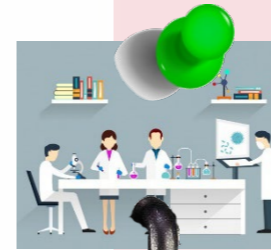


Tesis Doctoral



**TESIS DOCTORAL**

Diseño y evaluación agronómica y ambiental de un inoculante con cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp. para el cultivo de guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), en la República Dominicana

*Design and agro-environmental evaluation of an inoculant based on Bradyrhizobium sp. strains for pigeon pea (Cajanus cajan (L.) Millsp.), in the Dominican Republic*

**Tesis Doctoral presentada bajo la modalidad denominada “por compendio de publicaciones”**

**Tesis Doctoral con Mención Internacional**

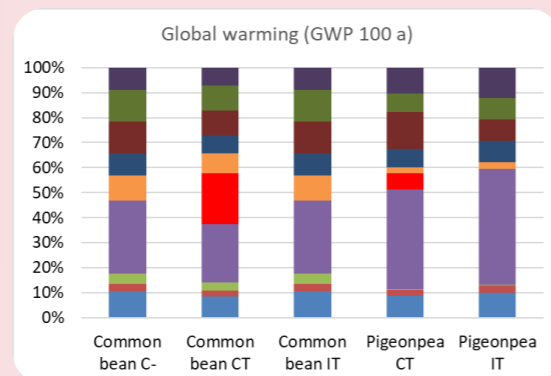
Programa de doctorado: Ingeniería de Biosistemas

**Director:**  
Dr. Fernando González-Andrés

Tesis presentada por:  
**Juan de la Cruz Araújo Lara**  
para optar al grado de Doctor

**Tutores de las estancias en el extranjero:**  
Dr. César Antonio Díaz Alcántara (UASD)  
Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández (CIIDIR)

Juan de la Cruz Araujo Lara



universidad  
de león



universidad  
de león

## TESIS DOCTORAL

Diseño y evaluación agronómica y ambiental de un  
inoculante con cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp. para el  
cultivo de guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), en la  
República Dominicana

*Design and agro-environmental evaluation of an inoculant  
based on Bradyrhizobium sp. strains for pigeon pea  
(Cajanus cajan (L.) Millsp.), in the Dominican Republic*

**Tesis Doctoral presentada bajo la modalidad denominada “por  
compendio de publicaciones”**

**Tesis Doctoral con Mención Internacional**

Programa de doctorado: Ingeniería de Biosistemas

**Director:**

Dr. Fernando González-Andrés

**Tutores de las estancias en el extranjero:**

Dr. César Antonio Díaz Alcántara (UASD)

Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández (CIIDIR)

Tesis presentada por:

**Juan de la Cruz Araújo Lara**

para optar al grado de Doctor



## **Dedicatoria**

### **A mis Padres Domitilio Araujo y Elcilia Lara**

Ustedes me dieron la vida e hicieron hasta lo imposible para estudiarme y hacer de mi un hombre de bien. Gracias por ser un ejemplo de humildad, seriedad, amistad y sacrificio para con sus hijos y los demás

### **A mi hijo Oscar**

Eres la luz que ilumina mi vida, eres sangre de mi sangre. Te amo mi niño

### **A mis hermanos Zuleika, Luís, Yeri, Ligia, Eugenia, Francisco.**

Ustedes me abrieron el camino del triunfo, han sido y serán mis mejores amigos toda la vida.



## Agradecimientos

### **A Dios**

Por guiarme por el camino correcto y estar a mi lado en cada momento.

### **Dr. Fernando González Andrés y Dra. Beatriz Urbano**

Por darme la oportunidad de estudiar en tierras extranjeras, dedicarme tanto tiempo, compartir sus conocimientos conmigo, brindarme sus amistades ... mil gracias. Al Dr. Fernando González Andrés además, por guiar mis pasos como tutor y director, en los estudios de doctorado y en la realización de esta tesis doctoral.

### **Dr. Dani Blanco**

Me acogiste como si fuese tu familia y siempre estuviste en los momentos más difíciles, estaré agradecido eternamente.

### **A la Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández**

Por acogerme en su centro de trabajo y transmitirme la necesidad de transferir en mi país la tecnología agraria aprendida durante mis estudios de doctorado, para contribuir al desarrollo rural y por tanto económico de mis gentes.

### **A los Prof. Cesar Diaz, Ángel Pimentel, Felipe Vicioso, Modesto Reyes, Iris Marcano, Juan Cedano**

Indiscutiblemente sin el apoyo de ustedes este sueño no se hubiese hecho realidad. gracias por confiar en mí.

A todo el equipo de investigación del IRENA, en especial a los del grupo IQUIMAB en el que se desarrolló esta tesis doctoral, y en particular a los que integran la línea "Biofertilizantes para Agricultura Sostenible", Rebeca Mulas, Raquel Pastor, Marcia Barquero e Iris Marcano, gracias por compartir conmigo tantos momentos.

Por último, quiero agradecer a las instituciones que han financiado, a través de proyectos y becas personales, los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral. Las sucesivas crisis económicas han producido la cancelación de proyectos y becas en curso y la suspensión temporal de las actividades. Aunque el camino ha estado minado de dificultades, se han ido abriendo nuevas vías, que se han enlazado e integrado para cumplir finalmente con los objetivos del trabajo: Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, (AECID); Universidad de León (España); Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD); Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (MESCT); Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales CONIAF (República Dominicana).



# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
Resumen gráfico.....	3
Palabras clave.....	3
1. Introducción .....	5
1.1. La situación socioeconómica de la República Dominicana y la integración del presente trabajo como acción de la Cooperación Española .....	5
1.2. La agricultura en la República Dominicana y su contribución a la economía del país.....	5
1.3. Las legumbres en la alimentación humana y la importancia del guandul ( <i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.) en la República Dominicana .....	6
1.4. Los inoculantes de rizobios para la producción de legumbres y su papel como estrategia sostenible en países en desarrollo .....	9
1.5. La “reinención” de los inoculantes para agricultura y estrategias para alcanzar la efectividad en campo .....	11
1.5.1. La estrategia de utilización de cepas autóctonas.....	12
1.5.2. Optimización de la formulación del inoculante .....	13
1.6. Biogeografía de los simbioses de guandul y efectividad de la nodulación natural.....	15
1.7. La dimensión ambiental en la utilización de los inoculantes en agricultura.....	16
2. Objetivos .....	19
3. Identificación de los artículos integrantes de la tesis “por compendio de publicaciones” y contribución a los objetivos .....	20
3.1. Identificación de los artículos e indicios de calidad .....	20
3.1.1. Artículo 1. Araujo et al. 2015 .....	20
3.1.2. Artículo 2. Araujo et al. 2017 .....	20
3.1.3. Artículo 3. Araujo et al. 2020a.....	20
3.1.4. Artículo 4. Araujo et al. 2020b .....	21
3.2. Contribución de los artículos a los objetivos específicos .....	21
3.3. Texto completo artículo 1. (Araujo et al. 2015) .....	23
3.4. Texto completo artículo 2. (Araujo et al. 2017) .....	31
3.5. Texto completo artículo 3. (Araujo et al. 2020a) .....	37
3.6. Texto completo artículo 4. (Araujo et al. 2020b) .....	49
4. Compendio de materiales y métodos .....	61
4.1. Aislamiento, purificación y conservación de simbioses procedentes del interior de los nódulos.....	61



4.2. Métodos moleculares y no moleculares para la identificación y caracterización de aislados .....	61
4.2.1. Extracción del ADN de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> para el análisis de RAPD .....	61
4.2.2. <i>Random Amplified of Polymorphic DNA</i> (RAPD) .....	62
4.2.2. Secuenciación de determinados genes bacterianos .....	63
4.2.2.1. Secuenciación del gen 16S rRNA .....	63
4.2.2.2. Secuenciación de otros genes diferentes al 16S rRNA en el MLSA .....	63
4.2.2.3. Ensamblaje, comparación y alineamiento de secuencias .....	63
4.2.3. Otras técnicas de caracterización molecular .....	64
4.2.4. Otras técnicas de caracterización de bacterias .....	64
4.3. Determinación de la efectividad de la simbiosis entre las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Cajanus cajan</i> en condiciones hidropónicas .....	64
4.4. Otras técnicas microbiológicas utilizadas en la evaluación de los soportes o <i>carrier</i> .....	65
4.5. Diseño experimental de los ensayos de campo .....	65
4.6. Parámetros analizados e índices calculados en los ensayos en planta .....	66
4.6.1. Número y biomasa de nódulos .....	66
4.6.2. Biomasa aérea y contenido de nitrógeno en la biomasa .....	66
4.6.3. Cálculo de índices sobre fijación simbiótica de nitrógeno .....	67
4.6.4. Rendimiento, componentes del rendimiento e índice de cosecha .....	67
4.7. Análisis estadísticos .....	67
4.8. Análisis del ciclo de vida (ACV) .....	68
5. Capítulo I. Aislamiento de rizobios autóctonos de guandul en República Dominicana, identificación de cepas y pres-selección mediante ensayos preliminares en planta .....	69
5.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo .....	69
5.2. Artículos que contribuyen al capítulo .....	69
5.3. Resumen de los resultados obtenidos .....	69
5.3.1. Aislamiento de cepas .....	69
5.3.2. Identificación de las cepas aisladas .....	71
5.3.3. Pre-selección de cepas mediante ensayos en planta .....	73
6. Capítulo II. Optimización de la formulación del inoculante .....	74
6.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo .....	74
6.2. Artículos que contribuyen al capítulo .....	74
6.2. Resumen de los resultados obtenidos .....	74
6.2.1. Selección del soporte o <i>carrier</i> a escala de laboratorio – TRL4 (Araujo et al. 2020a) .....	74

6.2.2. Definición del proceso productivo del inoculante a escala de planta piloto TRL5 (Araujo et al. 2020b).....	76
7. Capítulo III. Ensayo en campo para comprobar la efectividad de los inoculantes diseñados	79
7.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo .....	79
7.2. Artículos que contribuyen al capítulo .....	79
7.3. Resumen de los resultados obtenidos .....	79
7.3.1. Descripción de la estructura de los ensayos de campo .....	79
7.3.2. Primer ensayo de campo: Araujo et al. (2015).....	80
7.3.3. Segundo ensayo de campo: Araujo et al. (2020a) .....	82
7.3.4. Tercer ensayo de campo: Araujo et al. (2020b) .....	84
8. Capítulo IV. Análisis medioambiental de la utilización de inoculantes basados en rizobios para la producción de guandul en la República Dominicana basado en el ciclo de vida .....	86
8.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo .....	86
8.2. Artículos de contribuyen a este capítulo .....	86
8.3. Resumen de los resultados obtenidos .....	86
8.3.1. ACV del proceso industrial de producción del inoculante .....	86
8.3.2. ACV del proceso agrícola de producción del guandul utilizando la tecnología de la inoculación .....	87
9. Discusión general. La cadena de valor de los inoculantes de rizobios para guandul en la República Dominicana.....	91
9.1. Análisis del eslabón correspondiente a la selección de cepas autóctonas .....	92
9.2. Análisis del eslabón diseño de formulaciones .....	94
9.3. Análisis del eslabón fabricación del inoculante .....	96
9.4. Análisis del eslabón utilización en campo .....	97
10. Conclusiones.....	101
11. Bibliografía citada.....	105
12. Anejos. Material suplementario de los artículos. ....	115

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Superficie ocupada por los principales cultivos de República Dominicana en dos momentos de la serie histórica, 2008 y 2018. Datos en hectáreas tomados de FAOSTAT (2020). .....	6
Tabla 1.2. Datos sobre consumo, producción, importación y exportación de guandul en la República Dominicana (República Dominicana, 2020). .....	8
Tabla 3.1. Correspondencia entre los objetivos específicos de la Tesis Doctoral por la modalidad “compendio de publicaciones” y los artículos que la constituyen. ....	21
Tabla 5.1. Denominación de las cepas aisladas y lugar de aislamiento. ....	70
Tabla 5.2. Valores medios y ANOVA de una vía correspondiente a los parámetros utilizados para evaluar la efectividad de la fijación de nitrógeno en condiciones axénicas e hidropónicas. Los valores seguidos por la misma letra no mostraron diferencias significativas en la prueba LSD para $p < 0,05$ . Con fondo azul están marcadas las cepas que fueron consideradas de élite y son las que se sometieron a ensayos de campo. ....	73
Tabla 6.1. Fases del diseño y optimización de la formulación de los inoculantes de guandul en el presente trabajo. ....	75
Tabla 7.1. Resumen de los ensayos de campo realizados con indicación de la ubicación de cada uno de ellos, los factores fijos y aleatorios analizados en el correspondiente ANOVA, y las cepas involucradas. ....	79
Tabla 7.2. Características socio-agronómicas de cada una de las parcelas en las se han realizado los ensayos de campo del trabajo Araujo et al. (2015). En su conjunto representan los diferentes agrosistemas en los que suele cultivarse el guandul en la República Dominicana. Para datos edafológicos de cada parcela ver Tabla 1 del mencionado trabajo (Pág. 24 de esta memoria). 81	
Tabla 7.3. Tipo de variables dependientes que se analizaron en las diferentes parcelas, situadas en la provincia de San Juan de la Maguana, y cepas que empleadas en cada uno de los estudios. .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1. Ubicación de los lugares de recolección y aislamiento de cepas a partir del interior de los nódulos de cultivos de guandul. Las dos localidades están situadas en la provincia de Azua. ALSPC corresponde al paraje “La Siembra” en el municipio de Padre las Casas, y AMBPC al municipio de Monte Bonito (Tabla 5.1). .....	70
Figura 6.1. Fermentador piloto con reactor de 22,2 l de capacidad, diseñado por el grupo de investigación IQUIMAB, en el que se produjeron los inoculantes a escala piloto. ....	77
Figura 5.1. A) Ubicación de los lugares donde se realizaron los ensayos campo con guandul. Los de color verde corresponden al trabajo Araujo et al. (2015) compuesto por cuatro ensayos, los de color azul al trabajo Araujo et al. (2020a) (8 ensayos) y los de color rojo a Araujo et al. (2020b) (nueve ensayos). B) y C) son detalles correspondientes a la distribución de los ensayos de los trabajos Araujo et al. 2020 a, b respectivamente. ....	80
Figura 8.1. Ubicación de los lugares donde se realizaron los ensayos campo correspondientes al Análisis del Ciclo de Vida de la utilización de la tecnología de inoculación. En color rojo se representan los ensayos con guandul, y en color amarillo los que se realizaron con habichuela. ....	88

## ABREVIATURAS

ACV: Análisis del ciclo de vida

ADN: Acido desoxirribonucleico

ANCOVA: Análisis de la covarianza

ANOVA: *Analysis of variance* (análisis de varianza)

APOS: *Allocation at the Point of Substitution*

BNF: *Biological nitrogen fixation* (fijación biológica de nitrógeno)

BrEt: Bromuro de Etidio

CEC: *Cation exchange capacity* (capacidad de cambio catiónico)

CED: *Cumulative energy demand*

CFU: *Colony forming units* (unidades formadoras de colonias)

CT: *Conventional technology* (tecnología convencional)

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

E: Ambiente

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

EPS: Exopolisacáridos

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

FSN: Fijación simbiótica de nitrógeno

Gb: Genotipo de la bacteria

GLM: *General linear model* (modelo lineal general)

Gp: Genotipo de la planta

GWP: *Global warming potential* (potencial de calentamiento global)

ha: Hectárea

ISO: *International standard organization*

IT: Inoculation Technology

kg ha<sup>-1</sup>: kilogramos por hectárea

LCA: *Life cycle analysis*

LCA-CP: *Life cycle analysis of de crop production*

LCA-RI: *Life cycle analysis of rhizobial inoculant manufacture*

LCI: *Life cycle inventory*

LCIA: *Life cycle inventory analysis*

LCOs: Lipoquito-oligosacáridos

m<sup>2</sup>: Metro cuadrado

mg: Miligramo

MJ: Megajulio

ml: Mililitro

MLSA: *Multilocus sequence analysis*

MPB: *Microbial plant biostimulant* (bioestimulante microbiano de plantas)

MPN: *Most probable number* (número más probable)

MTD: Mejor tecnología disponible

N: Nitrógeno

NFs: *Nod Factors*

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction*

PGPR: *Plant growth promoting rhizobacteria*

RAPD: *Random amplified polymorphic DNA*

RPM: Revoluciones por minuto

SNF: *Symbiotic Nitrogen Fixation* (fijación simbiótica de nitrógeno)

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tg: Teragramo = 10<sup>9</sup> kg = 10<sup>6</sup>t

TRL: *Technology readiness level*

UFC: Unidades formadoras de colonias

YMA: *Yeast mannitol agar*

YMB: *Yeast mannitol broth*



## RESUMEN

El guandul (*Cajanus cajan* L. Millsp.) es una fuente importante de proteína para la alimentación humana en las zonas tropicales y subtropicales. En la región del Caribe, y en la República Dominicana en particular, el guandul es la segunda legumbre en importancia, después de la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.). Sin embargo, a pesar de cultivarse en regadío, el rendimiento del cultivo es insuficiente, lo que puede originar insuficiencia alimentaria en los agricultores de menor renta, y por otra parte genera elevados impactos ambientales por tonelada de grano producida. Entre las causas del escaso rendimiento destaca la tecnología convencional de la fertilización deficitaria. En consonancia con el programa de cooperación para el desarrollo que ha financiado el presente trabajo, el objetivo del mismo fue diseñar y evaluar inoculantes rizobianos para el cultivo de guandul en la República Dominicana, basados en cepas autóctonas, ya que los inoculantes son más accesibles para las economías menos desarrolladas y ambientalmente más favorables que los fertilizantes minerales nitrogenados. El trabajo ha abarcado toda la cadena de valor del desarrollo de los inoculantes: aislamiento de cepas autóctonas, identificación molecular y selección de cepas de élite; optimización de la formulación; evaluación agronómica en campo; análisis ambiental del remplazo de la tecnología basada en la fertilización nitrogenada deficitaria, por la tecnología de la inoculación mediante un Análisis del Ciclo de Vida (ACV). Las cepas autóctonas aisladas pertenecieron al género *Bradyrhizobium*. De las cepas de élite seleccionadas, AMBPC1010 ha sido descrita como una nueva especie *B. cajani* sp. nov. en el presente trabajo; otras dos (ALSPC3050 y ALSPC3051) han sido identificadas como filogenéticamente muy próximas a la cepa tipo de *B. yuanmingense*, y AMBPC1040 pertenece al grupo II de *Bradyrhizobium* según la secuencia del gen 16S rRNA, pero no pudo ser identificada a nivel de especie. En el desarrollo de la formulación se analizaron cuatro soportes o *carriers* estériles (dos tipos de biochar, estiércol de ave y perlita), la perlita y el biochar de corteza de pino tuvieron un comportamiento óptimo y muy similar en campo y durante el *shelf life*, si bien el biochar de corteza de pino alinea con los principios de la economía circular por proceder de un residuo. La experimentación en campo se realizó en 21 parcelas que se agruparon en 3 ensayos diferentes. Las variables independientes analizadas fueron el ambiente, el cultivar, la cepa y la formulación y como covariable se utilizó el nivel de rizobios nativos con capacidad de nodular el guandul. Se llegó a la conclusión de que el único factor que influye significativamente en la efectividad del inoculante fue el nivel de rizobios nativos. En el 75% de las parcelas, la población de rizobios nativos fue menor a  $1 \times 10^3$  UFC g de suelo<sup>-1</sup> y en estos casos el incremento medio de rendimiento obtenido con la inoculación frente al control sin inocular y sin fertilizar con N fue de un 33%. Se ha diseñado a escala piloto el proceso de producción del inoculante, utilizando residuos de industria agroalimentaria para la fabricación del medio de cultivo y perlita como *carrier*, estimando las cargas ambientales de la producción del inoculante en 0,36% de las correspondientes a la fabricación de la dosis deficitaria de N utilizada en la tecnología convencional. Si se remplazara la tecnología convencional por la de inoculación, los impactos ambientales del cultivo se reducirían en un 12% referido a una ha de cultivo y a un 32% referido a una tonelada de grano, ya que la inoculación produce un aumento de rendimiento. Sin embargo, la mejora agronómica y ambiental de la producción de guandul en la República Dominicana requiere además de la tecnología de la inoculación, otras mejoras tecnológicas y una fertilización con P y K acorde a las necesidades del cultivo.

