**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

**“Dr. MARTÍN CÁRDENAS”**

****

 **Evaluación de la aplicación de bioinoculantes con *Bacillus* y *Trichoderma* en la producción forrajera de alfalfa**

PERFIL DE TESIS

**RESUMEN DE TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO

DE INGENIERO AGRÍCOLA

**NOELIA TAMARA ASCUY REYES**

**COCHABAMBA-BOLIVIA**

**2022**

**Evaluación de la aplicación de bioinoculantes con Bacillus y Trichoderma en la producción forrajera de alfalfa**

**Noelia Tamara Ascuy Reyes**

**noeascuy@gmail.com**

**Resumen**

La alfalfa, es una leguminosa perenne. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de Bacillus y Trichoderma en el comportamiento agronómico del cultivo de alfalfa, en condiciones de campo en el CIF “La Violeta” de Tiquipaya. Los tratamientos fueron: T1 (Testigo), T2 (*Bacillus* sp.), T3 (*Trichoderma* spp*.*)y elT4 (*Trichoderma* spp. *y Bacillus* sp.). Para la variable altura de planta, se evidenció diferencias significativas entre tratamientos en el primer y segundo corte. En la variable días a la floración, se observó diferencias significativas en los tres cortes; donde el T3 llegó a florecer primero. En el peso de materia verde, se mostró diferencias significativas, donde el T4 fue la mejor en cada corte. En el peso de materia seca, se observó diferencias significativas entre las diferentes etapas de evaluación, pero no en la interacción entre cortes y tratamientos. Para la variable relación hoja/tallo con respecto al peso de la hoja, el T4 presentó el dato superior con respecto al T1 que mostró los datos más bajos entre los tratamientos. Respecto al peso de los tallos, hubo un efecto positivo de los bioinoculantes en el T4 y el T2, con respecto al T3 y T1 en las tres evaluaciones. Para la variable de mesofauna en el número de ácaros, el T2 y el T3 no fueron diferentes estadísticamente, pero ambas fueron superiores al T4 y al T1.Con respecto al número de colémbolos para la variable de meso fauna, se observó diferencias significativas entre el T2 y el T3, siendo superiores al T1 y T4, eso muestra que el suelo es afectado por el uso de estos bioinoculantes.

***Palabras claves:*** Microorganismos; Biomasa; *Medicago sativa* L.

**Evaluation of the application of bioinoculants with *Bacillus* and *Trichoderma* in the forage production of alfalfa**

**Summary**

Alfalfa is a perennial legume. The objective of this work was to evaluate the effect of Bacillus and Trichoderma on the agronomic behavior of the alfalfa crop, under field conditions at the CIF "La Violeta" of Tiquipaya. The treatments were: T1 (Control), T2 (*Bacillus* sp.), T3 (*Trichoderma* spp.) and T4 (*Trichoderma* spp. and *Bacillus* sp.). For the plant height variable, significant differences were found between treatments in the first and second cuts. In the variable days to flowering, significant differences were observed in the three cuts; where T3 came to flower first. In the weight of green matter, significant differences were shown, where T4 was the best in each cut. In dry matter weight, significant differences were observed between the different evaluation stages, but not in the interaction between cuts and treatments. For the leaf/stem ratio variable with respect to leaf weight, T4 presented the highest data with respect to T1, which showed the lowest data among treatments. Regarding the weight of the stems, there was a positive effect of the bioinoculants in T4 and T2, with respect to T3 and T1 in the three evaluations. For the mesofauna variable in the number of mites, T2 and T3 were not statistically different, but both were higher than T4 and T1. Regarding the number of springtails for the meso fauna variable, significant differences were observed between T2 and T3, being higher than T1 and T4.

***Keywords:*** Microorganisms; biomass; *Medicago sativa* L.

1. **INTRODUCCIÓN**

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa forrajera perenne, considerada como la reina de las plantas forrajeras cultivada en todas las regiones del mundo, en climas subtropical, templado y seco (Liu et al., 2015); la importancia de la alfalfa se debe a su potencial de producción y valor nutritivo, y a su utilización como forraje verde, heno, ensilado, pellets y otros; por lo que se han realizado muchas investigaciones para su mejora genética (Marijana et al. 2011). La alfalfa tiene una alta calidad nutricional y producción de biomasa se adapta ampliamente a diversos climas y es más efectiva que los cultivos anuales para reducir la escorrentía y la erosión del suelo, buena palatabilidad, alta persistencia y fácil manejo (Rogers et al., 2014).

