulgaris* a una dosis reducida de FN al 50 %, se optimizara el FN sin afectar negativamente en el sano crecimiento del cultivo.

7.- Objetivos

7.1.- General

Analizar el efecto de la inculación con *T. harzianum* en *P. vulgaris* a dosis del 50 % de FN.

7.2.- Específico

Determinar la dosis de inculo de *T. harzianum* que genere la mejor respuesta de *P. vulgaris* al 50 % del NH₄NO₃.

8.- Materiales y Métodos

El ensayo se realizó en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB-UMSNH en jarras de Leonard donde las condiciones microclimáticas promedio en este invernadero fueron: temperatura de 23.2° C, luminosidad de 450 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 67 %.

P. vulgaris se sembró para analizar su respuesta a *T. harzianum* a dosis de 10 g, 20 g y 30 g / 100 g de semilla con el 50 % del FN. Se utilizaron jarras de Leonard para la medición de la respuesta de *P. vulgaris* a la inoculación con *T. harzianum*, un sistema hidropónico que está constituido por la parte inferior de media botella PET con la solución mineral del FN en forma de NH_4NO_3 (SOMI) en concentración del 100 % (1.0 g/L) para el control relativo y 50 % (0.5 g/L) para los tratamientos a pH 6.8 – 7.0, todo esto se unió con algodón que permitió el paso de la solución desde la base hasta la parte superior con 1 kg de suelo (*figura 1*).

El suelo se solarizó para reducir plagas y enfermedades (Banks *et al.* 2003), posteriormente se tamizó con una malla del No. 20. El análisis del suelo se realizó en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y se clasificó como arcilloso con pH moderadamente ácido de 6.02, bajo contenido de materia orgánica de 3.58 %; alta capacidad de intercambio catiónico de 26.64 C mol(+) Kg⁻¹; con una textura: arcilla 50 %, limo 7 % y arena 43 % (Basumatary *et al.* 2012). El suelo de

cada jarra se irrigó con agua potable antes de sembrar 4 semillas de *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* como se muestra en la figura 2. En la tabla 2 se muestran el diseño experimental de bloques al azar con 5 tratamientos y 3 repeticiones (García-González *et al.* 2005).

Figura 1. Diagrama de diseño de una jarra de Leonard (García-González *et al.* 2005).

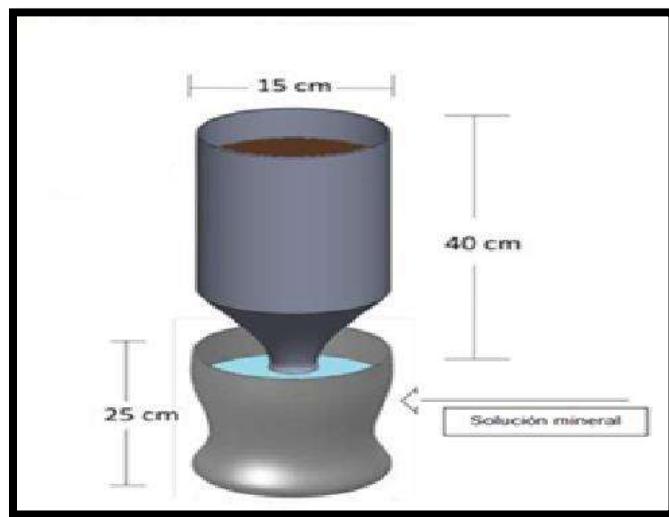


Figura 2. Preparación de las jarras de Leonard para su siembra (García-González *et al.* 2005).

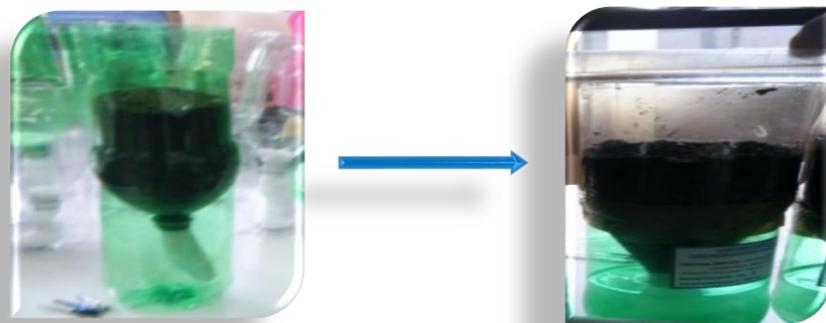


Tabla 2. Diseño experimental para analizar la respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación de 3 dosis de *Trichoderma harzianum* al 50 % del NH₄NO₃.