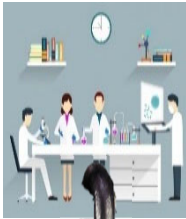


## ABSTRACT

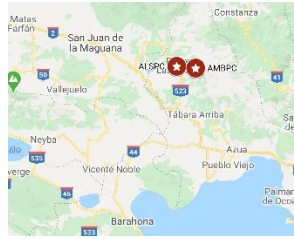
Pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) is an important source of proteins for humans in tropical and subtropical regions worldwide. In the Caribbean region, it is the second pulse after common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), but in spite of this, the crop yield is unsatisfactory although it is usually produced in irrigated lands. As a consequence of the strategic importance of Pigeon pea as a basic food, the low yield per ha can cause food shortage to poor farmers, and it also originates high environmental impacts when the impacts are allocated to one t of produced grains. The common practice followed by farmers is deficit fertilization and this is one of the chief reasons for the scarce yield. In line with the international development cooperation program which supported the present work, the objective was to design and evaluate rhizobial inoculants for Pigeon pea in the Dominican Republic. Inoculants are economically more affordable for less developed economies and they are environmentally more favorable than the mineral nitrogen fertilizers. A key point is that the designed inoculant is based on elite autochthonous strains. The work encompasses the whole value chain of inoculants development: isolation of autochthonous strains, molecular identification and selection of elite strains; optimization of the formulation; agronomic evaluation in field conditions; and environmental assessment of the replacement of the conventional technology (deficit mineral nitrogen fertilization) with the inoculation technology, based on a Life Cycle Analysis (LCA) approach. The isolated strains belonged to the genus *Bradyrhizobium*. Out of the four elite strains, AMBPC1010 has been described as a new species *B. cajani* sp. nov. in this work; other two strains (ALSPC3050 y ALSPC3051) have been identified as phylogenetically related to the type strain of *B. yuanmingense*, and AMBPC1040 belongs to group II of *Bradyrhizobium* according to the sequence of gene 16S rRNA but it was not identified at species level. Four sterile carriers were tested to optimize formulation: two biochar from different raw material, poultry litter and perlite. Pine bark biochar and perlite showed a similar and good performance in the field and during the shelf-life, although pine bark biochar aligns better with the principles of circular economy because it has a residual origin. Field experiments were carried out in 21 plots grouped in three different trials. The independent variables were the environment, the cultivar, the strain and the formulation, and the number of native rhizobia able to nodulate Pigeon pea was considered to be a covariable. The only factor affecting the effectiveness of the inoculant was the concentration of nodulating rhizobia in the soil. Seventy-five per cent of the plots showed a native nodulating population under  $1 \times 10^3$  UFC g of soil<sup>-1</sup> and in such a cases inoculation increased the yield by a 33% in average compared with the unfertilized (nitrogen) and uninoculated control. Another result is the design at pilot scale of the inoculant manufacturing process, using residues from agro-food industry for the bacterial growth media and perlite as carrier. The environmental burdens of the inoculant manufactured in such a way were a 0.36% of those corresponding to the manufacturing process of the nitrogen needed for the fertilization using the conventional technology of deficit fertilization. The replacement of the conventional technology by the inoculation reduces the environmental impacts by 12% allocated to one ha of cultivated Pigeon pea and by 32% allocated to a ton of produced grains, because inoculation increased crop yield. However, in addition to the adoption of the inoculation technology, the improvement of the agronomic and environmental performance of Pigeon pea production in the Dominican Republic needs of other technological improvements and of a P – K fertilization that covers the crop extractions.

## Resumen gráfico

Cadena de valor reemplazo de la tecnología convencional por la inoculación en guandul en la República Dominicana

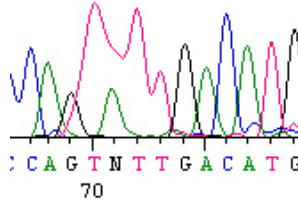


Aislamiento cepas autóctonas



12 cepas (provincia de Azua)

Identificación / selección



*Bradyrhizobium* sp.

- AMBPC1010 *B. cajani* sp. nov.
- ALSPC3050 y ALSPC3051 *B. yuanmingense*
- AMBPC1040 *Bradyrhizobium* sp. (grupo II)

Diseño de formulaciones

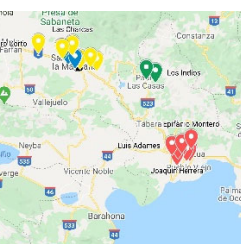


- Carrier: Biochar de corteza de pino (mejor opción) o perlita (alternativa).
- Aditivos: goma garrofín 1% + disacárido 1% (peso:volumen)

Fabricación del inoculante



- Medio de cultivo: 2,3 % melazas de caña de azúcar + 1,2 % de vinazas cerveza (vol.:vol.)
- Carrier: perlita

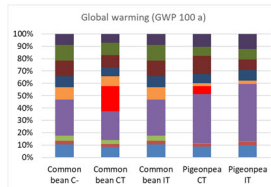


Utilización en campo



Inoculación  $\Rightarrow$  +  $\Delta$  33% rendimiento frente a control sin inocular para rizobios nativos nodulantes  $\leq 1 \times 10^3$  UFC g de suelo<sup>-1</sup>

Rendimiento



Reducción de impactos del reemplazo tecnológico:

- respecto a una ha de cultivo: 12%
- respecto a una t de producto: 32%

ACV

## Palabras clave

Biofertilizante; inoculante; *Bradyrhizobium cajani* sp.nov.; *Bradyrhizobium yuanmingense*; *Cajanus cajan*; Pigeon pea; guandul; efectividad; Fijación Simbiótica de Nitrógeno; biochar; carrier; soporte; ensayo de campo; legumbre; análisis del ciclo de vida; ACV; fertilización mineral; nitrógeno



## 1. Introducción

### 1.1. La situación socioeconómica de la República Dominicana y la integración del presente trabajo como acción de la Cooperación Española

La República Dominicana está incluida en el grupo menos avanzado, el de las economías en desarrollo, de los tres grupos en que las Naciones Unidas clasifica las economías mundiales según nivel de desarrollo (desarrollados, en transición y en desarrollo) (United Nations, 2019). Por esta razón, y por los vínculos culturales que unen a España y la República Dominicana, la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) tiene una larga tradición de ejecución de acciones en ese país. En el V Plan Director de la Cooperación Española para el período 2018 - 2021, República Dominicana continúa considerándose un "País de Asociación de la Cooperación Española" (AECID, 2020).

En este sentido, el presente trabajo se ha desarrollado en el marco de la Cooperación Española, y forma parte de un programa iniciado en 2007, financiado por AECID y cofinanciado por la Universidad de León ULE (España), la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), el Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología MESCYT, y el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales CONIAF (República Dominicana). Dicho programa ha sido ejecutado por el grupo de investigación IQUIMAB de la ULE, en el que se realizó la presente Tesis Doctoral, con la colaboración de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias de la UASD. El objetivo del programa fue generar conocimiento mediante la investigación científica y transferirlo a la población local, para mejorar las condiciones de vida de los agricultores de zonas desfavorecidas, mejorando el margen bruto en los cultivos comerciales, y aumentando la producción en los sistemas de subsistencia. La estrategia elegida para conseguirlo fue actuar sobre la racionalización de la nutrición mineral de los cultivos (Díaz-Alcántara et al. 2014). La nutrición de los cultivos es una tecnología clave para optimizar el rendimiento manteniendo los costes productivos en valores viables, que en las condiciones de la agricultura dominicana puede significar para los agricultores más vulnerables estar a un lado u otro de la delgada línea que separa la suficiencia de la insuficiencia alimentaria.

En los siguientes apartados se analizan las características de la agricultura dominicana.

### 1.2. La agricultura en la República Dominicana y su contribución a la economía del país

El censo agrario más reciente publicado en la República Dominicana data del año 2015 (ONE, 2015). Según los datos del mismo, la contribución de la actividad agraria al PIB disminuyó del 11% al 6% entre 1993 y 2013. La población total económicamente activa en la agricultura es de 433.000 habitantes, que corresponde al 9% de la población total económicamente activa del país.

La superficie potencialmente apta para el cultivo en la República Dominicana se estima en torno a los 2,52 millones de ha, de las cuales en el año 2012 se cultivaban 1,3 millones de ha (ONE, 2015). La distribución de la superficie cultivada según los diferentes cultivos se ha obtenido de FAOSTAT (2020), para dos momentos de la serie histórica, 2008 y 2018 (Tabla 1.1). Los 12 cultivos a los que se destina mayor superficie fueron los mismos en 2008 y en 2018, con algunas

modificaciones en el orden relativo de importancia y en la superficie total. Aparte de estas cifras, merece la pena destacar la superficie destinada al conjunto de cultivos hortícolas (vegetales según la denominación utilizada por los dominicanos), que fue de 36.473 ha en 2008 y ascendió a 38.951 ha en 2018 (FAOSTAT, 2020).

Tabla 1.1. Superficie ocupada por los principales cultivos de República Dominicana en dos momentos de la serie histórica, 2008 y 2018. Datos en hectáreas tomados de FAOSTAT (2020).

Año 2008		Año 2018	
Cultivo	Superficie en ha	Cultivo	Superficie en ha
Arroz	161.288	Arroz	192.604
Cacao	153.219	Cacao	153.219
Café	133.342	Caña de azúcar	112.933
Caña de azúcar	90.940	Café	75.102
Plátanos	37.063	Coco	50.907
Coco	33.706	Plátanos	48.244
Habichuelas ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	30.070	Habichuelas ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	38.315
Guandul ( <i>Cajanus cajan</i> )	22.257	Palma de aceite	31.446
Palma de aceite	21.506	Banano	28.020
Maíz	18.950	Maíz	26.111
Banano	18.409	Guandul ( <i>Cajanus cajan</i> )	22.874
Yuca	14.146	Yuca	21.671
Piña	10.117	Aguacate	13.924

El cultivo al que más superficie se dedica en la República Dominicana es el arroz, alimento básico de la población, seguido del cacao, el café y la caña de azúcar, que corresponden a los tres productos tradicionales de exportación (ONE, 2015). Aunque con menos superficie que los anteriores cultivos, destaca como cultivo para la exportación el banano por su importancia estratégica, fundamentalmente el producido en sistema orgánico (denominado ecológico en España) (Marcano *et al.*, 2016), que ha experimentado un aumento de superficie de casi un 50% entre 2008 y 2018.

Las legumbres son alimentos proteicos básicos en la dieta alimenticia de los dominicanos y corresponden fundamentalmente a la denominada localmente habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) y al denominado localmente guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) (Tabla 1.1).

Aunque la superficie potencialmente regable de la República Dominicana se estima en 710.000 ha, la equipada con riego es poco más de la mitad de ese valor (INDRHI, 2018). Los cultivos que más superficie de regadío ocupan son el arroz (54% del total de la superficie regada), las hortalizas (12%), el plátano (8%) y la caña de azúcar (4%) (ONE, 2015).

### 1.3. Las legumbres en la alimentación humana y la importancia del guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) en la República Dominicana

Las leguminosas de grano son una fuente esencial de proteínas alimentarias para los seres humanos, en especial en los países en vías de desarrollo, donde por la escasez de recursos económicos, se limita el consumo de proteínas animales (Boye *et al.*, 2010). Sin embargo, su

papel en la alimentación humana no se restringe únicamente al suministro de proteínas, ya que las leguminosas además son una fuente importante de energía, fibra alimenticia, minerales y vitaminas (White and Broadley, 2009; Dwivedi *et al.*, 2015) .

A nivel mundial la legumbre de consumo humano que ostenta la mayor superficie cultivada es la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.), con más de 34 millones de ha en 2018 y con una producción superior a los 30 millones de toneladas de granos secos (FAOSTAT, 2020). La habichuela es una fuente de proteína esencial para la población en los centros de origen y diversidad primarios de este cultivo, que son los centros Mesoamericano y Andino (Singh *et al.*, 1991), ubicados en América Central y del Sur respectivamente (Broughton *et al.*, 2003). Pero también es un alimento básico para la supervivencia de la población en otros lugares del mundo, en especial en África (Broughton *et al.*, 2003).

El guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) destaca como la quinta legumbre a nivel mundial en cuanto a superficie cultivada con casi 7 millones de ha (datos de 2018), tan solo por detrás de la habichuela, el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), el caupí o judía carilla (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), y los guisantes (*Pisum sativum* L.) (FAOSTAT, 2020). En cuanto a producción fue la sexta a nivel mundial con casi 6 millones de toneladas de granos secos (FAOSTAT, 2020). El guandul gana relevancia como fuente de proteína para los seres humanos en los países en desarrollo de las regiones tropicales o subtropicales (van der Maesen 2006), en los que escala puestos en el ranking de importancia, siempre por detrás de la habichuela. En las zonas áridas de dichas regiones es un cultivo de especial interés (Varshney *et al.*, 2010), debido en parte a que se trata de una de las legumbres más tolerantes a la sequía (Valenzuela and Smith, 2002), aunque en regadío el rendimiento aumenta de forma importante. Desde el punto de vista del valor nutritivo destaca por su elevado contenido proteico (hasta el 31%). También se caracteriza por su versatilidad de consumo, en forma de semillas secas, de semillas verdes, y en ocasiones también se consume la harina del grano, lo que le ha merecido la denominación de “legumbre multiuso” (van der Maesen 2006).

El guandul tiene su centro de origen en la región norte del subcontinente indio, desde donde se extendió al Este de África, al menos 4.000 años A.C. y posteriormente al Sudeste de Asia, el Oeste de África, Latinoamérica y El Caribe (Khoury *et al.*, 2015). En todas las zonas mencionadas se cultiva en la actualidad para consumo humano (Saxena and Sawargaonkar, 2014; Upadhyaya *et al.*, 2015). Curiosamente, en los países del Caribe ha llegado a alcanzar mayor importancia que en su centro de origen, la India. En la India es el cuarto cultivo en superficie por detrás de habichuelas, garbanzos y guisantes (FAOSTAT, 2020), pero en los países de la región del Caribe, el guandul ocupa sorprendentemente la segunda posición, detrás de la habichuela, con una superficie de 114.513 ha y una producción de 117.173 toneladas en 2018 (FAOSTAT 2020). El 20 % de la superficie y de la producción del guandul caribeño se circunscribe a la República Dominicana, donde también destaca como la segunda legumbre de consumo humano (Tabla 1.1), por detrás de la habichuela, y entre las dos suponen prácticamente el total de la producción de legumbres para alimentación humana en el país.

En la República Dominicana, donde las legumbres son la principal fuente de proteína (Nedumaran *et al.* 2015, Cedano, 2006), el guandul está ligado a su cultura gastronómica, y es integrante del afamado platillo típico “moro de guandul”, base de la alimentación dominicana.

Este plato consiste en una mezcla de arroz como fuente de hidratos de carbono y guandul como fuente de proteínas. En la República Dominicana, el guandul se consume preferentemente en forma de semillas verdes (Cedano, 2006), por lo que se considera un cultivo hortícola (Beekham *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2015), que se somete a recolección escalonada para adaptarla al momento de madurez más adecuado de las semillas.

La mencionada tradición de consumir el producto en forma de semillas verdes, lo convierte en un producto altamente perecedero, y por esta razón la producción en el país es muy similar al consumo interno (Tabla 1.2), existiendo solamente un pequeño déficit de producción, que se cubre con la importación. La balanza comercial de guandul con el exterior es ligeramente negativa, es decir las importaciones de guandul superan a las exportaciones, pero con la particularidad que, debido a la perecibilidad de los granos verdes, más del 90% del guandul importado corresponde a granos secos o en conserva (Tabla 1.2). El comercio exterior de guandul en forma de granos verdes, requiere del uso de tecnología de refrigeración o congelación para evitar su rápido deterioro, o bien su transformación industrial en forma de conservas.

Tabla 1.2. Datos sobre consumo, producción, importación y exportación de guandul en la República Dominicana (República Dominicana, 2020).

Parámetro medido	Año							
	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Consumo (t año <sup>-1</sup> )	sin datos	sin datos	sin datos	20.973	21.443	23.047	24.891	25.505
Producción interna (t año <sup>-1</sup> )	27.998	26.855	24.615	20.948	21.420	22.962	24.616	sin datos
Importación total* (t año <sup>-1</sup> )	395	1.183	324	1.068	1.018	2.029	2.053	958
Importación (seco/conserva (t año <sup>-1</sup> ))	392	1.179	320	1.016	961	1.919	1.750	951
Exportación (t año <sup>-1</sup> )	597	183	64	27	34	25	164	8

\*Incluye el producto fresco (granos verdes), el seco y el producto en conserva

En la República Dominicana, debido a la importancia del cultivo, se han llevado a cabo programas para el desarrollo de germoplasma de guandul adaptado a las condiciones agroclimáticas del país. Fruto del trabajo realizado son dos cultivares de élite denominados “Arroyo Loro” (Oviedo *et al.* 2013) e “IDIAF Primor” (Cedano, 2006). El cultivar “Arroyo Loro” fue obtenido por el Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) mediante el cruzamiento de otros dos cultivares más antiguos, denominados “UASD” e “IDIAF Navideño”, que eran selecciones obtenidas a partir de material considerado autóctono de la República Dominicana, obtenidas por la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) y por el IDIAF respectivamente. Es un cultivar de media estación que alcanza una altura de 160 cm (Oviedo *et al.* 2013). Por su parte “IDIAF Primor” fue desarrollado por IDIAF a partir de germoplasma de origen indio. Se trata de una variedad enana con una altura en torno al metro, y de floración temprana (Cedano, 2006).

## 1.4. Los inoculantes de rizobios<sup>1</sup> para la producción de legumbres y su papel como estrategia sostenible en países en desarrollo

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) proporciona a la biosfera ente 100 y 290 Tg N año<sup>-1</sup> en forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> biodisponible, procedente de la reducción del nitrógeno (N) atmosférico por parte de diversos microorganismos procariontes, de los cuales un promedio de 32 Tg N año<sup>-1</sup> corresponden al N fijado en los agrosistemas cultivados (Galloway *et al.*, 2004).

Existen fundamentalmente dos tipos de FBN en la naturaleza, la fijación en vida libre y la fijación simbiótica de N (FSN); esta última tiene lugar mediante la simbiosis entre un amplio grupo de bacterias denominadas colectivamente rizobios y las leguminosas (Herridge *et al.*, 2008). La FSN es la que más contribuye a la FBN ya que supone dos terceras partes de la fijación total de N atmosférico en la biosfera (Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020). Aunque no se puede ignorar la importancia para la agricultura de la FBN por microorganismos de vida libre que puede cubrir una parte de las necesidades de N de los cultivos (Cassán y Díaz-Zorita, 2016), la FSN que tiene lugar en los cultivos de leguminosas es la más importante en agricultura, porque puede cubrir la totalidad de las necesidades de N del cultivo (Araujo *et al.*, 2015, 2020; Mulas *et al.*, 2015; Ouma *et al.*, 2016), lo que supone un ahorro muy importante en fertilizantes minerales (Saikia Jamini *et al.*, 2017). Sin embargo, no siempre las tasas de FSN en los cultivos de leguminosas son satisfactorias; con frecuencia la FSN que se alcanza mediante la simbiosis espontánea entre el cultivo y los rizobios residentes en el suelo es escasa, y a menudo resulta insuficiente (Chemining'wa and Vessey, 2006). La baja FSN puede deberse a varias razones, como la ausencia total de rizobios infectivos en el suelo, o la baja densidad en que se encuentran; también puede deberse a que los rizobios infectivos pertenezcan a un genotipo que no sea totalmente compatible con el cultivo, lo que origina una baja tasa de FSN. En los casos mencionados, la inoculación con cepas seleccionadas suele mejorar el rendimiento del cultivo, debido en gran medida al aporte de N al cultivo mediante la FSN, aunque existen otros efectos de promoción del crecimiento de las plantas desencadenados por el simbiote (Lupwayi *et al.*, 2006; Checcucci *et al.*, 2017).

Los inoculantes microbianos en agricultura se conocen desde el siglo XIX, mucho antes de que surgiera la revolución verde de mediados del siglo XX. De hecho, el primer inoculante bacteriano se patentó en 1896 (Nobbe y Hiltner, 1896), y estaba compuesto por rizobios para la producción comercial de leguminosas. La fijación de Nitrógeno (N) por parte de las bacterias del género *Rhizobium* y afines en simbiosis nodulares con las raíces de las leguminosas, es la interacción planta-microorganismo más explotada comercialmente, lo que ha dado origen al desarrollo de los inoculantes consistentes en cepas específicas de rizobios para cultivos concretos de leguminosas (Herridge *et al.*, 2008).

---

<sup>1</sup> A lo largo de la presente memoria resumen y en los artículos que componen la Tesis Doctoral, se utiliza el término “rizobios” para referirse a las bacterias oligotróficas pertenecientes al grupo de las alfaproteobacterias o betaproteobacterias que forman nódulos en las raíces de las leguminosas y fijan nitrógeno atmosférico, independientemente del género al que pertenecen (Poole *et al.* 2018). Por tanto, cuando se utiliza el término “rizobios” en general se incluyen las especies del género *Bradyrhizobium* aislados en este trabajo, el género *Rhizobium*, y otros géneros que cumplan la condición indicada. (Poole, P., Ramachandran, V., Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. Nature Reviews Microbiology, 16: 291–303).



Durante el siglo XX se fueron incorporando otros tipos de inoculantes microbianos para agricultura, entre los que destacan los basados en hongos micorrízicos (Sutton, 1973) y más recientemente otros tipos de bacterias asociadas a la rizosfera o a la endosfera de las raíces de las plantas que mediante diferentes modos de acción promueven el crecimiento de las mismas, y que reciben el nombre de PGPR, el acrónimo de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Kloepper, 1980). Los modos de acción de los PGPR son diversos: Fijación de N atmosférico en vida libre, solubilización de formas insolubles de nutrientes como el Fe o el P, superación de situaciones de estrés abiótico, mejora en la eficiencia aparente en el uso de los nutrientes como consecuencia de efectos hormonales, y el biocontrol (Backer *et al.*, 2018).

La sustitución de los fertilizantes nitrogenados por inoculantes está considerada como una alternativa muy adecuada para la producción de leguminosas en los países en desarrollo, por el menor coste de los inoculantes (Singh *et al.*, 2016), lo que les convierte en productos más accesibles por parte de los agricultores, que son un sector vulnerable en las economías en desarrollo (Vanlauwe *et al.*, 2019). Sin embargo, para alcanzar una integración efectiva de los inoculantes en las explotaciones agrarias de países en desarrollo, es necesario abarcar toda la cadena de valor de los mismos, empezando por la producción a escala local, y prestando especial atención a la cadena de suministro, para que lleguen al agricultor en las mejores condiciones de calidad, pues se trata de “productos vivos”. Además, para que la FSN sea efectiva, es de la máxima importancia que el resto de prácticas agronómicas sean correctas, (Vanlauwe *et al.*, 2019). Por estas razones, en la presente Tesis Doctoral se aborda la cadena de valor completa de los inoculantes para leguminosas.