Diferentes especies de *Trichoderma* pueden mejorar el desarrollo del simbionte micorrícico, cuya interacción tiene influencia sobre el crecimiento de la planta hospedante (Calvet et al., 1993; Godeas et al., 1999).

Trabajos realizados en diversas partes del mundo y con varios modelos, han combinado inóculos de HFMA con cepas de distintas especies de *Trichoderma* e incluso con otros microorganismos como fitopatógenos o promotores del crecimiento vegetal (Srinath et al., 2003).

Asimismo han reportado los efectos beneficiosos derivados de la aplicación de productos a base de *Bacillus subtilis* en el control de enfermedades. Los mismos se explican a través de dos vías: 1) la inducción de resistencia sistémica ((ISR, “induced systemic resistance", Ryu et al., (2004), Ongena et al., (2007) y 2) la producción de antibióticos y agentes antimicrobianos (Hammami et al.,2009).

* 1. **Objetivos**
		1. ***Objetivo general***

Evaluar el efecto de *Bacillus* y *Trichoderma* en el comportamiento agronómico del cultivo de alfalfa, en condiciones de campo en el CIF “La Violeta” de Tiquipaya.

* + 1. ***Objetivos específicos***
* Determinar el efecto de los bioinoculantes en el desarrollo de las plantas de alfalfa.
* Determinar el bioinoculante más apropiado para la producción de biomasa de alfalfa.
* Analizar el impacto de los bioinoculantes en la micro fauna y micro flora del suelo donde se cultiva alfalfa.

**II. MATERIALES Y MÉTODOS**

**2.1. Ubicación**

EI ensayo se llevó a cabo en el fundo universitario del Centro de Investigación en Forrajes (CIF) “La Violeta”, dependiente de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias de la Universidad Mayor de San Simón, en el Municipio de Tiquipaya. Geográficamente el CIF está ubicado a 17º 20’ 50’’ de latitud Sur y 66º 13’ 54’’ de longitud Oeste. La zona tiene una altitud promedio de 2680 msnm. El clima es templado, con otoño y primaveras semisecas y sin cambios de temperatura invernales bien definidas. La precipitación media anual es 554.86 mm, el periodo lluvioso por lo general se distribuye en los meses de noviembre a marzo. Los suelos de “La Violeta,” son de formación coluvio-aluvial, por descomposición de material acarreado por el agua de la cordillera circundante. Son suelos profundos, moderadamente drenados, tienen una textura media franco limoso (CIF “La Violeta”, 2010).

**2.2. Materiales y equipos**

 a) *Material vegetal*

Parcela de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) establecida hace dos años con la variedad africana.

 *b) Material biológico*

* *Bacillus* sp.
* *Trichoderma* sp*.*

 *c) Material de campo*

* Herramientas de trabajo: picota, azadón, hoz, bolsas plásticas, cinta métrica y balanza.
* Mochila para fumigar
* Balde
* Guantes
* Barbijos
* Estacas
* Pita (rafia)

 *d) Material de oficina*

* Libreta de campo
* Lápiz
* Goma para borrar
* Cuaderno de registro
* Cámara fotográfica

e)*Material bibliográfico*

* Tesis
* Libros
* Artículos científicos
* Revistas
* Internet

**2.3. Metodología**

* + 1. ***Preparación de la parcela***

El presente ensayo se realizó en una parcela de alfalfa cultivada con la variedad africana, la misma al momento de iniciar la investigación, ya tenía dos años de establecimiento en una superficie total de 1269 m². De esta superficie total la superficie efectiva en el ensayo fue de 1056 m² siendo cada unidad experimental de 66 m².

* + 1. ***Corte de alfalfa***

Se hizo el corte del cultivo de alfalfa y a los 10 días después de realizar el corte, cuando los brotes median entre 10 y 15 cm se hizo un riego por inundación, pasado 3 días del riego, se procedió a hacer la aplicación de los bioinoculantes.