Tratamiento	<i>Phaseolus vulgaris</i>			
	H ₂ O (agua)	50 % de NH ₄ NO ₃	100 % de NH ₄ NO ₃	<i>Trichoderma harzianum</i>
Control absoluto (CA)	+	-	-	-
Control relativo (CR)	-	-	+	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> Tratamiento 1 (T1)	-	+	-	10 g / 100 g de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i> Tratamiento 2 (T2)	-	+	-	20 g / 100 g de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i> Tratamiento 3 (T3)	-	+	-	30 g / 100 g de <i>Phaseolus vulgaris</i>

Aplicado +; Sin aplicar -

8.1.- Origen de la cepa de *Trichoderma harzianum*.

Se utilizó una cepa de *T. harzianum* liofilizada, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

8.2.- Inoculación de la semilla de *Phaseolus vulgaris* con *Trichoderma harzianum*.

Las semillas de *P. vulgaris* se desinfectaron con hipoclorito de sodio (Clorox ®) al 0.6 % 5 min, se enjuagaron 5 veces con agua potable estéril, se desinfectaron en alcohol 70 % 5 min y se enjuagaron 5 veces con agua potable estéril, esto con el fin de eliminar otros microorganismos no deseados, entonces 64 semillas (100 g de *Phaseolus vulgaris*), se depositaron por bolsa de plástico para cada tratamiento como se señala en la *tabla 2*, las 64 semillas se inocularon con 10 g, 20 g y 30 g de *T. harzianum* / 100 g de semilla según el tratamiento (Sánchez-Yáñez. 2007).

8.3.- Variables respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación con *Trichoderma harzianum* a distintas dosis.

Se consideraron el porciento (%) de germinación y días a emergencia de las semillas de *P. vulgaris* a los 8 días después de la siembra, luego a nivel de plántula, floración y madurez fisiológica. El primer muestreo de plántula a 20 días posteriores de la siembra, a floración 57 días posteriores y a madurez fisiológica a los 90 días después de la siembra.

En *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* al 50 % del NH₄NO₃, como *P. vulgaris* sin inocular con el 100 % del NH₄NO₃ o CR, se midió la fenología aérea y radical; altura de plántula (**AP**) y longitud radical (**LR**). Además la biomasa; peso fresco aéreo (**PFA**) y peso fresco radical (**PFR**), y se determinó el peso seco aéreo (**PSA**) y el peso seco radical (**PSR**). Los datos experimentales se analizaron por ANOVA / Tukey HSD, $p < 0,01\%$ (Walpole *et al.* 2007). Para los elementos del rendimiento y la madurez fisiológica se utilizó la fórmula propuesta por: (Valdivia Lorente R. R. 2010).

9.- Resultados

En la tabla 3, se muestra el porcentaje (%) de germinación de *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* al 50 % del FN, en donde *P. vulgaris* con la dosis de 30 g de *T. harzianum* obtuvo un 93.8 % de germinación a los 4.5 días de emergencia; *P. vulgaris* inoculado con 20 g de *T. harzianum* al 50 % del FN un 90.6 % de germinación a los 4.5 días de emergencia; y *P. vulgaris* inoculado con 10 g de *T. harzianum* al 50 % del FN con un 70.3 % de germinación a los 5.8 días de emergencia, valores estadísticamente diferentes comparados con *P. vulgaris* alimentado solo con el FN al 100 % que obtuvo un 93.7 % de germinación a los 7.3 días de emergencia.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Trichoderma harzianum* al 50 % del fertilizante nitrogenado.