Los inoculantes microbianos se denominan en ocasiones biofertilizantes. Sin embargo, este término presenta varias homonimias lo que desaconseja su utilización, hasta tal punto que ni la legislación europea ni la española utilizan este término, aunque algunas publicaciones científicas actuales continúan utilizándolo (p. ej. Schütz *et al.*, 2018). Una parte de la comunidad científica utiliza el término biofertilizante para cualquier tipo de abono orgánico o materia orgánica susceptible de ser aplicada a suelos agrícolas, incluso digestatos anaerobios (Diacono *et al.*, 2019; Tsachidou *et al.*, 2019), mientras que otra parte entiende que el término biofertilizante debe reservarse exclusivamente para los “microorganismos que mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas contribuyendo a la nutrición vegetal, bien facilitando la absorción de nutrientes o bien incrementando la disponibilidad primaria de nutrientes en la rizosfera” (Pereg and McMillan, 2015). Esta situación genera confusión, ya que no es lo mismo un abono orgánico con una población microbiana natural incontrolada, que un inoculante basado en cepas cuidadosamente seleccionadas por su potencial para desencadenar en el cultivo un efecto concreto (Barquero *et al.*, 2019). Para evitar este tipo de problemas de nomenclatura, la normativa más avanzada para este tipo de productos que es la europea, utiliza el término “Bioestimulante de plantas microbiano” o *Microbial Plant Biostimulant* (MPB).

## 1.5. La “reinención” de los inoculantes para agricultura y estrategias para alcanzar la efectividad<sup>2</sup> en campo

A pesar de las ventajas reconocidas, los inoculantes microbianos han tenido una lenta y titubeante incorporación a la agricultura a nivel mundial. Irrumpieron en el mercado en la década 1980-1990, pero prácticamente llegaron a desaparecer poco después (Bashan *et al.*, 2014), debido a su errática eficiencia en el campo, originada por la falta de calidad de los productos comercializados como consecuencia de la falta de regulación, lo que a su vez ocasionó desconfianza por parte de los agricultores (Stamenković *et al.*, 2018). Para superar este estigma que ha acompañado a los inoculantes durante décadas y del que aún no han podido liberarse, los inoculantes microbianos necesitan reinventarse, tarea que ya está en marcha.

La reinención de los inoculantes se enmarca dentro de la denominada segunda revolución verde, cuyo objetivo es mantener y mejorar los rendimientos de los cultivos, manteniendo el uso de recursos no renovables, insumos químicos y agua en niveles lo más reducido posible (Besset-Manzoni *et al.*, 2018). Esta nueva revolución verde, denominada también “*Fresh Green Revolution*” o “*Bio-Revolution*” (Backer *et al.*, 2018), se fundamenta en la explotación racional del fitomicrobioma (Timmusk *et al.*, 2017). El fitomicrobioma, o microbiota asociada las plantas, es el conjunto de microorganismos asociados a las mismas; el conjunto formado por la planta y su fitomicrobioma se denomina en la actualidad holobionte (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2016).

La implementación de la segunda revolución verde está basada en: (1) La utilización de insumos biológicos consistentes en inoculantes compuestos por microorganismos del fitomicrobioma o por metabolitos de origen microbiano; (2) prácticas consistentes en la manipulación de la estructura de la comunidad microbiana que constituye el fitomicrobioma. Los inoculantes microbianos se circunscriben en la primera de las acciones.

Ante esta nueva era, la reinención de los inoculantes para agricultura debe adaptar este tipo de productos, de manera que puedan responder con éxito a los siguientes retos y desafíos (Barquero *et al.*, 2019):

- Evitar las inconsistencias que con frecuencia se producen en campo.
- Formar y entrenar a los agricultores en el uso de esta tecnología.
- Desarrollar inoculantes “a la carta”, teniendo en cuenta el cultivo y las interacciones microorganismo-planta-ambiente, en especial el suelo, que de manera natural alberga una población microbiana diversa, a la que tiene que adaptarse el microorganismo o los microorganismos, contenidos en el inoculante.
- La optimización industrial del proceso de fabricación de los inoculantes, que debe mantener los costos productivos en los valores más bajos posible, para garantizar la rentabilidad comercial de los inoculantes.
- El desarrollo de técnicas moleculares que permitan la identificación precisa de la cepa o cepas contenidas en el inoculante, y su seguimiento durante las diferentes fases del cultivo, permitiendo conocer también si perdura en el suelo al finalizar el ciclo del cultivo.

---

<sup>2</sup> Se utiliza intencionadamente el vocablo “efectividad” (R.A.E. Capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera) porque es más correcto que el término eficiencia.

- La realización de ensayos de validación en campo a gran escala, en un número suficiente de ambientes, de manera que solamente lleguen al mercado productos suficientemente probados.

Para responder con éxito a los desafíos planteados, existen varias estrategias. Dos de ellas constituyen la base de este trabajo de Tesis Doctoral, y por tanto se analizan en los siguientes apartados. Las estrategias son las siguientes: i) la utilización de cepas autóctonas, que contribuye a la mejor adaptación de los inoculantes al ambiente, y por tanto a la mejora de su comportamiento en campo y ii) la formulación adecuada del inoculante, factor esencial para proteger al microorganismo de manera que pueda interactuar con la planta en las mejores condiciones, lo que permitirá optimizar su comportamiento en campo.

#### 1.5.1. La estrategia de utilización de cepas autóctonas

La fuente inagotable de genotipos microbianos para la elaboración de inoculantes destinados a la agricultura es la rizosfera o endosfera radicular de las plantas, sin olvidar la filosfera (Desbrosses and Stougaard, 2011). En estos sistemas se encuentran los microorganismos que de manera natural se asocian a las plantas. La composición del fitomicrobioma está regulado por factores abióticos y bióticos del suelo (Saad *et al.*, 2020). Sin embargo, se atribuye a las plantas la capacidad de “reclutar” el microbioma que le resulta más adecuado en unas condiciones ambientales determinadas (Saad *et al.*, 2020). El genotipo de la planta es el que determina su capacidad de selección del microbioma asociado (Müller *et al.*, 2016), puesto que le otorga la capacidad de secretar diferentes compuestos que pueden estimular el crecimiento de ciertos microorganismos y reprimir el de otros (Berendsen *et al.*, 2012).

Sessitsch *et al.* (2002) propusieron una estrategia de selección de cepas bacterianas procedentes del holobionte, para ser utilizadas como inoculantes de los cultivos. Dicha estrategia consta de dos fases, con el objeto de optimizar de forma secuencial la triple interacción siguiente: [Genotipo de la planta (Gp) x Genotipo de la bacteria (Gb)] x Ambiente (E). En la primera de las dos fases se optimiza la interacción Gp x Gb (=G<sup>2</sup>) y consiste, en el caso de la interacción rizobios-leguminosas, en seleccionar la combinación cultivar – cepa de rizobio más efectiva en la fijación de N. Para ello se elimina la influencia ambiental (E), lo que se consigue trabajando en un ambiente no limitante, consistente en un medio nutritivo completo, pero con ausencia de N, en condiciones hidropónicas, con temperatura e iluminación óptimas proporcionadas por una cámara de cultivo con ambiente controlado, y en condiciones axénicas, es decir en un medio en el que el único microorganismo presente sea la cepa de la cual se quiere conocer su efectividad en la fijación de N. La segunda fase consiste en la optimización G<sup>2</sup> x E, que se realiza en campo. Suponiendo que el cultivar utilizado esté bien adaptados a los agrosistemas en que se cultiva, los ensayos de campo permiten rechazar las cepas bacterianas que no se adapten a dichos agrosistemas, por lo que en realidad lo que se optimiza en esta segunda fase es la interacción Gb x E. En algunas ocasiones la optimización G<sup>2</sup> x E se realiza en condiciones de microcosmos, pero debido a que las condiciones ambientales impuestas por el cultivo en macetas (alteración de la estructura del suelo, régimen térmico en la maceta) son muy diferentes de las de campo es preferible evitar la fase de microcosmos, porque los resultados obtenidos frecuentemente no son extrapolables a campo. Por tanto se recomienda pasar directamente a los ensayos de campo, primero a pequeña escala, y luego a mayor escala (Mulas *et al.*, 2013).

A lo largo de la primera década del siglo XXI se han ido acumulando evidencias de que los inoculantes basados en cepas alóctonas de élite fracasan en campo cuando se utilizan en agrosistemas con características ambientales muy diferentes a los agrosistemas en los que fueron aisladas (Daza *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). Además, cada vez son más numerosos los trabajos que indican que para alcanzar el éxito en la optimización de la interacción Gb x E, el punto clave es la utilización de cepas bacterianas autóctonas (Mulas *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2016; Koskey *et al.*, 2017; Pastor-Bueis *et al.*, 2019).

Simultáneamente se ha investigado cómo explicar el fracaso en campo de los inoculantes basados en cepas alóctonas. Se ha demostrado que las cepas alóctonas no son capaces, en general, de competir con éxito con las cepas nativas residentes en el suelo, las cuales son frecuentemente poco eficientes en la fijación de N, ya que constituyen una población natural heterogénea que no ha sido sometida a selección por su capacidad de fijar N con el cultivo. Dicha desventaja competitiva de las cepas alóctonas se ha atribuido a su posible falta de adaptación al medio (Martínez *et al.*, 2016). El fracaso de los inoculantes basados en cepas alóctonas resulta exacerbado en los cultivos denominados “promiscuos” que nodulan con un rango amplio de simbiontes, lo que conduce a la formación de nódulos con multitud de genotipos diferentes, de los cuales una proporción muy elevada suelen ser infectivos, pero inefectivos en la fijación de N (Andrews and Andrews, 2017), ya que la capacidad de colonización y la de fijación de N no están acopladas (Checcucci *et al.*, 2017), y las cepas altamente competitivas para la ocupación de los nódulos, no son necesariamente buenas fijadoras (Westhoek *et al.*, 2017).

Para explicar los buenos resultados en campo de los inoculantes basados en cepas autóctonas seleccionadas mediante el método secuencial propuesto por Sessitsch *et al.* (2002), se ha propuesto que dichas cepas tengan una elevada capacidad de infección y ocupación del nódulo, debido a su buena adaptación a las condiciones agro-climáticas locales (Meghvansi *et al.*, 2010), pero también a una interacción favorable frente a las poblaciones microbianas residentes en el suelo (Tena *et al.*, 2016), lo que les hace altamente competitivas. En estudios genómicos de cepas autóctonas exitosas en campo (Pastor-Bueis *et al.*, 2019), se han hallado genes involucrados en los fenómenos de competencia con el microbioma edáfico, como son los sistemas de secreción y otros genes relacionados con los mecanismos de explotación de los recursos limitados del suelo (denominado método de competencia indirecto) o con fenómenos de interferencia con otros microorganismos, que se denomina método de competencia directa.

En el presente trabajo se utilizan exclusivamente bacterias autóctonas, y no puede utilizarse un control basado en cepas recomendadas para guandul a nivel de El Caribe, porque tal recomendación no existe.

### 1.5.2. Optimización de la formulación del inoculante

Una adecuada formulación es clave para que las cepas promisorias puedan ser explotadas comercialmente. Sin embargo, existe escasa información científica sobre el desarrollo de formulaciones, puesto que la mayoría de las formulaciones de éxito son desarrolladas por el sector empresarial y se mantienen como secreto industrial (Bashan *et al.*, 2014). La explotación comercial de un inoculante supone el salto desde el laboratorio, donde prevalecen condiciones controladas, al campo bajo condiciones completamente incontrolables y por esta circunstancia,

la formulación juega un papel tan importante, sobre la que bascula el éxito o el fracaso del inoculante (Barquero *et al.*, 2019).

Existen dos etapas de la cadena de valor de los inoculantes en las que es primordial mantener la viabilidad de los microorganismos, en las que la formulación del producto juega un papel fundamental. La primera etapa corresponde al almacenamiento (*shelf-life*) y el proceso de distribución, y la segunda al proceso de aplicación en el campo, hasta que las bacterias ejercen su acción sobre el cultivo (Barquero *et al.*, 2019). El descenso de las poblaciones bacterianas tras la inoculación es un fenómeno inevitable, aunque si el descenso es excesivo o demasiado rápido, el número de células viables que alcanzan la rizosfera podría no ser suficientemente elevado como para colonizar con éxito la raíz. Si esto llegara a suceder, no se desencadenaría la respuesta esperada en la planta (Herrmann and Lesueur, 2013). El descenso sufrido por la población bacteriana del inoculante tras su aplicación a campo se debe a la ocurrencia de condiciones edafológicas físico-químicas y bióticas hostiles para el microorganismo, como baja saturación hídrica, temperaturas extremas, salinidad, pH extremo, competencia con la microbiota nativa del suelo, etc. (Bashan *et al.*, 2014). En esta situación, una adecuada formulación debe de ser capaz de proporcionar al microorganismo un micro-ambiente seguro que le proteja durante un período de tiempo lo suficientemente largo para garantizar el establecimiento de la simbiosis microorganismo-planta (Timmusk *et al.*, 2017). Por tanto, los ensayos de campo de inoculantes que se ejecutan sin una adecuada formulación del producto, no presentan ningún interés para la toma de decisiones sobre la introducción de la tecnología de la inoculación en agricultura (Barquero *et al.*, 2019).

Las formulaciones pueden ser sólidas o líquidas, si bien las sólidas proporcionan una protección física a los microorganismos, y algunos soportes como la turba pueden además proporcionar nutrientes a los microorganismos, por lo que constituyen la formulación más habitual (Chaudhary *et al.*, 2020). Sin embargo, en la actualidad gran parte de la investigación empresarial sobre formulaciones se centra en el desarrollo de lo que se denominan “semillas pre-inoculadas”, por la comodidad que entraña para el agricultor. No obstante, cuando se trata de bacterias, la supervivencia de las mismas en la superficie de la semilla es de aproximadamente tres semanas, en el mejor de los casos, mucho menor que la supervivencia en el inoculante destinado a ser mezclado con la semilla *in situ* en el momento de la siembra (Atieno *et al.*, 2018), que suele ser de al menos un año con una pérdida de viabilidad aproximada de un orden de magnitud por año, si se mantienen en todo momento las condiciones de refrigeración a una temperatura de 4-6 °C (Araujo *et al.*, 2020a). En condiciones tropicales, como es el caso de la República Dominicana, el tiempo de supervivencia de las bacterias en las semillas pre-inoculadas puede ser aún menor, por las temperaturas medias registradas en la zona y la dificultad de mantener la cadena de frío (Araujo *et al.*, 2020a). Por tanto, en los agrosistemas caribeños es preferible la inoculación *in situ* en el momento de la siembra, lo que implica que el inoculante debe comercializarse separado de la semilla. En estas condiciones, la cadena de frío solamente tiene que mantenerse para el inoculante, que tan solo constituye un 2% (peso:peso) de la cantidad de semilla necesaria para la siembra.

En la formulación de los inoculantes, otro factor que está recibiendo mucha atención es la adición de metabolitos, compuestos que proporcionan biorreguladores, nutrientes esenciales y protección contra los patógenos (Chaudhary *et al.*, 2020). Entre los metabolitos de interés para

las formulaciones a base de rizobios merecen especial atención los exopolisacáridos (EPS) liberados por los propios rizobios, que desempeñan un papel crucial en la protección microbiana contra el shock osmótico, pH extremo, radiaciones, desecación, incluso depredación por parte de otros microorganismos y defensa contra sustancias tóxicas. Se ha comprobado que la presencia de los EPS mejora la colonización de las raíces por parte de los rizobios, la formación de biopelículas (conocidas como *biofilms*) y la nodulación en presencia de diferentes tipos de estreses (Wang *et al.*, 2019).

Otros metabolitos que mejoran el comportamiento en campo según las investigaciones realizadas son los flavonoides, que incrementan la nodulación y la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés. Además, determinados lipoquitos-oligosacáridos (LCOs) entre los que merecen especial atención los factores de nodulación (*Nod Factors* NFs), mejoran la simbiosis cuando se incorporan a los inoculantes (Chaudhary *et al.*, 2020).

### 1.6. Biogeografía de los simbioses de guandul y efectividad de la nodulación natural

El estudio de la interacción entre un cultivo leguminoso y sus simbioses naturales en un agrosistema permite estimar si la simbiosis con los rizobios residentes puede proporcionar unos niveles de fijación de N que garanticen un rendimiento adecuado. Pero además, como lo más frecuente es que sea necesaria la inoculación para alcanzar rendimientos satisfactorios sin recurrir al abonado mineral con N (Checcucci *et al.*, 2017; Vanlauwe *et al.*, 2019), los rizobios que nodulan al cultivo en el agrosistema son la mejor fuente de cepas de élite para la elaboración de inoculantes (Koskey *et al.*, 2017b; Pastor-Bueis *et al.*, 2019). Estas razones justifican la necesidad de realizar estudios biogeográficos sobre los simbioses del cultivo tal como se ha hecho en este trabajo para los agrosistemas con guandul de la República Dominicana.

A pesar de la importancia económica del guandul, el hecho de que esté ligado a economías en desarrollo hace que la investigación científica sea inferior a la que se realiza en otros cultivos como por ejemplo la habichuela. Sin embargo, la comunidad científica ya ha abordado la secuenciación del genoma del cultivo (Mahato *et al.*, 2018), base de los programas de mejora vegetal, y también se está avanzando en el conocimiento de los simbioses. El presente trabajo contribuye de manera destacada a esta última tarea.

Las cepas de rizobios que nodulan de manera espontánea al guandul a nivel mundial pertenecen tanto al grupo de los denominados “*slow-growing*” como al grupo de los “*fast growing*”, predominando unos u otros según la región del planeta. En los centros de diversidad primario y secundario, ubicados en el norte de la India y en el este de África, los aislados procedentes del interior de los nódulos pertenecen predominantemente al grupo de los *fast-growing* (Degefu *et al.*, 2013; Varshney *et al.*, 2010; Wolde-Meskel *et al.*, 2005; Singh *et al.* 2018). Sin embargo, en otros centros de distribución del cultivo aparecen también rizobios efectivos que pertenecen al grupo de los *slow-growing*: en la zona occidental de África, concretamente en Costa de Marfil, se aislaron bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (Fossou *et al.*, 2016, 2020). También en Sudamérica, concretamente en Brasil, la mayoría de los aislados pertenecieron al grupo *slow-growing* y solamente unos pocos al *fast-growing* (Ramsubhag *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2014). En la región de El Caribe existe un antecedente al presente

trabajo; concretamente en Trinidad y Tobago, Ramsubhag et al. (2002) aislaron principalmente, aunque no de forma exclusiva, rizobios pertenecientes al grupo *slow-growing*.

El guandul tiene un potencial muy elevado de FSN. España et al. (2006) demostraron mediante la técnica del  $N^{15}$  que el N derivado de la fijación atmosférica puede llegar a alcanzar el 70%. Sin embargo existen trabajos que indican que la nodulación natural del guandul es escasa y errática, y por tanto la FSN es insuficiente para asegurar un rendimiento adecuado sin la aportación de fertilizantes minerales, incluso en los centros de origen y diversidad primario y secundario del cultivo (Khurana y Dudeja, 1981; Sanginga et al., 1996). Por esta razón es necesario mejorar la capacidad de FSN del cultivo (Mula y Saxena, 2010; Varshney et al., 2012). De las dos estrategias posibles para la mejora de la efectividad de la FSN, que son realizar mejora genética en la planta para mejorar su capacidad de fijación de nitrógeno, o la selección y en su caso mejora del simbiote, en el presente trabajo se ha optado por la segunda.

### 1.7. La dimensión ambiental en la utilización de los inoculantes en agricultura

La práctica totalidad de los trabajos científicos sobre los inoculantes para agricultura, tanto si abordan aspectos de ciencia básica como aplicada, hacen mención expresa de las ventajas ambientales de la sustitución de los compuestos químicos de síntesis por los inoculantes microbianos (Aeron et al., 2020; Dellagi et al., 2020; Saad et al., 2020). Además, por lo general, en dichos trabajos se exacerban los efectos negativos de los fertilizantes minerales y de los fitosanitarios convencionales, lo que convierte a la invocación ambiental en una especie de mantra que guía a los investigadores, los cuales presentan esta sustitución como una catarsis necesaria para “reconciliar” la actividad agraria con la protección del medio ambiente.

Sin embargo, sorprendentemente, no existen trabajos que analicen y cuantifiquen, desde una aproximación científica holística, el impacto agronómico-ambiental de la integración de los inoculantes en los agrosistemas (Araujo et al., 2020b). En lo que se refiere al enfoque medioambiental, el análisis del ciclo de vida (ACV) (*life cycle analysis*, LCA) es la herramienta más completa para la evaluación del impacto ambiental de la producción agrícola (Goglio et al., 2015). Sin embargo, hasta la publicación del trabajo de Araujo et al. (2020b) que forma parte de los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral, no existía ningún documento científico de acceso público, libre o de pago, que analizara la sustitución de la tecnología convencional por la tecnología de los inoculantes en agricultura mediante un ACV.

El ACV ha sido utilizado con éxito para analizar el efecto de la actividad agraria sobre el medio ambiente (p. ej. Adewale et al., 2016). Además, el ACV presenta una característica fundamental, que lo convierte en una herramienta muy útil para evaluar el efecto ambiental de las sustituciones tecnológicas en agricultura, puesto que permite analizar las diferencias entre los efectos ambientales de diferentes sistemas de producción (Dekamin et al., 2018). De esta forma se ha utilizado para comparar diferentes sistemas productivos como el convencional, el integrado (Do Carmo et al., 2016), y el orgánico (denominado “ecológico” en España) (Abeliotis et al., 2013). Incluso estos últimos autores encontraron que el ACV fue útil también para comparar el impacto ambiental del cultivo de *Phaseolus vulgaris* L. utilizando diferentes cultivares.