* + 1. ***Control de malezas***

Se llevó a cabo el control de malezas de manera manual junto con ayuda de un azadón.

* + 1. ***Caracacteristicas del ensayo***

Nº de surcos por UE: 12 surcos

Largo surco: 11 m

Distancia entre surcos: 0.50 m

Anchó de la parcela: 6 m

Área total del bloque: 66 m2

Área total del ensayo 1269 m2

* + 1. ***Aplicación de los Tratamientos***

La inoculación se realizó con la bacteria *Bacillus* sp.y el hongo *Trichoderma* spp.

Los tratamientos se aplicaron al suelo en la distancia de surco entre surco de 50 cm, el hongo *Trichoderma* spp. de forma sólida en una relación de 10 gramos/hectárea y la bacteria *Bacillus* sp. de igual manera sólida, en una relación de 1 kilogramo/hectárea, con una mochila fumigadora de 20 litros, en suelo húmedo.

* + - 1. **Tratamiento 1 testigo.** Al tratamiento del testigo no se aplicó ningún bioinoculante.
			2. **Tratamiento 2 *Bacillus*.** Se preparóla solución de *Bacillus* en 20 litros de agua lo cual se aplicó 5 litros a cada parcela, en los pasillos de los surcos en suelo húmedo a los 3 días después del riego que en total fueron 4 repeticiones.
			3. **Tratamiento 3 *Trichoderma.*** Se preparó la solución de *Trichoderma* en 20 litros de agua, cada 5 litros para una unidad experimental, donde fueron 4 repeticiones.
			4. **Tratamiento 4 interacciones entre *Bacillus* y *Trichoderma.*** Se preparó ambos bioinoculantes en 20 litros de agua, 5 litros para cada unidad experimental de las 4 repeticiones.
		1. ***Variables de respuesta***

Las variables de respuesta evaluadas fueron:

* Altura de planta (cm).
* Días a la floración.
* Peso de follaje fresco (corte).
* Peso de follaje seco (corte).
* Relación hoja/tallo (corte).
* Meso fauna del suelo.
	+ 1. ***Diseño experimental***

Para evaluar las variables de respuesta de los 4 tratamientos, con 4 repeticiones, se empleó el Diseño experimental en Bloques Completos al Azar (BCA) con tratamientos no estructurados, cada unidad experimental tuvo una superficie de 66 m², en total fueron 16 unidades experimentales.

 *Tratamientos:*

 T1 = Testigo (sin bioinoculante)

 T2 = *Bacillus* sp.

 T3 = *Trichoderma* spp.

 T4 = Interacción de *Trichoderma* sp. *y Bacillus* spp.

**III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**3.1. Altura de planta promedio de 3 cortes**

Para la variable altura de planta, con la aplicación de bioinoculantes, se muestra los promedios de los 3 cortes realizados en diferentes épocas del año (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Altura de planta promedio de 3 cortes.

|  |
| --- |
| Altura de plantas promedio de 3 cortes |
| Tratamiento | Alt. Plant. (cm) |
| B | 75 ab |
| T | 80 a |
| B\*T | 71 b |
| Test | 72 b |

El ANVA para la variable altura de planta en promedio de los 3 cortes en el Cuadro 1 detecto diferencias significativas, donde *Trichoderma* tiene mayor tamaño en las diferentes épocas del año evaluadas. Lo cual indica que en cada corte realizado se tendría una mayor altura de planta con respecto al testigo y *Bacillus* que tienen valores menores. Ya que *Trichoderma* tiene mejor simbiosis con la planta y ayuda a su crecimiento de manera positiva. Esto se observa en la Figura 1.

**Figura 1.** Altura de planta promedio de 3 cortes.

**3.3. Días a floración (promedio de 3 cortes)**

En la Figura 2, se observa las diferencias no significativas en los tres cortes que se realizó. En la cual el tratamiento de *Trichoderma* y *Bacillus* llegan a florecer antes que los demás, seguido de la interacción entre *Bacillus* y *Trichoderma*, con respecto al testigo que floreció al final de los otros tratamientos.

Esto indica que los bioinoculantes no inducen a la floración de manera positiva, ya que la alfalfa florece de acuerdo con su fisiología.