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Porcentaje de germinación (%)	Días de emergencia
Sin inocular irrigado con agua. Control absoluto	92.2 *ab ± 0.92	8.0 *d ± 0.08
Sin inocular y 100 % de NH ₄ NO ₃ control relativo (CR)	93.8 *a ± 0.94	7.3 *c ± 0.07

<i>Trichoderma harzianum</i> 10 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T1)	70.3 *c ± 0.70	5.8 *b ± 0.06
<i>Trichoderma harzianum</i> 20 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T2)	90.6 *b ± 0.90	4.5 *a ± 0.05
<i>Trichoderma harzianum</i> 30 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T3)	93.8 *a ± 0.94	4.5 *a ± 0.05

* Valores con letras distintas tienen diferencia estadística según Tukey < 0.01 %. ± Error estándar.

En la tabla 4, se observa la fenología a nivel plántula de *P. vulgaris* en donde la dosis 30 g de *T. harzianum* al 50 % de FN tiene una AP de 12.7 cm y 18.4 cm de LR; mientras que *P. vulgaris* con la dosis 20 g de *T. harzianum* al 50 % de FN obtuvo una AP de 14.4 cm y 18.1 cm de LR, estos valores fueron estadísticamente distintos comparados con los 17.5 cm de LR y 19.6 cm de AP para *P. vulgaris* alimentado con el 100 % de FN y sin inocular con el microorganismo.

Tabla 4. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Trichoderma harzianum* al 50 % del fertilizante nitrogenado sobre su fenología a nivel de plántula

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fenología	
	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)
Sin inocular irrigado con agua. Control absoluto	20.3 *a ± 0.2	14.7 *d ± 0.14
Sin inocular y 100 % de NH ₄ NO ₃ control relativo (CR)	19.6 *b ± 0.19	17.5 *b ± 0.18

<i>Trichoderma harzianum</i> 10 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T1)	16.4 *c ± 0.16	16.6 *c ± 0.17
<i>Trichoderma harzianum</i> 20 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T2)	14.4 *d ± 0.14	18.1 *a ± 0.18
<i>Trichoderma harzianum</i> 30 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T3)	12.7 *e ± 0.12	18.4 *a ± 0.18

* Valores con letras distintas tienen diferencia estadística según Tukey < 0.01 %. ± Error estándar.

En la tabla 5, se muestra la respuesta positiva de *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* en función a la biomasa; donde *P. vulgaris* inoculado con 20 g de *T. harzianum* al 50 % de FN obtuvo unos valores de 3.11g PFA y 0.27 g PSA, y un PFR de 1.65 g y 0.11 g de PSR; *P. vulgaris* inoculado con 30 g de *T. harzianum* al 50 % de FN presento un PFA de 2.51 g y 0.25 g de PSA con un PFR de 1.56 g y 0.14g de PSR, valores que estadísticamente son diferentes comparados con *P. vulgaris* sin inocular y alimentado con FN al 100 % de 3.64 g sobre su PFA y 0.27 g de PSA junto con su PFR de 1,33 g y PSR 0.08 g.

Tabla 5. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* inoculado con *Trichoderma harzianum* al 50 % de fertilizante nitrogenado sobre su biomasa a nivel de plántula.

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Peso fresco áereo (g)	Peso fresco radical (g)	Peso seco áereo (g)	Peso seco radical (g)

Sin inocular irrigado con agua. Control absoluto	3.08 *b ± 0.03	0.84 *e ± 0.01	0.23 *d ± 0.002	0.06 *e ± 0.001
Sin inocular y 100 % de NH ₄ NO ₃ control relativo (CR)	3.64 *a ± 0.04	1.33 *d ± 0.01	0.28 *a ± 0.003	0.08 *d ± 0.001
<i>Trichoderma harzianum</i> 10 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T1)	2.45 *d ± 0.02	1.4 *c ± 0.01	0.22 *e ± 0.002	0.12 *b ± 0.001
<i>Trichoderma harzianum</i> 20 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T2)	3.11 *b ± 0.03	1.65 *a ± 0.02	0.27 *b ± 0.003	0.11 *c ± 0.001
<i>Trichoderma harzianum</i> 30 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T3)	2.51 *c ± 0.03	1.56 *b ± 0.02	0.25 *c ± 0.002	0.14 *a ± 0.001

* Valores con letras distintas tienen diferencia estadística según Tukey < 0.01 %. ± Error estándar.