---

Dada la demostrada utilidad de la metodología indicada, parece todavía más sorprendente que hasta la fecha no hayan existido trabajos que utilicen el ACV para cuantificar y justificar las aseveraciones sobre el papel de los inoculantes en la mejora ambiental de los cultivos. De esta manera se demuestra la necesidad del presente trabajo.





## 2. Objetivos

El **objetivo general** del trabajo fue diseñar y evaluar inoculantes rizobianos para el cultivo de guandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) en la República Dominicana, basados en cepas autóctonas, incluyendo el desarrollo y optimización de la formulación del producto, validando su efecto agronómico mediante una amplia red de ensayos de campo, y analizando la repercusión medioambiental de la introducción de la tecnología de la inoculación en el cultivo. El resultado final esperado es el desarrollo, hasta fase piloto, de un producto comercial.

Existe una elevada producción científica de estudios teóricos sobre el aislamiento de cepas bacterianas con potencial efecto beneficioso en el desarrollo de los cultivos, y otros aspectos teóricos de la interacción planta-microorganismo-ambientes. Teniendo en cuenta que los mencionados trabajos tienen por lo general una escasa repercusión en la generación de conocimiento directamente aplicable al sector productivo y teniendo en cuenta que el presente trabajo ha sido financiado mediante proyectos de Cooperación al Desarrollo, el enfoque general del mismo es la generación de conocimiento transferible de manera directa a la sociedad, para contribuir a la mejora del índice de desarrollo humano, y en consecuencia se han establecido los siguientes **objetivos específicos** para cumplir con los mencionados requisitos:

1. Aislar, a partir de nódulos radiculares de cultivos de guandul en República Dominicana, cepas bacterianas autóctonas del grupo de los rizobios, con potencial interés para la producción de inoculantes.
2. Pre-seleccionar entre las cepas aisladas, las más efectivas en fijación de N en condiciones hidropónicas y axénicas, lo que conduce a la optimización de la interacción genotipo de la bacteria – genotipo del guandul y a la creación de una colección de cepas de élite.
3. Identificar taxonómicamente las bacterias de élite seleccionadas en condiciones hidropónicas y axénicas.
4. Diseñar una formulación sólida para recubrir la semilla en campo en el momento de la siembra, por ser la estrategia que mejor se adapta al nivel tecnológico del cultivo del guandul en la República Dominicana.
5. Analizar el efecto agronómico de los inoculantes desarrollados mediante 21 ensayos de campo en agrosistemas situados en las zonas con mayor producción de guandul en la República Dominicana, seleccionando diversos factores como la cepa y la formulación, y utilizando como covariable el nivel de rizobios nativos en el suelo, para la evaluación de la efectividad de los inoculantes.
6. Desarrollar hasta un TRL 5 (*Technology Readiness Level*), el proceso de producción del inoculante para cultivos de guandul en la República Dominicana.
7. Analizar el impacto ambiental de la sustitución de la tecnología convencional para la producción de guandul en la República Dominicana, por la inoculación con bacterias específicas fijadoras de nitrógeno, comparando el impacto con el de otro cultivo leguminoso, *Phaseolus vulgaris* L., que tiene un nivel tecnológico más elevado y que a diferencia del guandul se considera “cash crop”.

### 3. Identificación de los artículos integrantes de la tesis “por compendio de publicaciones” y contribución a los objetivos

#### 3.1. Identificación de los artículos e indicios de calidad

##### 3.1.1. Artículo 1. Araujo et al. 2015

**Araujo, J.;** Díaz-Alcántara, C.A.; Velázquez, E; Urbano, B.; González-Andrés, F. 2015. *Bradyrhizobium yuanningense* related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization. *Scientia Horticulturae* 192: 421 - 428. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.06.009.

##### Indicios de calidad

La revista está indexada en Journal Citation Reports.

Índice de impacto (año 2015): 2,439

Categoría: “*Horticulture*”

Ranking en la categoría (año 2015): Cuartil 1 (8/34).

##### 3.1.2. Artículo 2. Araujo et al. 2017

**Araujo, J.;** Flores-Félix, J.D.; Igual, J.M.; Peix, A.; González-Andrés, F.; Díaz-Alcántara, C.A.; Velázquez, E. 2017. *Bradyrhizobium cajani* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2236 - 2241. DOI: 10.1099/ijsem.0.001932.

##### Indicios de calidad

La revista está indexada en Journal Citation Reports.

Índice de impacto (año 2017): 1,932

Categoría: “*Microbiology*”

Ranking en la categoría (año 2017): Cuartil 3 (87 de 126).

##### 3.1.3. Artículo 3. Araujo et al. 2020a

**Araujo, J.;** Díaz-Alcántara, C.A.; Urbano, B.; González-Andrés, F. 2020a. Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *European Journal of Agronomy*, 113 Article 125985. DOI: 10.1016/j.eja.2019.125985.

##### Indicios de calidad

La revista está indexada en Journal Citation Reports.

Índice de impacto (año 2019 año más próximo al de publicación del artículo): 3,726

Categoría: “Agronomy”

Ranking en la categoría (año 2019, el más próximo al de la publicación): Cuartil 1 (12/91).

### 3.1.4. Artículo 4. Araujo et al. 2020b

**Araujo, J.;** Urbano, B.; González-Andrés, F. 2020b. Comparative environmental life cycle and agronomic performance assessments of nitrogen fixing rhizobia and mineral nitrogen fertiliser applications for pulses in the Caribbean region. *Journal of Cleaner Production*, 267 Article 122065. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.122065

#### Indicios de calidad

La revista está indexada en Journal Citation Reports.

Índice de impacto (año 2019 año más próximo al de publicación del artículo): 7,246

Categoría: “Environmental Sciences”

Ranking en la categoría (año 2019, el más próximo al de la publicación): Decil 1 (19/265).

## 3.2. Contribución de los artículos a los objetivos específicos

En la Tabla 3.1 se presenta un resumen los objetivos específicos planteados en el apartado 2 y la contribución a cada uno de ellos de los diferentes artículos que componen la Tesis Doctoral por la modalidad “compendio de publicaciones”.

**Tabla 3.1. Correspondencia entre los objetivos específicos de la Tesis Doctoral por la modalidad “compendio de publicaciones” y los artículos que la constituyen.**

Objetivo específico (según apartado 2.)	Artículo en el que se aborda
O.E. 1. Aislar ...	Artículo 1. (Araujo et al. 2015)
	Artículo 2. (Araujo et al. 2017)
	Artículo 3. (Araujo et al. 2020a)
O.E. 2. Pre-seleccionar ...	Artículo 2. (Araujo et al. 2015)
	No publicado
O.E. 3. Identificar taxonómicamente ...	Artículo 1. (Araujo et al. 2015)
	Artículo 2. (Araujo et al. 2017)
	Artículo 3. (Araujo et al. 2020a)
O.E. 4. Diseñar una formulación ...	Artículo 3. (Araujo et al. 2020a)
O.E. 5. Analizar el efecto agronómico ...	Artículo 1. (Araujo et al. 2015)
	Artículo 3. (Araujo et al. 2020a)
	Artículo 4. (Araujo et al. 2020b)
O.E. 6. Desarrollar hasta un TRL 5 ...	Artículo 4. (Araujo et al. 2020b)
O.E. 7. Analizar el impacto ambiental ...	Artículo 4. (Araujo et al. 2020b)





Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)


## Bradyrhizobium yuanmingense related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization



Juan Araujo<sup>a</sup>, César-Antonio Díaz-Alcántara<sup>a</sup>, Encarna Velázquez<sup>b</sup>, Beatriz Urbano<sup>c</sup>, Fernando González-Andrés<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo, Dominican Republic

<sup>b</sup> Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Edificio Departamental de Biología, Lab 209, Av. Doctores de la Reina S/N, 37007 Salamanca, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Universidad de Valladolid, Campus de Palencia, Av. De Madrid, 57, 34004 Palencia, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, Universidad de León, Campus ESTIA, Av. de Portugal, 41, 24071 León, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 February 2015

Received in revised form 27 May 2015

Accepted 4 June 2015

Available online 6 July 2015

#### Keywords:

Biofertiliser

*Bradyrhizobium yuanmingense*

*Cajanus cajan*

Effectiveness

Biological nitrogen Fixation

### ABSTRACT

*Cajanus cajan* L. is a legume whose green seeds are consumed in Caribbean countries such as Dominican Republic where is a horticultural plant highly appreciated by the consumers. In this work we isolated several slow-growing rhizobial strains nodulating *C. cajan* that were found to be closely related to *Bradyrhizobium yuanmingense* according to the analysis of 16S rRNA gene sequences. These strains were genetically diverse on the basis of their RAPD patterns and showed high variability in nodulation ability and N-fixation on hydroponic conditions. Highly effective strains used as biofertilizers in four different soils from Dominican Republic showed that biofertilization of *C. cajan* with these strains produced the same or even higher yield than the mineral nitrogen fertilization. Therefore, biofertilization with native *Bradyrhizobium* strains can be adopted instead of chemical fertilization to improve both the yield and the quality of *C. cajan*. This is the first report about the nodulation of this legume by strains close to *B. yuanmingense* in Dominican Republic where the natural nodulation of *C. cajan* is scarce and then, the biofertilization can be crucial to increase the yield of this horticultural crop very important for human feeding.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cajanus cajan* L. Millsp. (pigeonpea, guandul or guandú in Latin America) is an important high-protein pulse legume in the semi-arid regions of the world (Varshney et al., 2010), owing a part of its importance to the fact that it is one of the most drought-tolerant legumes (Valenzuela and Smith, 2002). It is an integral crop component of subsistence agriculture in India and part of Africa and South America (Saxena and Sawargaonkar, 2014). However, in the Caribbean countries, it is a popular vegetable crop, grown for its green peas obtained from the pods harvested at the green immature stage (Gooding 1962; Spence and Williams 1972; Singh, 1994 Beekham and Umaharan 2010). This is the case in Dominican Republic, where it is a horticultural crop known as guandul

(Cedano, 2006) with a total production almost identical to the total production of dry common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Dominican Republic, 2012).

*C. cajan* provides additional benefits to the farmers due to the releasing of soil-bound phosphorus, the improving soil structure and particularly the Biological nitrogen fixation (BNF) in symbiosis with rhizobia (Saxena, 2008). BNF symbiosis is established with fast growing rhizobia in India (Dubey et al., 2010) and Africa (Degefu et al., 2013) that are, respectively, the primary and secondary distribution centers of *C. cajan* (Van der Maesen, 2006). Probably this legume arrived from Africa to American countries (Odeny, 2007) being nodulated by fast and slow growing rhizobia in this continent (Ramsubhag et al., 2002; Fernandes et al., 2003; Moulin et al., 2004; Menna et al., 2006; Costa et al., 2014). Nevertheless, the symbiosis *C. cajan*-rhizobia has been poorly studied up to date and there are few data about the symbiotic effectiveness, particularly of *Bradyrhizobium* strains, on this legume.

\* Corresponding author.

E-mail address: [fernando.gonzalez@unileon.es](mailto:fernando.gonzalez@unileon.es) (F. González-Andrés).

**Table 1**  
Soils used for this work. The first two provided the isolated strains, and the last four were used for *in situ* field experiment.

	Soils from where strains were isolated "La Siembra" at Padre las Casas (Azua)		Soils for field experiments			
	Soil 1	Soil 2	Arroyo Loro (San Juan Maguana)	Engombe (Santo Domingo Oeste)	Los Indios (Azua)	Padre las Casas (Azua)
Coordinates	18°43'51"N;70°56'43"W		18°48'58"N 71°16'39"W	18°27'18"N 70°00'15"W	18°43'31"N 70°53'33"W	18°44'20"N 70°56'21"W
Altitude above sea level (m)	495		493	12	922	509
Sand (%)	44	36	40	42	51	35
Silt (%)	30	35	43	28	30	39
Clay (%)	26	29	17	30	19	26
pH 1:2 (soil:water)	7.7	7.9	8.0	7.2	5.9	7.6
Lime (%)	Negligible	Negligible	Negligible	Negligible	Negligible	Negligible
Organic matter (%)	1.45	2.01	1.9	2.5	4.6	1.9
Total Nitrogen <sup>a</sup> (%)	0.15	0.19	0.20	0.26	0.46	0.19
Phosphorous (Olsen) (mg kg <sup>-1</sup> )	15	24	15	27	70	16
Potassium (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.50	0.65	0.6	1.2	1.3	0.32
Calcium (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	5.0	4.4	11.1	10.1	5.2	5.6
Magnesium (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	1.25	1.09	3.1	4.0	3.4	1.35
Sodium (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.19	0.23	0.5	1.0	0.4	0.22
Cation Exchange Capacity (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	8.6	8.9	7.7	10.0	11.9	8.2
Conductivity 1:2 (soil:water) (dS m <sup>-1</sup> )	0.19	0.22	0.32	0.64	0.70	0.22
MPN of infective rhizobia in pigeonpea (rhizobia – per gram of soil)			<10	<10	<10	3.5 10 <sup>4</sup>

<sup>a</sup> Organic + nitric + ammonia nitrogen.

An adequate rate of BNF in *C. cajan* fields is essential in the Dominican Republic, because this legume is mostly produced in small-scale farms without mineral fertilization and other chemical treatments. In the Caribbean area, this legume is also grown in subsistence agrosystems, which are characterized by a scarcity of productive resources (Cedano, 2006), and therefore in such situation to achieve high rates of BNF is specially important. Nevertheless, as we have observed in this study, the nodulation of *C. cajan* is poor, but this also happens even in their distribution centers (Khurana and Dudeja, 1981; Sanging et al., 1996), and consequently the inoculation with indigenous selected strains is a desirable practice in order to increase the yield of this legume without addition of chemical fertilizers.

Therefore the aims of this study were the isolation of rhizobia from *C. cajan* nodules in Dominican Republic, the identification of isolates on the basis of their 16S rRNA gene sequences, the analysis of their genetic diversity, the selection of the most efficient strains in hydroponic conditions and the analysis of the symbiotic effectiveness of selected strains in field conditions, in order to evaluate their potential as biofertilizers able to replace mineral N fertilization.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material, strains isolation and soil analysis

The isolation of rhizobial strains and the hydroponic and field experiments were carried out with *Cajanus cajan* variety "Idiaf Primor" (Cedano, 2006). Plants were sampled in the site named "La Siembra" (18°43'51"N;70°56'43"W), in the municipality of "Padre Las Casas", in the province of Azua (Dominican Republic) where *C. cajan* was intensively cultivated in short rotations as a vegetable crop during the last 15 years (Table 1). Isolations were made at the beginning of flowering, from reddish pink colored nodules in the inside, using yeast mannitol agar (YMA) according to Vincent (1970). Strains were collected from different plants at least 25 m apart from each other.

A representative soil sample of two different sub-areas within the sampled area, were collected for physico-chemical soil analysis, although the two of them showed very similar analytical charac-

teristics (Table 1). Each sample consisted on the same number of subsamples as plants harvested for rhizobial isolation. Each subsample was a vertical core of soil taken at the first 20 cm depth, collected in the same place as the plants. Soil analyses were performed according to the guidelines of the soil conservation service (1984).

### 2.2. Biodiversity analysis and identification by 16S rRNA gene sequencing

The diversity was estimated by the analysis of RAPD patterns that were obtained as previously described (Rivas et al., 2006) using the primer M13 (5'-GAGGGTGCGGTTCT-3') and the Dream-Taq DNA polymerase (Fisher Scientific) kit. PCR conditions were: preheating at 95 °C for 9 min; 35 cycles of denaturing at 95 °C for 1 min; annealing at 45 °C for 1 min and extension at 75 °C for 2 min, and a final extension at 72 °C for 7 min. 17 µl of each PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel in TBE buffer (100 mM Tris, 83 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.5) at 6V/cm, stained in a solution containing 0.5 g/ml ethidium bromide, and photographed under UV light. Standard VI (Roche, USA) was used as a size marker. The RAPD bands pattern for each strain, was coded in a presence/absence matrix in order to calculate the Shannon' index (Shannon and Weaver, 1949).

The amplification of 16S rRNA gene was performed using the primers pair 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The sequencing of this gene was carried out using the primers 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') and 800R (5'-TACCAGGTATCTAATCC-3') by MacroGen (The Netherlands). The obtained sequences were assembled using the Seqman program (Madison, Wisconsin, USA) and compared with those from EzTaxon-e server, that contains the type strains of all described bacterial species (Kim et al., 2012). The sequences were aligned using the Clustal W software (Thompson et al., 1997) and the distances were calculated according to Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980). The phylogenetic trees were inferred using the neighbor-joining model (Saitou and Nei, 1987) and MEGA5 package (Tamura et al., 2011) was used for all analyses.

### 2.3. Effectiveness studies in hydroponic media

The treatments were inoculated with the strains isolated in this study, including a non inoculated control and a non inoculated control with N added as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to a final concentration of  $1.4 \text{ g l}^{-1}$ . Plants were irrigated from a bottom reservoir with sterile N-Free solution (Rigaud and Puppo, 1975). Each experimental unit consisted on 16 plants, two per disposable plastic pot of 1 l capacity. Recipients were surface sterilised. Substrate was washed sterile vermiculite. *C. cajan* seeds of the variety "Idiá Primor" were surface sterilised and four of them were seeded per recipient. After the nascence, they were thinned to leave randomly two healthy plants. For inoculation we used 1 ml per plant of a suspension of  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ , obtained after incubation at  $28^\circ\text{C}$  in YMB for a period of 8 days. Plants were grown for 50 days in a growth chamber (16 h light at  $26^\circ\text{C}$  and 8 h darkness at  $20^\circ\text{C}$ , and relative humidity  $65\% \pm 5\%$ ). The statistical design for disposition of the plants in the growth chamber was complete random design. At the end of the experiment, plants were collected, the roots were washed with tap water to eliminate vermiculite residues, and the root nodules were separated from the root, and counted. Aerial biomass was dried in oven at  $80^\circ\text{C}$  to a constant weight to determine dry weight. N Kjeldahl (%) of the aerial biomass was determined in three groups of plants per treatment, and the results used to calculate the total N in each plant. Appropriate analysis of variance was performed with the statistical package SPSS v. 17.0

### 2.4. Field experiment

The field experiment was carried out in 2014 in four soils located in three different provinces in Dominican Republic: Arroyo Loro ( $18^\circ48'58''\text{N}; 71^\circ16'39''\text{W}$ ) in the province of San Juan de la Maguana; the experimental fields of the Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) at Engombe ( $18^\circ27'18''\text{N}; 70^\circ00'15''\text{W}$ ) in the province of Santo Domingo Oeste; and Los Indios ( $18^\circ43'31''\text{N}; 70^\circ53'33''\text{W}$ ) and Padre Las Casas ( $18^\circ44'20''\text{N}; 70^\circ56'21''\text{W}$ ), in the province of Azua. The chemical characteristics of the four soils are in Table 1. Except for the soil from the UASD experimental fields at Engombe, the rest of the soil belonged to small-scale farmers. From all the soils included in the field experiment, only in Padre Las Casas the *C. cajan* was intensively cultivated in short rotations as a vegetable crop during at least the last 15 years. The soil located in Arroyo Loro was traditionally cultivated with a rotation of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize, including sporadically *C. cajan* and sweet potato (*Ipomea batatas* L.). The soil located in Engombe was a mixed pasture of grasses and fodder legumes during 10 years, and during the last two years prior to the experiment it was in fallow. The soil located in Los Indios followed a horticultural rotation with tomato, pumpkin, courgette, eggplant, peppers, cucumber, and *C. cajan*. For each soil, the number of rhizobia nodulating *C. cajan* per gram of soil was estimated following the most probable number (MPN) method, using a 10-fold dilutions series up to  $10^{-6}$  (Beck et al., 1993).

For each location, the statistical pattern of the experiment was randomized complete block with four replicates. The experimental plot was  $20 \text{ m}^2$ , with four rows 1 m apart and a space between plants of 1 m, for 20 plants per plot. The crop was fertilized with phosphorus and potassium. The rates were calculated to cover the theoretical extractions for an expected yield of  $1600 \text{ kg ha}^{-1}$ , taking into account the soil texture, the soil content in the respective element, and for phosphorus also the soil pH, all according to the work of Silva Guzmán et al. (2009) for *C. cajan* in Dominican Republic, and the general considerations of Urbano Terrón (2008). As a consequence, the rates for P, expressed in kg per ha, were the following: Arroyo Loro and Padre Las Casas:  $11.5 \text{ kg P ha}^{-1}$ ; Engombe:  $3.5 \text{ kg P ha}^{-1}$ . Both were provided as triple superphosphate ( $46\% \text{P}_2\text{O}_5$

that means 20%P). At Los Indios, the crop was not fertilized because the soil content was very high. For K, Engombe and Los Indios did not receive fertilization because of the high soil content; Arroyo Loro received  $28 \text{ kg K ha}^{-1}$  and Padre Las Casas received the equivalent to  $56 \text{ kg K ha}^{-1}$  as KCl (60%  $\text{K}_2\text{O}$  that means 50% K). The four locations were considered as environments in the statistical analysis. The treatment was inoculation with two strains selected after the effectiveness experiment in hydroponic conditions plus two non-inoculated controls, one non-fertilized with nitrogen and the other one fertilized with nitrogen. The inoculants were peat based, with a final density of  $3 \times 10^8 \text{ cells g}^{-1}$  of peat, prepared with sterile peat and saturated bacteria liquid cultures  $1\text{--}4 \times 10^9 \text{ cells ml}^{-1}$  obtained after six days of incubation of each strain at  $28^\circ\text{C}$  in YMB medium. In the control fertilized with N, plots received  $154 \text{ kg N ha}^{-1}$ , which corresponds to the average total N extraction for a range of different varieties of *C. cajan*, for an expected yield of  $1600 \text{ kg ha}^{-1}$  according to Kumar Rao and Dart (1987). Nitrogen was provided with the fertilizer ammonium nitrate (27% N). Half of this amount was provided five days before sowing and half at the beginning of flowering. Sowing was carried out between May 1st and 3rd 2014, and harvest started on 30th July 2014. Every plant was harvested once per week during six weeks. The crop was not irrigated, except in Engombe where it was drip irrigated. The crop was kept free from weeds, and weekly controlled for plague occurrence.