**Figura 2.** Días a la floración promedio de los 3 cortes.

**3.4. Rendimiento en materia verde acumulada (promedio de 3 cortes)**

Para esta variable de materia verde acumulada, en el Cuadro 2 se observa las diferencias estadísticas no significativas, con un coeficiente de variación (CV) de 10 % y con la separación de medias por la prueba de Duncan.

**Cuadro 2.** Rendimiento de materia verde (promedio de 3 cortes).

|  |
| --- |
| **Rendimiento en MV (promedio de 3 cortes)** |
| **Tratamientos** | **Peso (kg/ha)** |
| T | 26372ª |
| B\*T | 25558ª |
| Testigo | 23786ª |
| B | 24537ª |

El ANVA para esta variable donde todos los tratamientos son iguales estadísticamente, pero entre ellas la que más resalta con respecto al testigo es *Trichoderma*, debido a la cantidad de biomasa que logra acumular en los 3 cortes, en las distintas épocas de evaluación realizadas.

En los forrajes la cantidad y calidad es fundamental si hablamos de rendimiento, por lo que se justifica al tratamiento de *Trichoderma* como la mejor entre todos los tratamientos, debido a la cantidad de rebrotes que tenía en cada uno de los cortes realizados del cultivo de alfalfa.

**Figura 3.** Rendimiento de materia verde acumulada en los 3 cortes.

**3.5. Rendimiento en materia seca acumulada (promedio de 3 cortes)**

 En el Cuadro 3 se puede observar los promedios calculados con Duncan para la variable de materia seca, con un coeficiente de variación del 10 %.

**Cuadro 3.** Rendimiento de materia seca (promedio de 3 cortes).

|  |
| --- |
| **Rendimiento en MS (promedio de 3 cortes):** |
| **Tratamientos** | **Peso (kg/ha)** |
| T | 5749ª |
| B\*T | 5682ª |
| Testigo | 5385ª |
| B | 5290ª |

Según los cálculos del ANVA para esta variable no hay diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos. Pero el tratamiento de *Trichoderma* llega a obtener mayor acumulación de materia seca en cada uno de los cortes realizados.

Esto demuestra que este tratamiento con mejor rendimiento de materia seca logra obtener más cantidad de proteína en cada corte que se realizó, lo que nos indica la calidad del forraje que se obtiene.

**Figura 4.** Rendimiento de materia seca acumulada en los 3 cortes.

**3.6. Relación hoja y tallo**

El análisis de varianza en el Cuadro 4 que se presenta es no significativo, esto se deduce que los bioinoculantes no influyeron en la producción total de la materia seca. Los tratamientos muestran su efecto estadísticamente a través del tiempo en cada uno de los cortes.

**Cuadro 4.** Relación h/t promedio de 3 cortes

|  |
| --- |
| **Relación h/t promedio de 3 cortes** |
| **Tratamientos** | **Peso en g** |
| B | 0,8 a |
| T | 0,9 a |
| B\*T | 0,9 a |
| Test | 0,8 a |

En la Figura 5 se observa diferencias no significativas estadísticamente para la variable relación hoja/tallo donde todos los tratamientos muestran datos estadísticamente no significativos

Pero la mejor entre todos los tratamientos y en los 3 cortes, llega a ser *Trichoderma* seguido de la interacción de *Bacillus* y *Trichoderma* con respecto al testigo.

**Figura 5.** Comparación de medias relación hoja/tallo.

**3.7. Promedio de número de ácaros**

Para la variable número de ácaros en la Figura 6 muestra la comparación de medias respecto al número de ácaros, el cual indica que dichas cifras no son diferentes estadísticamente, entre los tratamientos.

Esto indica que los bioinoculantes no afectan a la meso fauna del suelo, más al contrario favorecen a la acción de los microorganismos.

**Figura 6.** Promedio de número de ácaros (2 lecturas).

**3.8. Promedio de número de colémbolos**

En la Figura 7 se ve con respecto al promedio de colémbolos para la variable de meso fauna diferencias significativas entre *Trichoderma* y *Bacillus*, siendo los superiores con respecto al testigo e interacción entre *Bacillus* y *Trichoderma,* que son inferiores.