Los valores obtenidos en la tabla 6, muestra la respuesta positiva de *P. vulgaris* al ser inoculado con *T. harzianum* en función a la biomasa; donde *P. vulgaris* inoculado con 20 g de *T. harzianum* al 50 % del FN generó un PFA de 42.5 g con un PSA de 7 g y un PFR de 23.5 g con un PSR de 3.2 g, que al ser comparados estadísticamente con los 35.4 g de PFA con un PSA de 5.1 g y un PFR de 13.6 con un PSR de 1.4 g de *P. vulgaris* sin inocular y con el 100 % de FN, fue menor la cantidad de sus pesos, esto a pesar de ser alimentado a la dosis recomendada del FN.

Tabla 6. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la inoculación con *Trichoderma harzianum* al 50 % del fertilizante nitrogenado a nivel de floración en relación a su biomasa.

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Peso fresco aéreo (g)	Peso fresco radical (g)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radical (g)
Sin inocular irrigado con agua. Control absoluto (CA)	12,9 *e ± 0.13	5,8 *d ± 0.06	1,9 *e ± 0.02	0,6 *e ± 0.01
Sin inocular y 100 % de NH ₄ NO ₃ control relativo (CR)	35,4 *d ± 0.35	13,6 *c ± 0.14	5,1 *b ± 0.05	1,4 *d ± 0.01
<i>Trichoderma harzianum</i> 10 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T1)	34,3 *c ± 0.34	21,2 *b ± 0.21	5,4 *d ± 0.05	2,2 *b ± 0.02
<i>Trichoderma harzianum</i> 20 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T2)	42,5 *a ± 0.45	23,9 *a ± 0.24	7,0 *a ± 0.07	3,2 *a ± 0.03
<i>Trichoderma harzianum</i> 30 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T3)	33,5 *d ± 0.34	13,6 *c ± 0.14	5,0 *c ± 0.05	2,1 *c ± 0.02

* Valores con letras distintas tienen diferencia estadística según Tukey < 0.01 %. ± Error estándar.

Los datos acumulados en la tabla 7 sobre la maduración del cultivo de *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* al 50 % del FN comparados con *P. vulgaris* sin inocular y al 100 % del FN, mostraron una diferencia estadística según ANOVA / Tukey HSD

$P < 0.01 \%$, *P. vulgaris* inoculado con *T. harzianum* al 50 % del NH₄NO₃ comparado con *P. vulgaris* sin inocular y al 100 % de NH₄NO₃.

Tabla 7. Respuesta de *P. vulgaris* a la inoculación con *T. harzianum* al 50 % del NH₄NO₃ a nivel de floración.

<i>Phaseolus vulgaris</i>	Numero vaina/planta	Numero granos/vaina	Peso fresco promedio (g)	Peso seco promedio (g)
Sin inocular irrigado con agua.	4,8 *c ± 0.05	3,1 *b ± 0.03	1,9 *e ± 0.02	0,6 *d ± 0.01
Sin inocular y 100% de fertilizante nitrogenado. (CR)	3,8 *d ± 0.04	2,7 *d ± 0.03	3,1 *c ± 0.03	0,8 *c ± 0.01
<i>Trichoderma harzianum</i> 10 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T1)	3,5 *e ± 0.04	4,2 *a ± 0.04	2,8 *d ± 0.03	0,8 *c ± 0.01
<i>Trichoderma harzianum</i> 20 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T2)	5,0 *b ± 0.05	3,1 *b ± 0.03	3,3 *b ± 0.03	0,9 *b ± 0.01
<i>Trichoderma harzianum</i> 30 g / 100 g semilla al 50 % NH ₄ NO ₃ (T3)	7,8 *a ± 0.08	3,0 *c ± 0.03	4,2 *a ± 0.04	1,2 *a ± 0.01

* Valores con letras distintas tienen diferencia estadística según Tukey $< 0.01 \%$. ± Error estándar.