Ten random plants from the two central rows were hand-harvested at "green-pod stage" (Singh, 1995), from each experimental unit. Such harvesting was repeated once a week. The pods were shelled and the yield was recorded as the weight of the green seeds, and corrected to absolute dry weight, after drying them in the oven at  $80^\circ\text{C}$  to a constant weight. The yield of the 10 plants was referred to the corresponding  $10 \text{ m}^2$ , and finally expressed as kg per ha. The following yield components were also recorded in

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 MW

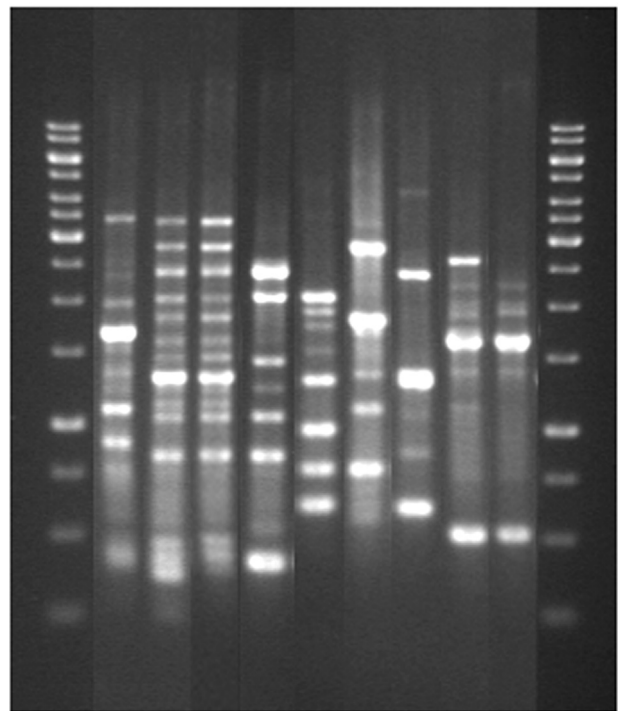
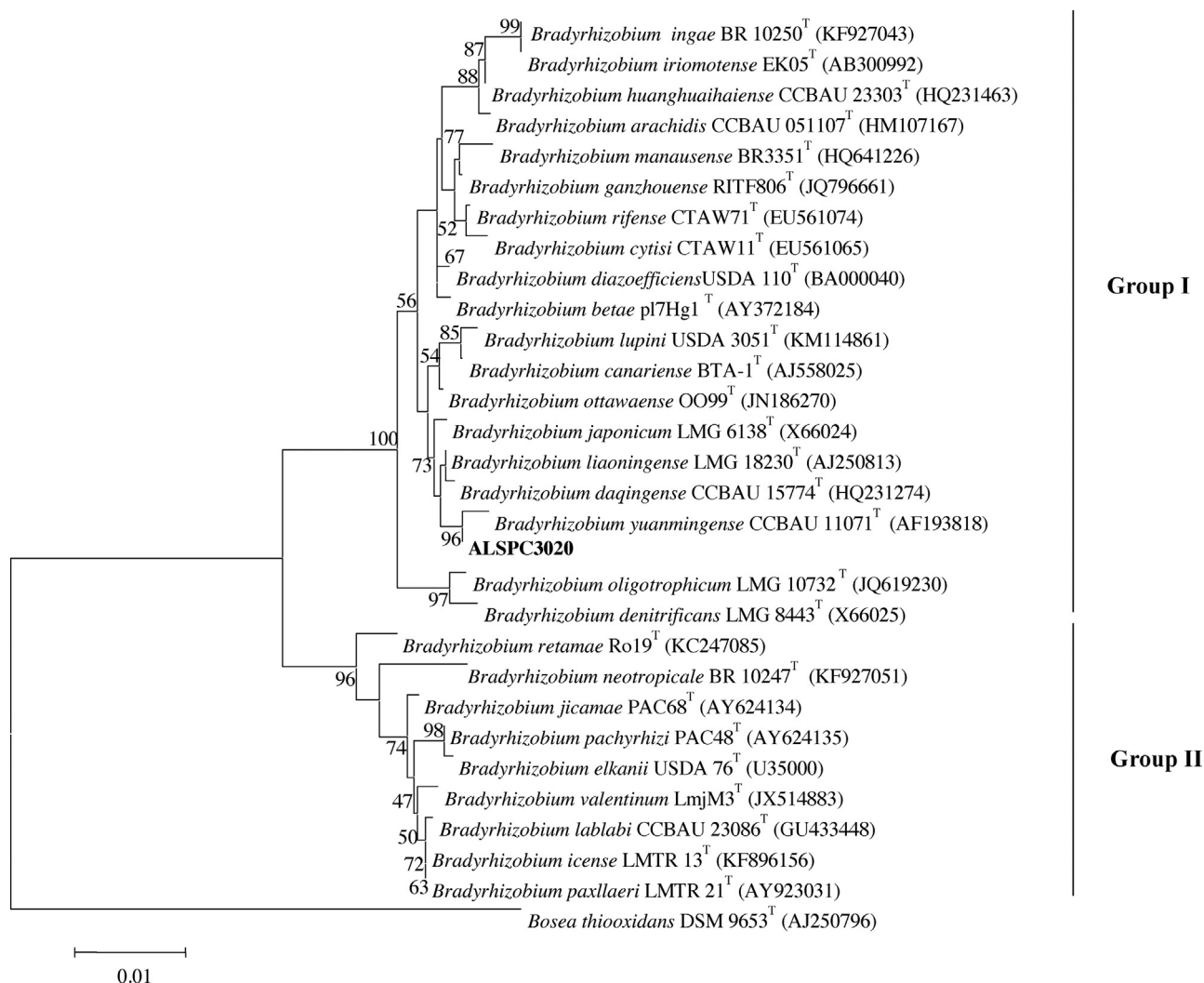


Fig. 1. RAPD patterns obtained for the strains of this study: ALSPC3051 (lane 1), ALSPC3020 (lane 2), ALSPC3021 (lane 3), ALSPC3010 (lane 4), ALSPC3030 (lane 5), ALSPC3050 (lane 6), ALSPC3040 (lane 7), ALSPC3031 (lane 8), ALSPC3041 (lane 9).





**Fig. 2.** Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of the representative strain ALSPC3020 isolated from *C. cajan* nodules within genus *Bradyrhizobium*. Bootstrap values calculated for 1000 replications are indicated. Bar, 1 nt substitution per 100 nt.

each plant: (i) Number of pods per each plant. (ii) Number of seeds per pod, determined for each individual plant from the number of seeds and the number of pods. (iii) 1000-seeds dry weight.

Combined analysis of variance appropriate to randomized complete block design was performed using the general linear models (GLM) procedure of the SPSS statistics v. 21.0. Inoculation treatment and environment were considered to be fixed effects.

### 3. Results

#### 3.1. Strain identification and genetic diversity

Nine strains were obtained from effective root nodules of *C. cajan* in the soil from “La Siembra” at Padre Las Casas in Azua province and presented slow growth on YMA plates. All these strains showed 100% identical 16S rRNA gene sequences (1323 pb long) and a comparison with the EzTaxon-e database showed that they have 99.8% identity with respect to the type strain of the species *B. yuanmingense* CCBAU 11071<sup>T</sup>. The phylogenetic analysis of the sequences obtained and those from the currently described species of genus *Bradyrhizobium* confirmed the high closeness of the strains from this study (represented by the strain ALSPC3020) with respect to *B. yuanmingense* (Fig. 1).

Despite of the complete identity in their 16S rRNA gene sequences the isolated strains were genetically diverse displaying each one a different RAPD pattern (Fig. 2). Shannon’s index of diversity was calculated for each putative RAPD locus and summed across loci to give a mean value of 0.5735.

#### 3.2. Effectiveness studies in hydroponic conditions

The effectiveness in hydroponic media was performed using sterile vermiculite as support including the nine strains isolated in this study and two non inoculated controls, one of them supplemented with nitrogen (Table 2). The ANOVA showed significant differences among treatments ( $p < 0.001$ ) for all the parameters evaluated, which included nitrogen content in the aerial biomass, dry aerial biomass and number of nodules. The most effective strains were the strains ALSPC3051, ALSPC3050 and ALSPC3031. The plants inoculated with the three mentioned strains presented significantly higher N content in the aerial biomass, than the remaining strains. On the contrary, the strains ALSPC3030, ALSPC3010, and ALSPC3040, did not show significant differences for the N content in the aerial biomass, with respect to the non-inoculated control, indicating a very weak efficiency in N fixation (Table 2).

**Table 2**

Mean values and ANOVA analysis for the parameters evaluated in the effectiveness test in sterile N-free hydroponic media. The treatments were ordered by decreasing mean values of N content in the aerial biomass. Values followed by the same letter did not differ in the LSD test ( $p < 0.05$ ).

Treatment	N content in the aerial biomass				Dry aerial biomass		Number of nodules	
	mg	per plant	Effectiveness <sup>a</sup> (%)	Ndaf <sup>b</sup> (%)	mg per plant			
N supplied non inoculated control	63.0	a	100.0		1485.7	a	0	
ALSPC3051	43.0	b	60.9	77.9	1250.0	b	30	a,b
ALSPC3050	42.0	b	58.3	77.1	1214.3	b,c	26	a,b,c
ALSPC3031	40.6	b	43.6	71.6	1137.5	b,c	33	a
ALSPC3021	32.7	c	27.7	61.6	975.0	c	20	c
ALSPC3020	24.2	d	15.1	46.6	1142.9	b,c	25	b,c
ALSPC3041	17.4	d, e	12.7	42.2	475.0	d	11	d
ALSPC3030	16.1	d, ef	12.1	41.1	571.4	d	11	d
ALSPC3010	15.8	ef	3.5	17.0	500.0	d	12	d
ALSPC3040	11.2	ef	62.8	78.4	525.0	d	10	d
Non inoculated control	9.3	f			337.5	d	0	
Mean squares	2,142.302				1,200.452		983.947	
Statistical significance	***				***		***	
Degrees of freedom	10				10		10	

LSD least significant difference.

<sup>a</sup> Effectiveness (%) estimated as [(N content in plants inoculated with the strain – N content in the non inoculated control)/(N content in the N supplied non inoculated control – N content in the non inoculated control)] × 100.

<sup>b</sup> Ndaf: nitrogen derived from atmospheric fixation estimated as [(N content in plants inoculated with the strain – N content in the non inoculated control)/N content in plants inoculated with the strain] × 100.

From the three most effective strains, ALSPC3051 showed 60.9% of effectiveness compared with the N supplied control, and the strains ALSPC3050 and ALSPC3031 58.3% and 43.6%, respectively. In addition, the plants inoculated with the strain ALSPC3051 had the highest values of dry aerial biomass, with 1250 mg per plant, although the differences with respect to the strains ALSPC3050 and ALSPC3031 were not significant. Considering these results, for the field analysis we selected the strains ALSPC3051 and ALSPC3050 with the highest N percentage derived from BNF and aerial biomass per inoculated plants.

### 3.3. Field experiment

The field experiment was located in four different environments of Dominican Republic, in three different provinces. In spite of the geographic distance among the locations, only the soil from Los Indios (Azua) located at 922 m of altitude, showed marked differences in chemical characteristics (Table 1) with the rest of the soils, located from 509 m to sea level. Whereas the soil from Los Indios had slightly acid pH, other soils were slightly basic. The cation exchange capacity (CEC) of Los Indios was the highest, and the organic matter content was around double in Los Indios's soil than in the other. Phosphorous content was very high in Los Indios whereas in the rest of the soils it was medium or low. About potassium, Padre Las Casas showed low content, and the rest high or very high values. Calcium was high in Arroyo Loro and Engombe and medium in Los Indios and Padre Las Casas. Magnesium was high in Arroyo Loro, Engombe and Los Indios, and medium in Padre Las Casas. As expected from their cropping history, the soils have different counts of rhizobia. According to the

MPN results, in the soil from Padre Las Casas with a long tradition of intensive *C. cajan* cultivation, the average MPN was  $3.5 \times 10^4$  nodulating rhizobia per gram of soil, whereas in the rest of the soils, the count was of less than 10 nodulating rhizobia per gram of soil.

Results of the combined analysis of variance for locations and treatments, indicated that the location of the experimental field involved highly significant differences ( $p < 0.001$ ) for the dependent variables yield of green seeds, number of pods per plant, and number of seeds per pod. The 1000-seeds weigh did not show significant differences between locations (Table 3). Regarding inoculation treatments, there was highly significant differences ( $p < 0.001$ ) for the yield and the number of pods per plant, and significant differences ( $p < 0.01$ ) for the number of seeds per pod, whereas the 1000-seed weigh did not show differences between inoculation treatments. Moreover, there were significant interactions ( $p < 0.01$ ) between the location and the inoculation treatment for the yield and the number of pods per plant (Table 3).

In average, the yield of green seeds was significantly higher in Engombe (Table 4), because this plot was irrigated, whereas in the rest of the locations, there was not irrigation.

In average, the biofertilization with the strain ALSPC3050 produced significantly higher yield than the other treatment and the controls (Table 4). The treatment biofertilized with the strain ALSPC3051 and the control fertilized with mineral N, produced similar average yields, which were significantly higher than in the non-fertilized control (Table 4).

We have also presented in Table 4 for each location separately, the mean values for the inoculation treatments and for the controls, along with the separation of the mean values based on the

**Table 3**

Mean squares and F values of the combined analysis of variance for the field experiment.

Source of variation	df	Yield of green seeds expressed in dry matter (kg/ha)		Pods per plant		Seeds per pod		1000-seed weight (g)	
		Mean square	F value	Mean square	F value	Mean square	F value	Mean square	F value
Analys of the environment									
Location (L)	3	3,370,457.676	99.644***	30,134.448	81.079***	4.332	25.101***	0.138	0.012 <sup>ns</sup>
Repetition (R)	3	38,743.679	1.157 <sup>ns</sup>	447.338	1.220 <sup>ns</sup>	0.180	1.048 <sup>ns</sup>	6.575	0.575 <sup>ns</sup>
Analysis of the treatment									
Inoculation (I)	3	579,691.998	17.138***	4,245.774	11.424***	0.928	5.378**	2.998	0.269 <sup>ns</sup>
L x I	9	105,880.739	3.130**	1,082.091	2.911**	0.106	0.614 <sup>ns</sup>	20.505	1.841 <sup>ns</sup>

**Table 4**  
Values of the dependent variables yield, and yield components for the field experiment. Means comparison is based in LSD text. The table includes the mean values for each treatment in each location plus the mean values of the combined analysis per location and per treatment. The mean values followed by the same letter did not significantly differ at  $p < 0.05$ . Capital letters are read in horizontal, and lower case letters in vertical.

Treatment: inoculation	Yield of green seeds expressed in dry matter (kg/ha)																			
	Pods per plant					Seeds per pod														
	Arroyo Loro	Engombe	Los Indios	P. Las Casas	Mean	Arroyo Loro	Engombe	Los Indios	P. Las Casas	Mean										
Non fertilised	1419 <sup>a</sup>	2106 <sup>a</sup>	1365 <sup>a</sup>	1675 <sup>a</sup>	1641 <sup>a</sup>	232 <sup>a</sup>	290 <sup>d</sup>	223 <sup>a</sup>	247 <sup>a</sup>	248 <sup>a</sup>	6.20 <sup>a</sup>	7.37 <sup>d</sup>	6.05 <sup>a</sup>	6.60 <sup>a</sup>	6.56 <sup>a</sup>	98.85 <sup>a</sup>	102.68 <sup>a</sup>	101.15 <sup>a</sup>	99.23 <sup>a</sup>	100.48 <sup>a</sup>
Fertilised N	1613 <sup>b</sup>	2364 <sup>a</sup>	1632 <sup>b</sup>	1688 <sup>a</sup>	1824 <sup>b</sup>	248 <sup>a</sup>	316 <sup>bc</sup>	246 <sup>bc</sup>	249 <sup>a</sup>	265 <sup>b</sup>	6.69 <sup>a</sup>	7.59 <sup>ab</sup>	6.64 <sup>ab</sup>	6.77 <sup>a</sup>	6.92 <sup>b</sup>	98.53 <sup>a</sup>	99.05 <sup>a</sup>	100.73 <sup>a</sup>	101.98 <sup>a</sup>	100.07 <sup>a</sup>
ALSPC3051	1690 <sup>b</sup>	2904 <sup>b</sup>	1671 <sup>b</sup>	1657 <sup>a</sup>	1980 <sup>b</sup>	250 <sup>a</sup>	374 <sup>c</sup>	250 <sup>b</sup>	251 <sup>a</sup>	281 <sup>b</sup>	6.76 <sup>a</sup>	7.89 <sup>b</sup>	6.60 <sup>ab</sup>	6.85 <sup>a</sup>	7.02 <sup>b</sup>	101.93 <sup>a</sup>	100.48 <sup>a</sup>	96.55 <sup>a</sup>	101.73 <sup>a</sup>	100.17 <sup>a</sup>
ALSPC3050	1689 <sup>b</sup>	2885 <sup>b</sup>	1867 <sup>b</sup>	1862 <sup>a</sup>	2076 <sup>c</sup>	247 <sup>a</sup>	356 <sup>bc</sup>	265 <sup>b</sup>	262 <sup>a</sup>	283 <sup>c</sup>	6.59 <sup>a</sup>	7.81 <sup>b</sup>	7.08 <sup>b</sup>	6.93 <sup>a</sup>	7.10 <sup>b</sup>	100.73 <sup>a</sup>	98.40 <sup>a</sup>	101.30 <sup>a</sup>	97.35 <sup>a</sup>	99.44 <sup>a</sup>
Mean	1602 <sup>A</sup>	2565 <sup>B</sup>	1634 <sup>A</sup>	1720 <sup>A</sup>	2076 <sup>C</sup>	244 <sup>A</sup>	334 <sup>B</sup>	246 <sup>A</sup>	252 <sup>A</sup>	283 <sup>C</sup>	6.56 <sup>A</sup>	7.67 <sup>B</sup>	6.59 <sup>A</sup>	6.79 <sup>A</sup>	7.10 <sup>B</sup>	100.01 <sup>A</sup>	100.15 <sup>A</sup>	99.93 <sup>A</sup>	100.07 <sup>A</sup>	100.07 <sup>A</sup>

ANOVA analysis (ANOVA table is not shown). This information is important because we observed significant interactions between locations and inoculation treatments (Table 3). Regarding to the yield of green seeds (Table 4) in Arroyo Loro and Los Indios, biofertilization and fertilization with mineral N produced similar yield, significantly higher than the non-fertilized control. Conversely, in Engombe the yield in the biofertilized treatments was significantly higher than in the N fertilized and in the non-fertilized controls, which did not differ between them. Furthermore, in Padre Las Casas neither the biofertilization nor the fertilization with mineral N, produced significantly higher yield compared with the non-fertilized control. Interestingly this soil from Padre Las Casas was the only one that showed resident infective rhizobia, and a long tradition for intensive *C. cajan* cultivation. Regarding the differences of yield, between the two biofertilized treatments, in average the biofertilization with the strain ALSPC3050 provided a significantly higher yield than the strain ALSPC3051, but in three of the four soils (Arroyo Loro, Los Indios and Padre Las Casas) there was no statistical significance in the differences between the two strains. Conversely in Engombe the yield was higher with ALSPC3051, although the differences were not significant.

The yield components analysed were the number of pods per plant, the number of seeds per pod and 1000-seeds weight. From such yield components, it can be deduced that the higher yield observed in Engombe compared to the other three soils, was the consequence of a significantly higher number of pods per plant, and of seeds per pod (Tables 3 and 4). The same explanation is valid for the higher yield of the biofertilized treatments and the N-fertilized control, compared to the non-fertilized control (Tables 3 and 4). However the size of the seeds was similar for all the independent variables (Tables 3 and 4), as it depends mainly on the position within the pod.

#### 4. Discussion

*C. cajan* is a chief protein crop for human feed in tropical areas (Odeny, 2007) where the use of N fertilizers is usually scarce, because their high costs, what emphasizes the need for improvement the BNF (Hungria et al., 2005a,b). For this reason, it is of high interest to analyse the situation about the symbiotic status of *C. cajan* in the different productive regions of the world, in order to develop adequate inoculants. There are two different strategies to develop inoculants. The first one is to use a commercial inoculant, most frequently of allochthonous origin, and the second one is to use native strains. The second strategy should be the preferable, as it has been demonstrated that it is more efficient, in several legume crops and in different parts of the world, and in particular for pulse legumes (Hungria et al., 2000, 2003; Mostasso et al., 2002; Mrabet et al., 2005; Mulas et al., 2011). The reason for the better performance of products based in autochthonous rhizobia is probably the better adaptation to the local conditions, and the co-adaptation with the local varieties of the legume crop (Santiago de Freitas et al., 2012).