**Figura 7.** Promedio de número de colémbolos (2 lecturas).

**IV. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los objetivos planteados y resultados obtenidos en la investigación, se establece las siguientes conclusiones.

En el peso de materia verde, se mostró diferencias no significativas, pero a se puedo observar que *Trichoderma* y la interacción entre *Bacillus* y *Trichoderma* pasan el promedio entre tratamientos, estos bioinoculantes aumentan en pequeña cantidad en la producción de biomasa, en cada corte, con respecto a los otros tratamientos.

Para la variable peso de materia seca, se mostró diferencias no significativas entre tratamientos, pero se observó que *Trichoderma* y la interacción entre *Bacillus* y *Trichoderma* serían las más representativas ya que superan el promedio entre tratamientos. Lo cual se puede ver las tendencias de los tratamientos con respecto al testigo.

Para la variable altura de planta, *Trichoderma* muestra diferencias altamente significativas con respecto al testigo, siendo esta la que mejor rindió en esta variable.

Con respecto al peso de relación hoja/tallo, *Trichoderma*, seguido a la interacción de *Bacillus y* *Trichoderma*, serían las mejores, a pesar de no mostrar diferencias significativas estadísticamente, presentó el dato más elevado en comparación de los tratamientos, en las tres evaluaciones.

Para la variable días a la floración, no se observó diferencias significativas en los tres cortes que se realizó; siendo que esta variable la planta misma lo expresa de acuerdo con su fisiología.

Para la variable de número de ácaros, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.Con respecto al número de colémbolos, se observó diferencias significativas entre *Trichoderma* y *Bacillus*, siendo superiores al testigo e interacción entre *Bacillus* y *Trichoderma*.

**V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Liu, D., Liu, G., Yang, Z. 2015. *The effect of sowing and harvesting factors on the yield of hay and the proportion of stem leaves of Medicago sativa. Acta Prataculturae Sinica.* 24(1): 48 – 57.

Marijana, T., Svetislav, P., Sonja, G., Tihomir, C., Snjezana, B. 2011. *Implementation of Molecular Markers Diversity in Parental Selection of Alfalfa (Medicago sativa L.)* Germplasm, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25(2): 2310-2314.

Rogers, A., Lawson, S., Chandra, K. 2014. *The limited application of irrigation water does not affect the nutritional characteristics of the Anim Pinchar alfalfa.* Sci. 54(10): 1635 – 1640.

Calvet, C; Barea, J; Pera, J. (1993). *Growth Response of Marigold* (*Tagetes erecta* L.) *to Inoculation with Glomus mosseae, Trichoderma aureoviride and Pythium ultimum in a Peat-Perlite Mixture*. Plant Soil. 148:1-6.

Godeas, A; Fracchia, S; Mujica, M; Ocampo, J. (1999). *Influence of Soil Impoverishment on the Interaction Between Glomus mosseae and Saprobe Fungi*. Mycorrhiza. 9:185-189.

Srinath, J; Bagyaraj, D; Satyanarayana, B. (2003). *Enhanced Growth and Nutrition of Micropropagated Ficus benjamina to Glomus mosseae Co-inoculated with Trichoderma harzianum and Bacillus coagulans*. World J Microbiol Biotechnol. 19:69-72.

Ryu, C.M; Farag, M A; HU, C H; Reddy, M S; Kloepper, J W; Pare, P W. (2004). *Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis*. Plant Physiology, v.134, 1017–1026 p.

Ongena, M; Jourdan, E; Adam, A; Paquot, M; Brans, A; Joris, B; Arpigny, J L; Thonart, P. (2007). *Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants*. Environmental Microbiology, v.9, 1084-1090 p.

Hammami, I; Rhouma, A; Jaouadi, B; Rebai, A; Nesme, X. (2009). *Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated Bacillus subtilis strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains*. Letters in Applied Microbiology, v.48, 253–260 p.

CIF (Centro de Investigación en Forrajes “La Violeta”). 2010. Cereales menores Avena, Cebada y Triticale: Características agronómicas y recomendaciones para su manejo y aprovechamiento. Boletín de capacitación en Producción de Forrajes. Cochabamba, Bolivia.