10.- Discusión

Como se mostró en la *tabla 2*, el porcentaje (%) de germinación / días de emergencia favorece a *P. vulgaris* inoculado con la dosis de 30 g de *T. harzianum* / 100 g semilla al 50 % del NH₄NO₃, lo que sugiere la degradación del endospermo ayudando a romper con mayor velocidad éste en *P. vulgaris*, acelerando su proceso de germinación (Cupull *et al.*, 2003; Romero-García *et al.*, 2016) cuyos valores numéricos fueron estadísticamente diferentes comparado con los de *P. vulgaris* alimentado solo con el NH₄NO₃ al 100 % o CR.

En la etapa de plántula que se muestra en la tabla 3, se observa la respuesta de *P. vulgaris* en cuanto a su fenología, donde la dosis de 30 g de *T. harzianum* / 100 g semilla de *P. vulgaris* obtuvo una LR superior estadísticamente comparado con *P. vulgaris* sin inocular y al 100 % del NH₄NO₃, lo anterior hace referencia al estímulo existente del AIA por su efecto en una mayor cantidad de pelos radicales para explorar el suelo en busca del FN para su optimización (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009); en cuanto a su biomasa, en la tabla 4, se observa que la dosis 30 g de *T. harzianum* / 100 g semilla de *P. vulgaris* al 50 % del NH₄NO₃ registro el mejor PSR comparado a su homólogo sin inocular debido a la mayor producción de células por SUPOCEVE (López *et al.* 2010), quedando como la mejor dosis en esta etapa.

En la etapa de floración tabla 5, la dosis con la mejor respuesta es 20 g de *T. harzianum* / 100 g de semilla de *P. vulgaris* al 50 % del NH₄NO₃ que registró un PSA de 7 g y un PSR de 3.2 g, lo que hizo evidente de que hubo una mayor producción de células gracias a la mayor absorción de nutrientes disponibles, al mejor uso del FN disponible en el suelo y a la mineralización de otros compuestos por parte de *T. harzianum* (Lopez *et al.*, 2010), cuyos valores numéricos fueron estadísticamente diferentes a los 5.4 g de PSA y 2.2 g de PSR para *P. vulgaris* sin inocular al 100 % del NH₄NO₃ o CR.

La respuesta de *P. vulgaris* inoculado con las dosis 20 g y 30 g de *Trichoderma harzianum* / 100 g de semilla al 50 % del NH₄NO₃ fue favorable y sin causar un déficit nutricional en su crecimiento al reducir la dosis del FN, esto debido a la conversión de SUPOCEVE (Sánchez *et al.*, 2005), a partir de los exudados de la raíz de *P. vulgaris* por *T. harzianum* se logró una mejor absorción del FN junto con la proliferación de una mayor cantidad de raíces secundarias (Camargo-Cepeda *et al.*, 2013), y que además de evitar la excesiva degradación de la materia orgánica en el suelo y la lixiviación a mantos acuíferos por el exceso de NH₄NO₃, podría ser útil en el control de plagas por algunos fitopatógenos, y considerado también como un HOPOCEVE (Suárez Meza *et al.*, 2008; Caicedo *et al.*, 2010; Romero-García *et al.*, 2016), comparado con *P. vulgaris* sin inocular y al 100 % del NH₄NO₃.

11.- Conclusión

Con base en lo anterior, se concluye que *T. harzianum* obtuvo un efecto benéfico sobre la leguminosa de *P. vulgaris* al mejorar la absorción de nutrientes disponibles, junto a una mayor proliferación de sus raíces que exploran el suelo, todo esto aunado a la dosis de *T. harzianum* que fue clave para ejercer este efecto benéfico sobre *P. vulgaris*, dado que la muerte de los propágulos causa que la colonización de la raíz sea insuficiente para la optimización del FN, además de que *T. harzianum* es otra opción para la producción sustentable de *P. vulgaris* como lo es *Rhizobium etli*, con las ventajas de darle una protección contra algunos hongos y bacterias fitopatógenos y al optimizar directamente la dosis de FN, que evita la contaminación de agua superficial y acuíferos por el uso desmedido.