Nevertheless, for many legumes their endosymbionts have not been studied in the locations where they are cultivated. This is the case of *C. cajan* in the Dominican Republic where there are not previous studies about the rhizobia nodulating this legume in spite of the importance of this crop in this country and in all Caribbean area (Odeny, 2007). The closest reference correspond to Trinidad y Tobago, where most of the isolates from root nodules of *C. cajan* were close to the fast-growing species *Rhizobium galegae* and the slow-growing species *Bradyrhizobium elkanii* (Ramsubhag et al., 2002). This *Bradyrhizobium* species belongs to the 16S rRNA group II according to Menna et al. (2009). However, our strains belong to the 16S rRNA group I (Fig. 2) and are closely related to *B. yuan-*

*mingense*, a species isolated from *Lespedeza* nodules in China (Yao et al., 2002). Therefore this is the first report about strains from the *Bradyrhizobium* 16S rRNA group I in nodules of *C. cajan* in the Caribbean region.

In the soils from Dominican Republic, the nodulation of *C. cajan* was scarce or absent since from the four soils analysed in the field study, only the one located at Padre Las Casas, with a long tradition of *C. cajan* cultivation, harboured strains nodulating this crop. The scarce nodulation of this legume has been observed before, even in its distribution centres (Khurana and Dudeja, 1981; Sanginga et al., 1996), but it was unexpected because *C. cajan* can be nodulated by slow and fast growing rhizobia, as *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium liaoningense* (Appunu et al., 2009), *B. elkanii* (Ramsubhag et al., 2002), *Bradyrhizobium* sp. (Rufini et al., 2014) *Rhizobium* sp. (Tilak et al., 2006; Bhattacharjee and Sharma, 2012; Dutta et al., 2014) and *Ensifer* sp. (Dubey et al., 2010).

In spite of the scarce nodulation of the crop in Dominican Republic, the infraspecific genetic diversity of the isolated strains was high. The Shannon index value derived from the RAPD patterns analysis (0.59) is proportionally similar to those observed in larger rhizobia collections from *Phaseolus vulgaris* by Oliveira et al. (2011) who considered such values as indicators of high biodiversity. High variability was also found among the strains in the effectiveness tests in hydroponic conditions concerning to the number of nodules per plant, the N derived from atmospheric fixation, and the aerial biomass, allowing us to select strains for field experiments as potential candidates to be used in a specific biofertilizer for *C. cajan* in Dominican Republic.

The field experiments were carried out in four soils, one of them (Padre Las Casas) was located in the same agroecological area where the strains from this study were isolated, and showed  $3.5 \times 10^4$  CFU/g of rhizobia nodulating *C. cajan*. In this soil, although the mean values of grain yield with the strain ALSPC3050 was 11% higher than in the remaining treatments, there was not significant differences in the grain yield between the biofertilized treatments, the non-fertilized control, and the N fertilized control. This is in agreement with the results of Santiago de Freitas et al. (2012) who also observed lack of response in terms of grain yield to biofertilization and N fertilization, in soils with resident infective bradyrhizobia for cowpea (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)). Several authors attributed this effect to the density, effectiveness and competitive ability of rhizobia already present in the soil (Thies et al., 1991; Osunde et al., 2003; Otieno et al., 2009).

The remaining soils from this study (Arroyo Loro, Egombe and Los Indios) were located separate from Padre de Las Casas and yielded MPN counts lower than 10CFU/g of rhizobia nodulating *C. cajan*. In these three soils, the biofertilization with the selected strains and the fertilization with mineral N, significantly improved the yield compared with the non-fertilized control. Furthermore, the grain yield was from 5% to 22% higher in the biofertilized treatments, than in the N fertilized control, although the differences only were statistically significant in the soil from Engombe, possibly due to a poor N fertilization level considering the potential yield of *C. cajan* in this soil even without fertilization. In any case in these three soils the yield of the biofertilized treatments was higher than in absence of inoculation. These findings are in agreement to those from Mulas et al. (2011) for *P. vulgaris* showing that biofertilization with rhizobial strains produced the same or even higher yield than the traditional mineral nitrogen fertilization. Therefore, our results showed the suitability of the formulation of biofertilizers with strains nodulating *C. cajan* native to Dominican Republic, where this vegetable crop is key for human nutrition in small-scale farms, and where biofertilizers would be more easily accessed by farmers than mineral fertilizers, due to their higher cost of the mineral ones.

## 5. Conclusion

The results of this work showed that all strains isolated from the root nodules of *Cajanus cajan* in the south-western Dominican Republic were phylogenetically close to *B. yuanmingense* showing high genetic biodiversity on the basis of their RAPD patterns as well as high variability on N-fixation effectiveness observed in hydroponic conditions. Two autochthonous highly effective strains used in field experiments in Dominican Republic produced higher yield than the non-fertilized control, and the same or even higher yield than the control fertilized with mineral nitrogen, in soils without native infective strains regardless their physico-chemical characteristics, including the content of organic matter and N content. Taking into account that the number of soils with infective rhizobia for *C. cajan* in Dominican Republic is very low, it has been demonstrated for the first time in the Caribbean region that biofertilization with native *Bradyrhizobium* strains can be adopted instead of chemical fertilization to improve both the yield and the quality of such important vegetable crop.

## Acknowledgements

This work has been financially supported by the following research projects: FONDOCYT projects 2008-2-D1-064 and 2012-2C1-69 (Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología, MESCYT) from Dominican Republic; AECID project A1/035364/11 (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo). Juan Araujo was granted by Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) from Dominican Republic, and by Universidad de León from Spain.

## References

- Appunu, C., Sasirekha, N., Prabavathy, V.R., Nair, S., 2009. A significant proportion of indigenous rhizobia from India associated with soybean (*Glycine max* L.) distinctly belong to *Bradyrhizobium* and *Ensifer* genera. Biol. Fert. Soils 46, 57–63. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-009-0405-8>
- Beck, D.P., Materon, L.A., 1993. Practical Rhizobium-legume Technology Manual Technical Manual No. 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.
- Beekham, A., Umaharan, P., 2010. Inheritance and combining ability studies of pod physical and biochemical quality traits in vegetable pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). Euphytica 176, 37–47. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-010-0211-2>
- Bhattacharjee, S., Sharma, G.D., 2012. Effect of dual inoculation of arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on the chlorophyll, nitrogen and phosphorus contents of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Adv. Microbiol. 2, 561–564. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.24072>
- Cedano, J., 2006. Guía Técnica Cultivo del Guandul. CEDAF, Santo Domingo, República Dominicana.
- Costa, F.M., Schiavo, J.A., Brasil, M.S., Leite, J., Xavier, G.R., Fernandes Jr., P.I., 2014. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. Genet. Mol. Res. 13, 469–482. <http://dx.doi.org/10.4238/2014>
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., Frostegard, A., 2013. Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. Syst. Appl. Microbiol. 36, 272–280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.004>
- Dominican Republic, 2012. <<http://www.agricultura.gob.do/estadisticas/siembracosecha-y-produccion-agropecuaria/>>.
- Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Kumar, H., Choure, K., 2010. Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. Afr. J. Biotechnol. 9, 8619–8629. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1127>
- Dutta, S., Morang, P., Kumar, N.S., Kumar, B.S.D., 2014. Two rhizobacterial strains, individually and in interactions with *Rhizobium* sp., enhance fusarial wilt control, growth, and yield in pigeon pea. J. Microbiol. 52, 778–784. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-014-3496-3>
- Fernandes, M.F., Fernandes, R.P.M., Hungria, M., 2003. Genetic characterization of indigenous rhizobia strains from the coastal tableland efficient for the pigeonpea and cowpea crops. Pesqui. Agropecu. Bras. 38, 911–920. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204x2003000800003>
- Gooding, H.J., 1962. The agronomic aspects of pigeon pea. Field Crop Abstr. 15, 1–5.
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, J.C., Graham, P.H., 2005a. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics, the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: Singh, R.P., Shankar Jaiwal, N.P.K. (Eds.), Nitrogen Nutrition and Sustainable Plant Productivity. Studium Press, LLC, Houston, Texas, pp. 43–93.

- Hungria, M., Loureiro, M.F., Mendes, I.C., Campo, R.J., Graham, P.H., 2005b. Inoculant preparation, production and application. In: Werner, D., Newton, W.E. (Eds.), *Nitrogen Fixation: Origins, Applications and Research Progress*, Volume IV. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment. Springer, Dordrecht, Amsterdam, pp. 223–254.
- Hungria, M., Andrade, D.D., Chueire, L.M.D., Probanza, A., Guttierrez-Manero, F.J., Megias, M., 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1515–1528, [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)63-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)63-8)
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C., 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium* tropici strains. *Biol. Fert. Soils* 39, 88–93, <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-003-0682-6>
- Khurana, A.L., Dudeja, S.S., 1981. Field populations of rhizobia and response to inoculation, molybdenum and nitrogen fertilizer in pigeonpea. In: *Proceedings of the International Workshop on Pigeonpea*, Volume 2, ICRISAT Centre, Patancheru, India, pp. 15–19.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 716–721, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar Rao, J.V.D.K., Dart, P.J., 1987. Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen uptake in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) of different maturity groups. *Plant Soil* 99, 255–266, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02370872>
- Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M., 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnkA* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934–2950, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.009779-0>
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F.G., Bangel, E.V., Hess, P.N., Martinez-Romero, E., 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 315–332, <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T., Hungria, M., 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res.* 73, 121–132, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00186-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1)
- Moulin, L., Bena, G., Boivin-Masson, C., Stepkowski, T., 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 720–732, [http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00255-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00255-0)
- Mrabet, M., Mhamdi, R., Tajini, F., Tiwari, R., Trabelsi, M., Aouani, M.E., 2005. Competitiveness and symbiotic effectiveness of a *R. gallicum* strain isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Eur. J. Agron.* 22, 209–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2004.02.006>
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.-H., Casquero, P., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2011. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2283–2293, <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018>
- Odeny, D.A., 2007. The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L. Millsp.) in Africa. *Nat. Resour. Forum* 31, 297–305, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1477-8947.2007.00157.x>
- Oliveira, J.P., Galli-Terasawa, L.V., Enke, C.G., Cordeiro, V.K., Armstrong, L.C.T., Hungria, M., 2011. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 643–650, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0501-9>
- Osunde, A.O., Gwam, S., Bala, A., Sangina, N., Okogun, J.A., 2003. Responses to rhizobial inoculation by two promiscuous soybean cultivars in soils of the Southern Guinea savanna zone of Nigeria. *Biol. Fert. Soils* 37, 274–279, <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-003-0609-2>
- Otieno, E., Muthomi, J.W., Cheming'wa, G.N., Nderitu, J.H., 2009. Effect of rhizobia inoculation, farmyard manure and nitrogen fertilizer on nodulation and yield of food grain legumes. *J. Biol. Sci.* 9, 326–332, <http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2009.326.332>
- Ramsubhag, A., Umaharan, P., Donawa, A., 2002. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 139–144, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11427.x>
- Rigaud, J., Puppo, A., 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88, 223–228, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-88-2-223>
- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 287, 23–33, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6>
- Rufin, M., Oliveira, D.D.P., Trochmann, A., Soares, B.L., Bastos de Andrade, M.J., de Souza Moreira, F.M., 2014. *Bradyrhizobium* strains in symbiosis with dwarf pigeon pea under greenhouse and field conditions. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 49, 197–206, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000300006>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sangina, N., Wirkom, L.E., Okogun, A., Akobundu, I.O., Carsky, R.J., Tian, G., 1996. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biol. Fert. Soils* 23, 441–448, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00335920>
- Santiago de Freitas, A.D., Silva, A.F., de Sa Barretto Sampaio, E.V., 2012. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. *Biomass Bioenerg* 45, 109–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.017>
- Saxena, K.B., 2008. Genetic improvement of pigeon pea: a review. *Trop. Plant Biol.* 1 (2), 159–178, <http://dx.doi.org/10.1007/s12042-008-9014-1>
- Saxena, K.B., Sawargaonkar, S.L., 2014. First information on heterotic groups in pigeonpea *Cajanus cajan*. *Euphytica* 200, 187–196, <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-014-1142-0>
- Shannon, C.E., 1997. *The mathematical theory of communication* (Reprinted). MD Comput. 14, 306–317.
- Silva Guzmán, H., González Andrés, F., Urbano López de Meneses, B., 2009. Optimización de la Fertilización Mineral en Cultivos de Regadío de República Dominicana. AECID – Publicaciones INEA, Madrid, Valladolid.
- Singh, U., 1995. Processing and utilization of pigeonpea. In: Silim, S.N., King, S.B., Tuwafe, S. (Eds.), *Improvement of pigeonpea in eastern and southern Africa*. Annual Research Planning Meeting. International Crops Research Institute for Semi-arid Tropics, Nairobi, Kenya, pp. 133–138.
- Spence, J.A., Williams, S.J., 1972. Use of photoperiod response to change plant design. *Crop Sci.* 12, 121–122, <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200010044x>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thies, J., Singleton, P.W., Benbohlood, B., 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 19–28.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Tilak, K., Ranganayaki, N., Manoharachari, C., 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Eur. J. Soil Sci.* 57, 67–71, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00771.x>
- Urbano Terrón, P., 2008. *Fitotecnia. Ingeniería de la Producción Vegetal*. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España.
- Valenzuela, H., Smith, J., 2002. *Pigeonpea*. University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Van der Maesen, L.J.G., 2006. *Cajanus cajan* (L.) Millsp. In: Brink, M., Belay, G. (Eds.), *PROTA 1: Cereals and pulses/Céréales et légumes secs*. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands.
- Varshney, R.K., Penmetsa, R.V., Dutta, S., Kulwal, P.L., Saxena, R.K., Datta, S., Sharma, T.R., Rosen, B., Carrasquilla-García, N.A., Farmer, D., Dubey, A., Saxena, K.B., Gao, J., Fakrudin, B., Singh, M.N., Singh, B.P., Wanjari, K.B., Yuan, M., Srivastava, R.K., Kilian, A., Upadhyaya, H.D., Mallikarjuna, N., Town, C.D., Bruening, G.E., He, G., May, G.D., McCombie, R., Jackson, S.A., Singh, N.K., Cook, D.R., 2010. Pigeonpea genomics initiative (PGI): an international effort to improve crop productivity of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Mol. Breed.* 26, 393–408, <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-009-9327-2>
- Vincent, J.M. (Ed.), 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1–13.
- Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., Chen, W.X., 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 2219–2230, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.01408-0>

### 3.4. Texto completo artículo 2. (Araujo *et al.* 2017)

INTERNATIONAL  
JOURNAL OF SYSTEMATIC  
AND EVOLUTIONARY  
MICROBIOLOGY

#### TAXONOMIC DESCRIPTION

Araújo *et al.*, *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:2236–2241

DOI 10.1099/ijsem.0.001932



## *Bradyrhizobium cajani* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*

Juan Araújo,<sup>1†</sup> José David Flores-Félix,<sup>2†</sup> José M. Igual,<sup>3,4</sup> Alvaro Peix,<sup>3,4</sup> Fernando González-Andrés,<sup>5</sup> César Antonio Díaz-Alcántara<sup>1</sup> and Encarna Velázquez<sup>2,4,\*</sup>

#### Abstract

Two slow-growing strains, AMBPC1010<sup>T</sup> and AMBPC1011, were isolated from nodules of *Cajanus cajan* in the Dominican Republic. 16S rRNA gene analysis placed these strains within the genus *Bradyrhizobium*, being phylogenetically equidistant to several species of this genus. Analysis of the *recA* and *atpD* genes showed that the strains isolated belong to a cluster containing the strains *Bradyrhizobium ottawaense* 0099<sup>T</sup>, '*Bradyrhizobium americanum*' CMVU44 and *Bradyrhizobium daqingense* CCBAU 15774<sup>T</sup>, and presented similarity values lower than 96 % for both genes with respect to the strains nodulating *C. cajan*. DNA–DNA hybridization analysis showed averages of 36, 40 and 39 % relatedness with respect to the representative strains of *Bradyrhizobium ottawaense*, '*Bradyrhizobium americanum*' and *Bradyrhizobium daqingense*, respectively. Phenotypic characteristics also differed from those of the most closely related species of the genus *Bradyrhizobium*. Therefore, based on the data obtained in this study, we propose to classify the strains AMBPC1010<sup>T</sup> (=LMG 29967<sup>T</sup>=CECT 9227<sup>T</sup>) and AMBPC1011 into a novel species named *Bradyrhizobium cajani* sp. nov.

The genus *Bradyrhizobium* comprises Gram-stain-negative, aerobic bacteria showing slow growth in media containing mannitol as a carbon source [1]. This genus currently contains more than 30 species, some of them recently isolated from nodules of American tropical legumes [2–5]. The seeds of some of these legumes have great interest as human foods, particularly for developing countries, such as those from *Cajanus cajan* L., which establishes nitrogen-fixing symbiosis with strains of the genus *Bradyrhizobium* [6–8].

In this work, we characterized two strains isolated from *C. cajan* nodules in the Dominican Republic and from the results obtained we propose a novel species with the name *Bradyrhizobium cajani* sp. nov.

The strains, named AMBPC1010<sup>T</sup> and AMBPC1011, were isolated from two effective root nodules (pink colour) of plants from *C. cajan* L. cultivated at the site named 'Monte Monito' located in Azúa province in the Dominican Republic. The isolation was performed on YMA plates following the classic methodology described by Vincent [9], and the

ability to reinfect their host was confirmed according to the method of Araújo *et al.* [8].

Strains AMBPC1010<sup>T</sup> and AMBPC1011 were subjected to random amplification of polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting as was previously described [10] using the M13 primer (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') and Go Taq G2 Green Master Mix (Promega). The results showed that the two strains have different RAPD profiles between them and with respect to the most closely related type strains (Fig. S1, available in the online Supplementary Material).

Amplification and sequencing of the complete 16S rRNA gene of the newly isolated strains was carried out according to the method of Rivas *et al.* [11], that of the *recA* and *glnII* genes was performed according to the method of Vinuesa *et al.* [12] and that of the *nodC* gene was carried out according to the method of Velázquez *et al.* [13]. The sequences obtained were compared with those from GenBank using the BLASTN program [14]. Sequences were aligned using the CLUSTAL X software [15]. The distances were calculated according to Kimura's two-parameter model [16].

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo, Santo Domingo, Dominican Republic; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Genética and Instituto Hispanoluso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>3</sup>Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (IRNASA-CSIC), Salamanca, Spain; <sup>4</sup>Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC, Salamanca, Spain; <sup>5</sup>Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, Universidad de León, León, Spain.

\*Correspondence: Encarna Velázquez, evp@usal.es

**Keywords:** *Bradyrhizobium*; *Cajanus cajan*; Dominican Republic; legume nodules.

†These authors contributed equally to this work.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA, *recA* and *glnII* genes of the type strain are KY349447, KY349440 and KY349442, respectively.

One supplementary table and two supplementary figures are available with the online Supplementary Material.

Phylogenetic trees were inferred using the neighbour-joining [17] and maximum-likelihood [18] analyses. The topologies of the trees obtained after the analyses of the individual housekeeping genes *glnII* and *recA* were similar and then these genes were concatenated. MEGA5 software [19] was used for all analyses.

The 16S rRNA gene sequence of strain AMBPC1011 (accession number KY349446) was identical to that of the type strain AMBPC1010<sup>T</sup> and so only this last strain was included in the phylogenetic analysis of this gene. According to the results obtained, this strain belongs to the genus *Bradyrhizobium* forming an independent branch equidistant to several species from this genus with similarity values ranging from 99 to 99.6% (Fig. 1). Several species of the genus *Bradyrhizobium* are within this range of similarity values and they are distinguishable on the basis of housekeeping gene sequences, such as those of *recA* and *glnII*, available for all species of the genus *Bradyrhizobium*.

The analysis of the concatenated *recA* and *glnII* genes showed that the strains isolated from *C. cajan* nodules formed an independent lineage closely related to the type or proposed type strains of *Bradyrhizobium ottawaense*, *Bradyrhizobium daqingense* and '*Bradyrhizobium americanum*' (Fig. 2). The similarity values for the *recA* gene were 93, 94 and 94.5%, respectively, and those for the *glnII* gene were 94.6, 94.4 and 94.8%, respectively. These values are lower than those found among several described species of the genus *Bradyrhizobium* (Fig. 2) suggesting that the strains isolated in this study do not belong to previously described species from this genus.

DNA–DNA hybridization experiments were carried out as reported previously [20, 21] and showed an average of 82% ( $\pm 3\%$ ) between strains AMBPC1010<sup>T</sup> and AMBPC1011, corresponding to strains belonging to the same species. Averages of 36% ( $\pm 3\%$ ), 39 ( $\pm 4\%$ ) and 40 ( $\pm 4\%$ ) were found between strain AMBPC1010<sup>T</sup> and *B. ottawaense* HAMBI 3284<sup>T</sup>, *B. daqingense* LMG 26137<sup>T</sup> and '*B. americanum*' CMVU44, respectively. Since these percentages are below the 70% threshold value of DNA–DNA relatedness for definition of bacterial species [22], the strains isolated in this study from *C. cajan* nodules should be assigned to a different species.

DNA for analysis of DNA base composition was prepared according to the method of Chun and Goodfellow [23]. The G+C content (mol%) of DNA was determined using the thermal denaturation method [24]. The DNA G+C content of strain AMBPC1010<sup>T</sup> was 62.7%, which is within the range reported for its most closely related species [3, 25, 26].