12.- Bibliografía

1. Armenta-Bojórquez, A.; García-Gutiérrez, C.; Camacho-Báez, R.; Apodaca-Sánchez, M.; Montoya, L.; Nava-Pérez, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximbai 6: 51-56.
2. Banks M. K., Kulakow P., Schwab A. P., Chen Z., Rathbone K. 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor* International Journal of Phytoremediation. 5(3): 225–234
3. Basumatary, B., Bordoloi, S., Sarma H., P. 2012. Crude Oil-Contaminated Soil Phytoremediation by Using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. Water, Air, Soil and Pollution. 223(6): 3373-3383.
4. Caicedo, J., Orellana, H., Arahana, V., 2010. Influencia de microorganismos promotores de crecimiento y fijadores de nutrientes, en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tumbaco, Pichincha. Rumipamba 14:141-149.
5. Camargo-Cepeda, D., Avila, E.R., 2013. Efectos del *Trichoderma sp.* Sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). Ciencia y Agricultura: 91-100.

6. Candelero D., Reyes R., Tun S., Gamboa A., Ruiz S., 2015. *Trichoderma* spp promotoras del crecimiento en plantas de *Capsicum chinense* Jacq. Y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. Revista internacional de botánica experimental 84: 113-119.
7. Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N., Mejía, L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá. Agronomía Colombia. 27: 81–86.
8. Cupull Santana R., Andreu Rodríguez C. M., Perez Navarro C., Delgado Perez Y., Cupull Santana M. C., 2003. 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. 30 (1): 21-25.
9. Flores Lara, M., 2015. El cultivo de frijol en México. Revista digital universitaria UNAM 16 (2): 1-11 ISBN: 1607-6079.
10. García-González, M. M.; Farías-Rodríguez, R.; Peña-Cabriales, J. J.; Sánchez-Yáñez, J. M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp y *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoamericana 23: 65-72.

11. Jiménez, C., Sanabria de Albarracín, N., Altuna G., Alcano M. 2011. Efecto de *T. harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de *Lycopersicon esculentum* (Tomate). Revista Facultad de Agronomía. (LUZ). 2011, 28: 1-10.
12. Lopez, Y., Pineda, J., Hernandez, A., Ulacio D. 2010. Efecto del crecimiento de seis tratamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento en las plantas de maíz. Bioagro 22: 37-42.
13. Palafox-Caballero, A., Tosquy-Valle, O., Sierra-Macías, M., Turrent-Fernández, A., Espinosa-Calderón, A. 2005. Respuesta de híbridos de maíz normales y de alta calidad de proteína a la fertilización química. Terra Latinoamericana. 23:129-135.
14. Romero-García, V. E., García-Ortiz, V. R., Hernández-Escáñero, J. J., Sánchez-Yáñez J. M. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Ciencia y Agricultura 11: 91-100.
15. Sánchez, J., Valencia, H., Valero, N. O. 2005. Producción de ácido indolacético por microrganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque

altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 177-193. ISBN: 958-701-481-2

16. Sánchez-Yáñez, J.M. 2007. Breve Tratado de Micro-biología Agrícola, teoría y práctica, Ed. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. COSUSTENTA, S.A. de C.V., CIDEM, SEDAGRO. Morelia, Michoacán, México. ISBN: 9789709542417
17. Suárez Meza, C. L., Fernández Barbosa, R. J., Valero, N. O., Gámez Carrillo, R. M., Páez Redondo, A. R. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología 10: 35-43.
18. Valdivia Lorente R. R., 2010. Cómo determinar el rendimiento de frijol en producción de semilla a nivel artesanal. Proyecto A4N, Catholic Relief Services. 1-4
19. Villacís-Aldaz, L., Chungata L., Pomboza P., León O., 2016. Compatibilidad y tiempo de sobrevivencia de cuatro microorganismos benéficos de uso agrícola en biol. Journal of the Selva Andina Biosphere. 4 (1): 39-45. ISBN: 2308-3867.

20. Walpole, R.; Myers, R.; Myers, S.; Keying, Y. 2007. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencia. Editorial Pearson. México. ISBN: 978-607-32-1417-9.