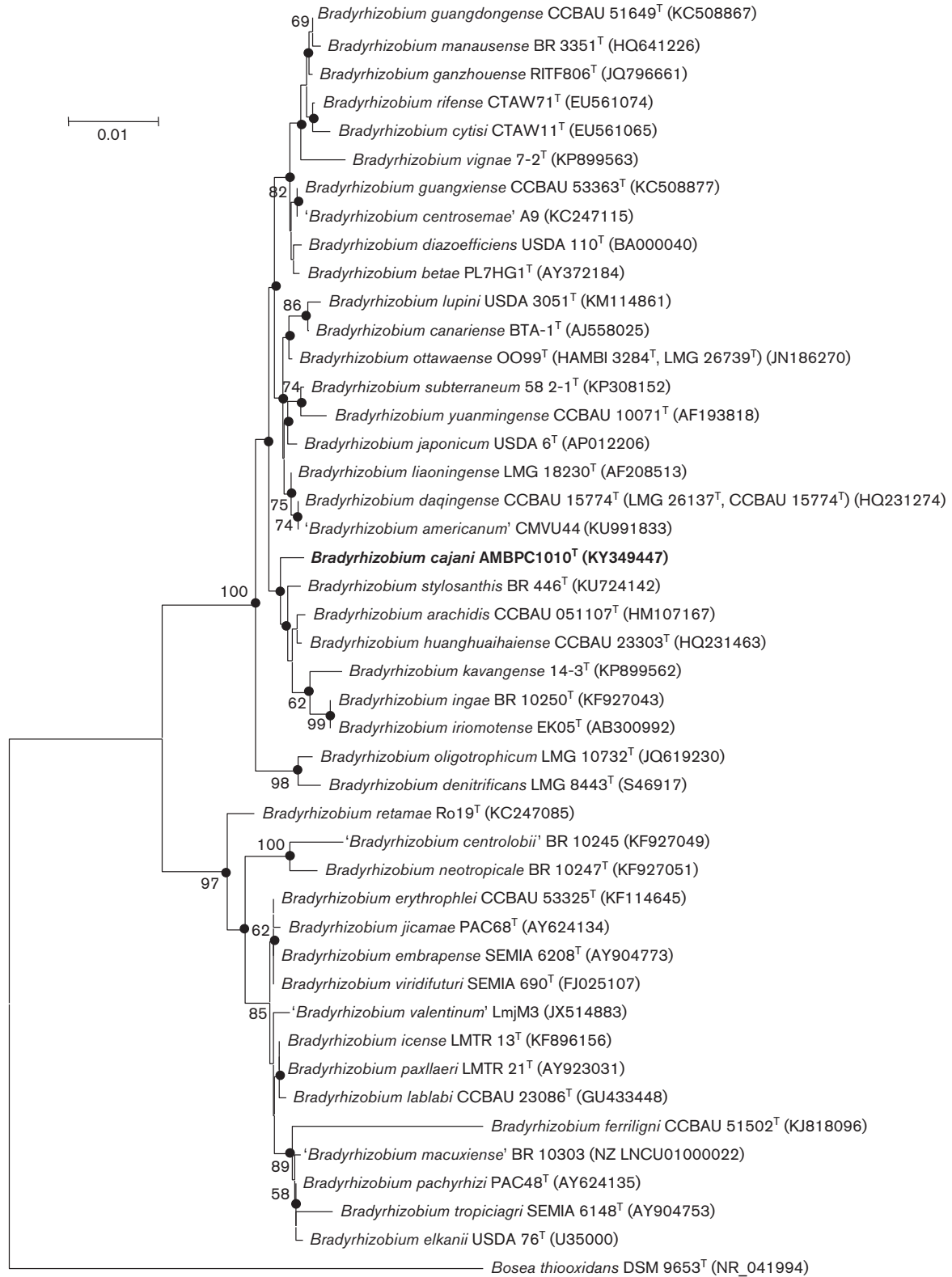
The cellular fatty acids were analysed by using the Microbial Identification System (MIDI, Microbial ID) Sherlock 6.1 and the library RTSBA6 according to the technical instructions provided by this system [27]. The strains were cultured aerobically on YMA medium [8] at 28 °C, and cells were collected after 48 h of incubation at the exponential growth phase. The results obtained showed that the major

fatty acids of the strains isolated from *C. cajan* were those from summed feature 8 (C<sub>18:1 $\omega$ 6c</sub>/C<sub>18:1 $\omega$ 7c</sub>) and C<sub>16:0</sub> (Table 1) in agreement with the results found previously for many species of the genus *Bradyrhizobium* [28]. The strains from this study showed slight differences in their fatty acid profiles and with respect to those of the closely related species (Table 1).

The phenotypic characterization was performed as previously described for species of the genus *Bradyrhizobium* [25, 26, 29, 30] including API ID32GN and API 20NE systems (with the addition of MgSO<sub>4</sub> up to a final concentration of 0.02 g l<sup>-1</sup>). The results were read after 7 days of incubation at 28 °C (Table S1). The temperature range for growth was determined by incubating cultures in YMA at 4, 15, 28, 37 and 45 °C. The pH range for growth was determined in the same medium with final pH 4.5, 6, 7, 8, 9 and 10. PCA buffer (0.4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.2 M citric acid) was used to adjust to pH 4 and 6, phosphate buffer (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) was used for pH 7 and 0.2 M TE buffer was used for pH 8, 9 and 10. Salt tolerance was tested in the same medium containing 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5% (w/v) NaCl. For testing the natural antibiotic resistance, the disc diffusion method on YMA was used. The discs contained the following antibiotics: ampicillin (2 µg), erythromycin (2 µg), ciprofloxacin (5 µg), penicillin (10 IU), polymyxin (300 IU), cloxacillin (1 µg), tetracycline (30 µg), gentamycin (10 µg), cefuroxime (30 µg) or neomycin (5 µg) (Becton Dickinson, BBL). The strains *B. ottawaense* HAMBI 3284<sup>T</sup> (=LMG 26739<sup>T</sup>), *B. daqingense* LMG 26137<sup>T</sup> (=CCBAU 15774<sup>T</sup>) and '*B. americanum*' CMVU44 were included in the phenotypic study as references. Phenotypic characteristics of the novel species are reported below in the species description, and the differential characteristics with respect to the most closely related species of the genus *Bradyrhizobium* are shown in Table 2.

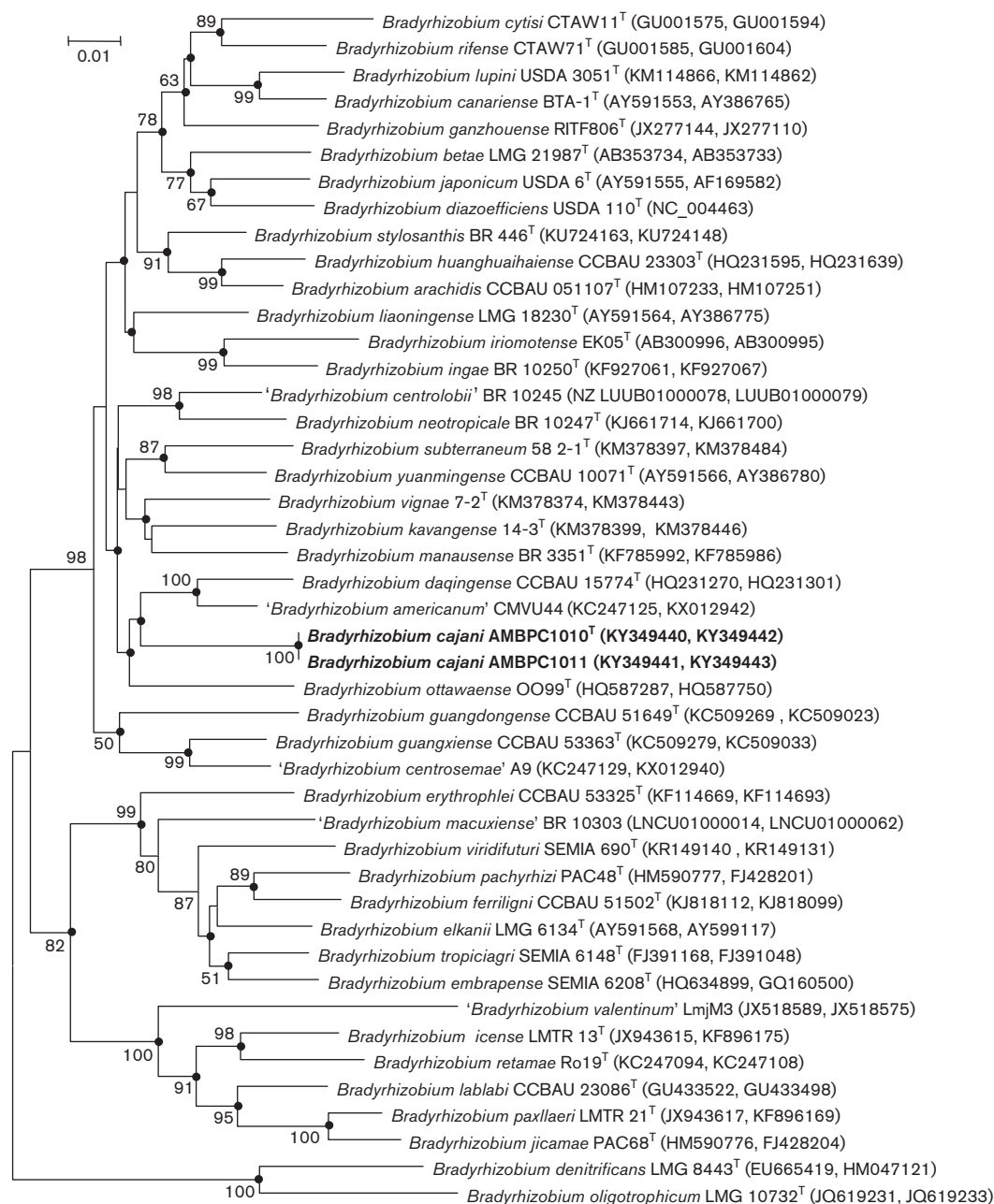
Although symbiotic genes do not offer taxonomic information because they are located in easily interchangeable elements (plasmids or symbiotic islands), in this work we analysed the symbiotic *nodC* gene, the sequence of which is available for most species of the genus *Bradyrhizobium* allowing differentiation at the symbiovar level [31]. The phylogenetic analysis of this gene placed the newly isolated strains into a cluster containing the type strain of *Bradyrhizobium arachidis* isolated in Asia from nodules of *Arachis hypogaea* [32] (96.5% similarity) and those of *Bradyrhizobium kavangense* [33] and *Bradyrhizobium vignae* [34] isolated in Africa from nodules of members of the genus *Vigna* (92.8 and 92.6% similarity, respectively) (Fig. S2). Nodulation assays on *C. cajan* showed that both strains AMBPC1010<sup>T</sup> and AMBPC1011 formed effective nodules on this legume.

Based on their phenotypic and genotypic characteristics, we propose to classify the strains isolated from *C. cajan* nodules into a novel species named *Bradyrhizobium cajani* sp. nov.



**Fig. 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (1230 positions) showing the relationships among *B. cajani* sp. nov. AMBPC1010<sup>T</sup> and closely related species of the genus *Bradyrhizobium*. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value (as percentage) calculated for 1000 subsets (only values greater than 50 % are indicated). Bar, 1 substitution per 100 nucleotide positions. Nodes marked with filled circles were also obtained with the maximum-likelihood algorithm.





**Fig. 2.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial concatenated sequences of *recA* and *glnII* genes (in this order and with a total of 940 positions) showing the relationships among the strains of *B. cajani* sp. nov. and related species of the genus *Bradyrhizobium*. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value (as percentage) calculated for 1000 subsets (only values greater than 50 % are indicated). Bar, 1 substitutions per 100 nucleotide positions. Nodes marked with filled circles were also obtained with the maximum-likelihood algorithm.

## DESCRIPTION OF *BRADYRHIZOBIUM CAJANI* SP. NOV.

*Bradyrhizobium cajani* (ca.ja'ni. N.L. gen. n. *cajani* of *Cajanus*, referring to the isolation source of the strain, nodules of *Cajanus*).

Aerobic Gram-stain-negative rods. Colonies are small and pearl-white-coloured in YMA at 28 °C, which is the optimal growth temperature. The optimal pH for growth is pH 7–7.5. Growth is obtained in a temperature range from 15 to 37 °C and at pH 5 to 9. Does not grow in the presence of 1 % (w/v) NaCl. Nitrate reduction is positive. Hydrolysis of urea

**Table 1.** Cellular fatty acid composition of *B. cajani* sp. nov. strains and representative strains of related species from the genus *Bradyrhizobium*

Strains: 1, *B. cajani* sp. nov. AMBPC1010<sup>T</sup>; 2, *B. cajani* sp. nov. AMBPC1011; 3, *B. ottawaense* HAMB1 3284<sup>T</sup>; 4, '*B. americanum*' CMVU44; 5, *B. daqingense* LMG 26137<sup>T</sup>. Fatty acids present in amounts lower than 1 % are not shown. ND, Not detected. Data are from this study.

Fatty acid	1	2	3	4	5
C <sub>16:0</sub>	11.4	12.5	14.3	11.9	12.9
C <sub>17:0</sub>	ND	ND	ND	1.4	0.9
C <sub>18:0</sub>	2.0	1.6	1.0	1.7	2.0
anteiso-C <sub>17:0</sub>	ND	ND	ND	1.2	ND
iso-C <sub>19:0</sub> I	ND	ND	ND	ND	1.5
C <sub>16:1</sub> ω5c	1.3	1.1	1.9	2.9	2.5
C <sub>18:1</sub> ω5c	1.0	ND	ND	ND	ND
Summed feature 3 (C <sub>16:1</sub> ω7c/C <sub>16:1</sub> ω6c)	0.4	ND	1.4	ND	ND
Summed feature 8 (C <sub>18:1</sub> ω7c/C <sub>18:1</sub> ω6c)	83.4	84.8	82.5	78.2	80.2
C <sub>18:1</sub> ω7c 11-methyl	0.6	ND	ND	ND	2.3
C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c	ND	ND	ND	1.9	ND

and aesculin is positive. Production of β-galactosidase is weakly positive. Production of indole, arginine dehydrolase and gelatinase is negative. Fermentation of glucose is negative. Glucose, mannose, mannitol, *N*-acetylglucosamine,

**Table 2.** Differential phenotypic characteristics of *B. cajani* sp. nov. strains and representative strains of related species from the genus *Bradyrhizobium*

Strains: 1, *B. cajani* sp. nov. AMBPC1010<sup>T</sup>; 2, *B. cajani* sp. nov. AMBPC1011; 3, *B. ottawaense* HAMB1 3284<sup>T</sup>; 4, '*B. americanum*' CCMVU44; 5, *B. daqingense* LMG 26137<sup>T</sup>. +, Positive reaction; −, negative reaction; w, weakly positive reaction. Data are from this study.

Characteristic	1	2	3	4	5
Growth at/with:					
37 °C	+	+	−	−	+
1 % NaCl	−	−	−	−	+
Nitrate reduction	+	+	−	−	+
Assimilation of:					
L-Arabinose	−	−	−	+	+
D-Ribose	+	+	−	+	+
D-Mannose	+	+	−	+	+
L-Fucose	+	+	−	+	+
<i>N</i> -Acetylglucosamine	+	+	+	−	−
Gluconate	−	−	+	+	+
Caprate	−	−	+	−	−
Adipate	+	+	−	w	+
Malate	+	+	+	−	+
Citrate	+	+	w	−	−
Phenylacetate	+	+	w	−	−
2-Ketogluconate	+	+	−	−	w
4-Hydroxybenzoate	+	−	w	+	−
Resistance to:					
Ciprofloxacin	−	+	−	+	+
Erythromycin	−	−	+	+	+
Cefuroxime	+	+	−	−	−

malate, adipate, citrate and phenylacetate are assimilated in the API 20NE system. The assimilation of L-arabinose, gluconate and caproate is negative. In the API 32GN system, the assimilation of L-rhamnose, *N*-acetylglucosamine, D-ribose, suberate, 2- and 5-ketogluconate, glycogen, mannitol, glucose, L-fucose and L-proline is positive. The assimilation of inositol, sucrose, itaconate, malonate, acetate, L-alanine, 3-hydroxybenzoate, L-serine, salicin, melibiose, L-sorbose, L-arabinose, propionate, caprate and 3-hydroxybutyrate is negative. The assimilation of 4-hydroxybenzoate is variable with positive result for the type strain. The assimilation of maltose, D,L-lactate, valerate, citrate and L-histidine is weakly positive. Sensitive to tetracycline, neomycin and gentamycin. Resistant to cefuroxime, erythromycin, penicillin, ampicillin, polymyxin B and cloxacillin. Resistance to ciprofloxacin is variable, with a negative result for the type strain.

The type strain, AMBPC1010<sup>T</sup> (=LMG 29967<sup>T</sup>=CECT 9227<sup>T</sup>), was isolated from a nodule of *Cajanus cajan* in the Dominican Republic and forms effective nodules in this legume. The DNA G+C content of the strain is 62.7 mol%.

#### Funding information

This work has been financially supported by the grants FONDOCYT 2008–2-D1-064 and 2012–2C1-69 (Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología, MESCYT, Dominican Republic) and A1/035364/11 (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, AECID). J.A. was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF, Dominican Republic) and by Universidad de León (Spain). J.D.F.F. is supported by a fellowship of the Universidad de Salamanca (Spain).

#### Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

1. Kuykendall LD. Genus I. *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137<sup>VP</sup>. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, The Proteobacteria, Part C*, 2nd ed, vol 2. 2005. New York: Springer. pp. 438–443.

2. Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS et al. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4424–4433.
3. Helene LC, Delamuta JR, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA et al. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4441–4448.
4. Delamuta JR, Ribeiro RA, Araújo JL, Rouws LF, Zilli JÉ et al. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:3078–3087.
5. Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Chahboune R, Toro M, Velázquez E et al. *Bradyrhizobium centrosemæ* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropici*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Syst Appl Microbiol* 2016;39:378–383.
6. Appunu C, Sasirekha N, Prabavathy VR, Nair S. A significant proportion of indigenous rhizobia from India associated with soybean (*Glycine max* L.) distinctly belong to *Bradyrhizobium* and *Ensifer* genera. *Biol Fertil Soils* 2009;46:57–63.
7. Ramsabhag A, Umaharan P, Donawa A. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L Millsp) nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* 2002;216:139–144.
8. Araujo J, Díaz-Alcántara C-A, Velázquez E, Urbano B, González-Andrés F. *Bradyrhizobium yuanmingense* related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization. *Sci Hortic* 2015;192:421–428.
9. Vincent JM. The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In: Vincent JM (editor). *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1970. pp. 1–13.
10. Rivas R, Peix A, Mateos PF, Trujillo ME, Martínez-Molina E et al. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* 2006;287: 23–33.
11. Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:181–187.
12. Vinuesa P, Rojas-Jiménez K, Contreras-Moreira B, Mahna SK, Prasad BN et al. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6987–6996.
13. Velázquez E, Valverde A, Rivas R, Gomis V, Peix A et al. Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2010;97:363–376.
14. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–410.
15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–4882.
16. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
17. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
18. Rogers JS, Swofford DL. A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Syst Biol* 1998;47:77–89.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–2739.
20. Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-Deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 1989;39:224–229.
21. Willems A, Doignon-Bourcier F, Goris J, Coopman R, de Lajudie P et al. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:1315–1322.
22. Wayne LG, Moore WEC, Stackebrandt E, Kandler O, Colwell RR et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 1987;37:463–464.
23. Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45:240–245.
24. Mandel M, Mamur J. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol* 1968;12B:195–206.
25. Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN et al. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamæ* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;59:1929–1934.
26. Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF et al. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:616–624.
27. Sasser M. *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids*, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc 1990.
28. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Alonso de La Vega P, Rivas R et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:1213–1219.
29. Chahboune R, Carro L, Peix A, Barriaj S, Velázquez E et al. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;61:2922–2927.
30. Guerrouj K, Ruiz-Díez B, Chahboune R, Ramírez-Bahena MH, Abdelmoumen H et al. Definition of a novel symbiovar (*sv. retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst Appl Microbiol* 2013; 36:218–223.
31. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ. Bacterial associations with legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci* 2015;34:17–42.
32. Wang R, Chang YL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX et al. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst Appl Microbiol* 2013;36: 101–105.
33. Lasse Grönemeyer J, Hurek T, Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4886–4894.
34. Grönemeyer JL, Hurek T, Bünger W, Reinhold-Hurek B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:62–69.

3.5. Texto completo artículo 3. (Araujo *et al.* 2020a)

European Journal of Agronomy 113 (2020) 125985



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Agronomy

 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eja](http://www.elsevier.com/locate/eja)


## Inoculation with native *Bradyrhizobium* strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)

 Juan Araujo<sup>a</sup>, César-Antonio Díaz-Alcántara<sup>a</sup>, Beatriz Urbano<sup>b</sup>, Fernando González-Andrés<sup>c,\*</sup>
<sup>a</sup> Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, Universidad Autónoma de Santo Domingo, Dominican Republic

<sup>b</sup> Department of Agricultural and Forestry Engineering, Universidad de Valladolid, Spain

<sup>c</sup> Institute of Environment, Natural Resources and Biodiversity, Universidad de León, Spain

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Inoculant  
 Biochar  
 Carrier  
 Field trial  
*Bradyrhizobium*  
 Legume

## ABSTRACT

Pigeonpea (*Cajanus cajan*) originated in India and is now a major source of protein in countries in tropical and subtropical regions worldwide. However, little is known about the effect on crop yields of inoculation with appropriate rhizobia strains. The objective of this study was to explore the possibility of improving pigeonpea yields in the Caribbean region, by inoculating with selected N-fixing symbionts. To achieve the study objective, we selected three elite strains of the genus *Bradyrhizobium* isolated from root nodules of pigeonpea in the Dominican Republic, we formulated them using innovative carriers, and finally we tested the formulated inoculant on eight farms located in the Dominican Republic. Three different carriers (sewage sludge, pine bark biochar and poultry litter) plus perlite as control were tested for the formulation. The first step was to test bacterial survival in the different carriers at different times up to one year (shelf-life). Pine bark biochar and the control resulted in the best shelf-life and were selected for the field experiment. The experimental design comprised two pigeonpea cultivars and five fertilisation strategies: Inoculation with three *Bradyrhizobium* strains without nitrogen (N) fertilisation, plus two non-inoculated controls one of them fertilised with 125 and 210 kg N ha<sup>-1</sup> in non-irrigated and irrigated fields respectively. Nodule occupancy by the inoculated bacterial strain depended solely on the level of soil native nodulating bacteria and not on the bacterial strain or the carrier. Inoculation produced, on average, a significant yield increase compared to the non-inoculated non-N-fertilised control. Furthermore, the yield with the inoculated treatments did not significantly differ from the yield of the N-fertilised control. However, either inoculation or N-fertilisation were ineffective in two out of the eight fields with more than 10<sup>4</sup> nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup>, compared to the non-inoculated non-N-fertilised control. Yield was neither significantly affected by the bacterial strain nor by the cultivar-strain interaction, and therefore, the two cultivars can be considered promiscuous. Neither carrier had a significant effect on yield. Thus, inoculants based on strains of *Bradyrhizobia* isolated from the root nodules of pigeonpea, formulated with pine bark biochar or perlite as carrier, are recommended as a good strategy to ensure food security in tropical agroecosystems with pigeonpea.

## 1. Introduction

Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) is a sub-tropical and tropical legume that originated in the northern region of the Indian sub-continent, spreading to East Africa at least 4000 years BCE, and then to Southeast Asia, West Africa, Latin America and the Caribbean (Khoury *et al.*, 2015). It is cultivated in those geographical areas as a multi-purpose legume (Upadhyaya *et al.*, 2015). In 2016, almost 5.5 million hectares of the crop were cultivated worldwide (FAOSTAT, 2018). In India, its centre of origin, pigeonpea accounts for 12.9 % of the hectare cultivated with pulse legumes. In Southeastern Asia the

percentage is very similar, whereas in Eastern Africa pigeonpea represents 7.6 % of the land cultivated with pulses. However, it is in the Caribbean region where pigeonpea shows a relatively higher importance in terms of cultivated area, with 28.8 % of the total area of pulses (FAOSTAT, 2018).

Pigeonpea grains have a high protein content (up to 31 %) and they can be consumed as dried peas, green peas or flour (van der Maesen, 2006). They are a major source of protein for resource-poor farmers in developing countries of tropical and subtropical regions (van der Maesen, 2006). Unfortunately, the natural nodulation of *Cajanus cajan* is frequently poor or erratic and, therefore, biological nitrogen fixation

\* Corresponding author at: Institute of Environment, Natural Resources and Biodiversity, Av. de Portugal, 41, E-24009 Leon, Spain.  
 E-mail address: [fgona@unileon.es](mailto:fgona@unileon.es) (F. González-Andrés).

<https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125985>

Received 15 February 2019; Received in revised form 13 November 2019; Accepted 14 November 2019  
 1161-0301/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

(BNF) is insufficient to assure an appropriate yield (Araujo et al., 2015), even in the crop's centres of origin and diversity (Khurana and Dudeja, 1981; Sanginga et al., 1996). For this reason, it is crucial to improve BNF of the crop (Mula and Saxena, 2010; Varshney et al., 2012; Araujo et al., 2015) and, in particular, because *Cajanus cajan* has high BNF potential, as was exemplified by España et al. (2006), using N<sup>15</sup> technology, who found that the crop N derived from BNF can be as high as 79 %. Moreover, Anderson et al. (2001) estimated that the N fixed by the crop can range from 20 to 140 kg ha<sup>-1</sup>. On the other hand, crop residues such as leaves and nodules are an important source of organic matter for the soil, adding as much as 4000 kg ha<sup>-1</sup> to the soil (Kumar Rao et al., 1981).

The chief strategy for improving BNF is by inoculation with effective nitrogen (N) fixing bacterial strains, which is a low cost strategy compared with N mineral fertiliser application (Mulas et al., 2013). However, in the case of pigeonpea, a lack of response to inoculation with specific strains has been reported (Sharma et al., 2017). The lack of response in this crop could be due to: i) the use of inadequate symbionts; or ii) environmental factors, including competition from other native rhizobia in the soil, which has been demonstrated in several studies by Rufini et al. (2016). Nevertheless, the reasons for this lack of response have been insufficiently researched.

Autochthonous symbionts have been isolated from pigeonpea root nodules in the Dominican Republic (Araujo et al., 2015, 2017), Côte d'Ivoire (Fossou et al., 2016) and Ethiopia (Wolde-Meskel et al., 2005). Only a few of these (Araujo et al., 2015) have been tested as inoculants for the crop. Some commercial inoculants are recommended for pigeonpea in countries such as India (Sharma et al., 2017; Arora et al., 2018) and Brazil (Menna et al., 2006; Guimarães et al., 2016), although the strains recommended for pigeonpea were frequently isolated from a different crop, for example *Vigna unguiculata* (Guimarães et al., 2016; Rufini et al., 2016) or *Crotalaria* (Menna et al., 2006). The effects of such inoculants have been erratic. Surprisingly, the development of inoculants based on native nodulating strains isolated from the same crop has been insufficiently researched, even though these have been demonstrated to be the most effective option (Mulas et al., 2013).

The main bottleneck for the development of commercial inoculants is the lack of public know-how concerning their formulation, as a consequence of the scarce public research on this topic (Bashan et al., 2014). Conversely, there is an increasing information available concerning new isolates which have potential use as inoculants (Schütz et al., 2018), but only a few studies have focused on delivery systems and insight into this aspect is needed. The use of pre-inoculated seeds is the most convenient delivery system for legume inoculants, but while the bacterial strains survive well in inoculant formulations, many strains die rapidly after seed coating and drying (Atieno et al., 2018). For that reason, the shelf-life of pre-inoculated seeds rarely exceeds three weeks at the most; this is worse in tropical or subtropical regions due to climatic conditions. Therefore, many commercial products require the inoculant formulation to be mixed with the seeds by the farmer immediately before sowing. The most widespread formulation of inoculant consists of peat as the carrier for the bacteria, plus other additives (Bashan et al., 2014; Atieno et al., 2018). Nevertheless, several alternatives to peat are being researched (Albareda et al., 2008) because of the lack of natural peat deposits in several countries and the location of peat-mines in preserved areas (Albareda et al., 2008; Ben Rebah et al., 2007). Biochar, known as a soil amendment which improves fertility (Lehmann et al., 2011), has also been proposed as an alternative carrier for rhizobial (Khavazi et al., 2007; Egamberdieva et al., 2017) or non-rhizobial (Hale et al., 2014, 2015; Sun et al., 2016) inoculants, with good survival results in the inoculant. However, biochar-based inoculants have not been tested on a field scale, only in controlled environments, and more applied research is needed before recommending this carrier for inoculants in the future.

Due to the importance of pigeonpea in Caribbean agroecosystems, and based on our previous background information about the isolation

of microorganisms which nodulate pigeonpea in the Dominican Republic (Araujo et al., 2015, 2017), where the area cultivated with the crop is 31 % of total pulses (FAOSTAT, 2018), the objective of this study was to explore the possibility of improving the yield of pigeonpea in the agroecosystems of the Caribbean region, by inoculating with adequate rhizobial symbionts. The specific objectives were: i) To develop an inoculant based on autochthonous elite strains and novel carriers; ii) to investigate the intrinsic factors influencing the success of the developed inoculant, such as the bacteria strain and the formulation; and iii) to test the inoculant at eight different farms located in the Dominican Republic, which are representative of the pigeonpea production agroecosystems in the Caribbean region.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The *Cajanus cajan* cultivars used for the experiment were "Arroyo Loro" and "IDIAF Primor". The "Arroyo Loro" cultivar was obtained at the *Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales* (IDIAF, Dominican Republic) by crossing the cultivars "UASD" and "IDIAF Navideño". These two cultivars were selections from Dominican landraces developed at the *Universidad Autónoma de Santo Domingo* (UASD) and IDIAF, respectively. "Arroyo Loro" is a photoperiod-insensitive and mid-term cultivar which starts flowering 100–110 days after emergence and has an average canopy height of 1.6 m (Oviedo et al., 2013). The "IDIAF Primor" cultivar was developed at IDIAF from ancestors of Indian origin. It is a dwarf and early cultivar (starts flowering 75–85 days after emergence), photoperiod-insensitive and has a canopy height of 0.80–1.20 m (Cedano, 2006).

### 2.2. Bradyrhizobium strains used in this study

Three strains were isolated from pigeonpea crops in farmlands located North-West of Azua province (Dominican Republic) (Araujo et al., 2015; Díaz-Alcántara et al., 2015): AMBPC1010 and AMBPC1040 at 18°43' 52" N; 70°53'03" W; 1148 m a.s.l., and ALSPC3051 at 18°43' 51" N; 70°56'43" W; 669 m a.s.l. The mentioned strains were selected for this study on the basis of their N-fixation efficiency in hydroponic conditions (Díaz-Alcántara et al., 2015). The strain ALSPC3051 had previously been tested by Araujo et al. (2015) in small-scale field trials and provided good results compared to an N-fertilised control which received 154 kg N ha<sup>-1</sup>. Therefore, it was used in this study as the reference strain. Assessment of the shelf-life of the bacteria in the carrier, the bacterial survival on the seed coat and the extent of nodulation five weeks after emergence of plants in the field trial, were performed using two out of the three *Bradyrhizobium* strains, namely ALSPC3051 and AMBPC1040. The criterion for selection of the two strains was to belong to different groups in the phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene: ALSPC3051 belonged to group I and AMBPC1040 belonged to group II (Supplementary material 2, Figure S.M. 2). However, as AMBPC1010 belonged also to group I, it was not included in the mentioned analysis. Conversely, for the yield assessment in the field trials, the three strains were used.

### 2.3. Sequencing of 16S rRNA gene

The 16S rRNA gene sequences of strains ALSPC3051 and AMBPC1010 had previously been obtained (Araujo et al., 2015, 2017), while that of the strain AMBPC1040 was obtained in the present study. Amplification of the 16S rRNA gene of the strain AMBPC1040 was performed using the primers and conditions previously described by Araujo et al. (2015) and gene sequencing was performed using Macrogen (The Netherlands). The sequences obtained were compared with those from Genbank using the BLASTN programme (Altschul et al., 1990) against the type strains subset database. The sequences were

aligned using Clustal W software (Thompson et al., 1997) and the distances were calculated according to Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980). The phylogenetic trees were inferred using the neighbour-joining model (Saitou and Nei, 1987) and MEGA7 package (Kumar et al., 2016) was used for these analyses.

#### 2.4. Inoculum production and design of the inoculant formulations

For the inoculum production, the growth media was Yeast Mannitol Agar (YMA) or Yeast Mannitol Broth (YMB) (Vincent, 1970). The liquid inoculum was produced in a pilot fermenter (Sartorius BIOSTAT Bplus-MO; 5 l) at 28 °C and with 10 % dissolved oxygen for five to eight days to achieve a concentration  $> 1 \times 10^9$  cfu ml<sup>-1</sup>. Following centrifugation at 8000 g, the concentration was increased by one order of magnitude.

The carriers tested were poultry litter, biochar from pyrolysis of sewage sludge or pine bark, and perlite as the control. The biochars were prepared by slow pyrolysis in a pilot plant in a semi-continuous, electrically-heated reactor. The material to be treated was fed into the reactor through a hopper, with a system of two valves designed to ensure oxygen-free conditions for each of the partial loads. The system had an auger furnace (1400 mm in length  $\times$  290 mm inner diameter) with three electric resistances, as described by Rosas et al. (2015). The raw feedstocks used were waste products; the sewage sludge was from the wastewater treatment plant from the city of León. Chemical analysis of the carriers is presented in Table 1.

To prepare the inoculum, the carrier materials were ground, passed through a 70- $\mu$ m sieve, placed in autoclavable plastic pots (20-ml volume) and then autoclaved at 120 °C for 20 min in the case of biochar and perlite and 40 min in the case of poultry litter because of the higher microbial background. The inoculum obtained as indicated above was combined with a cell protector, consisting of locust bean gum 1 % plus trehalose 1 % (weight:volume) (unpublished data). An appropriate volume of the resultant cellular suspension was uniformly and aseptically mixed with the carrier, according to the moisture retention characteristic curves (data not shown) of each carrier. We used the moisture content that allowed a maximum volume of bacterial culture in the inoculant, but provided an adequate consistency of the final mix. The final moisture content on a wet weight basis was 51 % for perlite, 54 % for poultry litter, and 49 % and 53 % for pine bark and sewage sludge biochar, respectively. The preliminary calculations based on cell density and volume of suspensions added to the carrier produced a concentration of viable cells per g of inoculant of  $5 \times 10^9$  cfu, with small variations between samples. After preparation and without any incubation, the inoculants were immediately stored at 4–6 °C until the sampling date indicated in section 2.5

#### 2.5. Determination of the shelf life of the inoculant

For this experiment, we chose two out of the three bacterial strains namely ALSPC3051 and AMBPC1040, according to the criterion described in section 2.2. The survival of each strain was assessed for each formulation at different time intervals (0, 15, 30, 60, 90, 180, 270 and 365 days after inoculum preparation). At each sampling date, three samples for each formulation were fully used for the inoculum survival

**Table 1**

Chemical characteristics of the two biochar, the poultry litter and the perlite carriers.

Material	%C	%N	C:N ratio	pH	EC (dS m <sup>-1</sup> )
Pine bark biochar	74.51	0.66	113	7.2	0.10
Sewage sludge biochar	26.93	3.02	8.9	8.3	3.01
Poultry litter	53.20	9.15	5.8	6.5	9.76
Perlite	N/A	N/A	N/A	7.1	0.01

N/A: Not Applicable.

analysis, which means that the number of samples per strain was 24, as at each sampling date three samples were completely destroyed. Viable bacteria were estimated by plating 10-fold serial dilutions on YMA plates supplemented with Congo red. Platings were conducted in duplicate for each sample. The mean values of the viable number of rhizobia per g of moist inoculant were then calculated for the different times and plotted on a logarithmic scale. One-way ANOVA was used to analyse the effect of the carrier in the bacterial survival for each strain, at each sampling date, and Tukey test was used for post-hoc means comparisons. Levene's test was used to check for the variances homogeneity required by the ANOVA. Moreover, in order to ascertain if there were differences in the overall survival behaviour between the two strains, a Student's *t*-test was carried out to compare the mean survival data of the two strains, in all the sampling dates and in all the carriers.

#### 2.6. Determination of bacterial survival in the seed coat, after the seed inoculation

Bacterial survival on the seed coat of the inoculated seeds was assessed for the formulations with perlite and pine bark biochar, at different time intervals (3, 6, 9, 12 and 15 days after coating). Three seed lots of the pigeonpea cultivar "IDIAF primor" were coated with each formulation. Each seed lot was considered a replica. For seed coating of each lot, 500 g of superficially disinfected seeds were mixed with 10 g (2 % by weight) of the inoculant plus 5 ml of arabic gum solution (1 % volume:weight) as binder. The arabic gum solution was prepared at a concentration of 40 % arabic gum in sterile distilled water. The purpose of seed disinfection was to enable easier counting of the viable rhizobia. The inoculated seeds were allowed to dry for 1 h at room temperature and then stored inside autoclave-sterilised paper bags at 20 °C  $\pm$  3 °C. The theoretical starting population was approximately  $10^7$  cfu seed<sup>-1</sup>.

The bacterial survival on the seed coat for each seed lot at each sampling date was assessed transferring 30 random seeds to 100 ml of 0.85 % NaCl solution. Then the count was made plating 10-fold serial dilutions on YMA plates supplemented with Congo red. Plating was conducted in duplicate for each 10-fold dilution. The mean values of the viable number of rhizobia per seed were then calculated for the different time intervals and plotted on a logarithmic scale. To compare the effect of the two carriers on bacterial survival at each sampling date, a Student's *t*-test was used.

#### 2.7. Field experiment

##### 2.7.1. Experimental design

Eight experimental environments were established in 2016 in commercial fields located in the Eastern and Southern areas of the San Juan de la Maguana province (Dominican Republic). These areas, together with the adjacent North-West area of Azua province, are the most important regions of legume production in the Dominican Republic, mainly pigeonpea and common beans. The coordinates of each field, as well as the Edapho-climatic conditions of the experimental fields, are shown in Supplementary material 1 (Table S.M.1). This also provides information on the sowing date and the date of the last harvest for each field. The numbers of nodulating bacteria estimated by the most probable number (MPN) method (Beck et al., 1993) in each of the eight fields, as well as the previous crop, are presented in Table 2.

The experimental design for each of the eight environments followed a statistical pattern of subdivided plots (split-split plots) with three replicates, in randomised complete blocks and with three factors. The main factor was the cultivar of *Cajanus cajan* with two alternatives, "Arroyo Loro" and "IDIAF primor". The secondary factor was the fertilisation strategy with the following five options: i) inoculation with AMBPC1010 and non-N-fertilised; ii) inoculation with ALSPC3051 and non-N-fertilised; iii) inoculation with AMBPC1040 and non-N-fertilised; iv) non-inoculated and N-fertilised control (details on the amount of N

**Table 2**  
Characteristics of the farms used for the field trial, including the most probable number (MPN) of nodulating bacteria  $\text{g soil}^{-1}$ .

Location	Irrigated (I)/ non-irrigated (NI)	Preceding crop	Nodulating bacteria*	
			Total no. of nodulated plants	MPN nodulating bacteria/ g of soil
Arroyo Loro-1	I	Cassava	10	$5.8 \times 10^2$
Arroyo Loro-2	NI	Common bean	11	$1 \times 10^3$
Santomé	I	Papaya	17	$3.1 \times 10^4$
Aromal	I	Pigeonpea	4	$1.7 \times 10^1$
Wilson	I	Common bean	6	$5.8 \times 10^1$
Hato Viejo	NI	Cassava	16	$1.7 \times 10^4$
Managuayabo-1	I	Pigeonpea	5	$3.1 \times 10^1$
Managuayabo-2	NI	Common bean	4	$1.7 \times 10^1$

\*Total no. of nodulated plants is for each experiment consisted of 4 replicates per dilution and six dilution steps; decimal dilutions started from  $10^1$ .

provided are in section 2.7.2); and v) non-inoculated and non-N-fertilised control. The tertiary factor was the inoculant formulation involving two different carriers, either pine bark biochar or perlite. The other two carriers were discarded after the shelf-life assessment.

Prior to sowing of seeds, the appropriate quantity of seeds were mixed with 2 % by weight of the inoculant, plus 1 % (volume:weight) of arabic gum solution as binder. Seeds were dried in the shade and then sown by the conventional procedure.

The experimental unit was a  $49 \text{ m}^2$  ( $7 \times 7$ ) plot, with rows 1 m apart and a space between plants of 1 m, and 7 rows and 49 plants per plot. One seed was dropped in each hole. The experimental units were spaced 2 m apart to prevent spread of the inoculated bacteria in the soil water, as well as to prevent interference between the two cultivars due to different canopy heights.

### 2.7.2. Agronomic practices

Before establishing the experiment, the corresponding plot was fertilised with phosphorus (P) and potassium (K), taking into account the soil texture, the soil content of P and K, respectively, and for P, the soil pH, and in accordance with the study of Silva Guzmán et al. (2009) of *Cajanus cajan* in the Dominican Republic and the general considerations of Urbano (2008). The fertiliser application rates were calculated for theoretical yields of  $2.5 \text{ t ha}^{-1}$  in non-irrigated fields and  $4 \text{ t ha}^{-1}$  in irrigated fields (Table 2 and Supplementary material 1 (Table S.M.1)). Hence the P rates, expressed as  $\text{kg P ha}^{-1}$ , were as follows: Arroyo Loro-1 and Wilson (57); Hato Viejo (51); Santomé and Managuayabo-1 (47); Arroyo Loro-2 (45); Aromal (15); and Managuayabo-2 (10). All applications were as triple superphosphate (46 %  $\text{P}_2\text{O}_5$ , that is 20 % P). With regard to K, Arroyo Loro-1, Arroyo Loro-2, Santomé, Aromal, Wilson and Managuayabo 1 had no fertiliser applied because of high soil K content, whereas Hato Viejo and Managuayabo-2 received the equivalent of  $27 \text{ kg K ha}^{-1}$  as KCl (60 %  $\text{K}_2\text{O}$ , that is 50 % K).

In the irrigated fields, the non-inoculated N-fertilised control plot received  $210 \text{ kg N ha}^{-1}$  and in the non-irrigated fields,  $125 \text{ kg N ha}^{-1}$ , which corresponds to the expected total N extraction (Urbano, 2008 and Silva Guzmán et al., 2009). N fertiliser was applied as ammonium nitrate (27 % N). Half of this amount was applied five days before sowing and half at the beginning of flowering. The non-inoculated non-N-fertilised controls and the inoculated treatments did not receive any dose of N.

The irrigated fields were irrigated when necessary, according to the soil moisture content at the time and depending on the water availability; the irrigation system was a “furrow irrigation system” which is traditionally used by farmers in the region. The soil was kept free from weeds by mechanical systems. Six insecticide treatments were carried out during the growing season, using the following products at specified days after sowing (DAS): Imidacloprid (20 DAS); Cypermethrin (45 DAS and again at 140 DAS); Lambda-cyhalothrin (70 DAS); Thymetoxam (100 DAS); and Imidacloprid + Cypermethrin (130 DAS).

### 2.7.3. Sampling to assess nodulation five weeks after the emergence of the plants

The objective of this sampling was to investigate the effect of the strain and the carrier on the nodulation, while controlling the variation of the results per three different levels of soil native nodulating bacteria, which acted as a covariate. For this purpose, we selected three out of the eight farms. The criteria for selecting the farms were: i) to have soil with physical-chemical characteristics that were as similar as possible; and ii) to have different levels of native bacteria able to nodulate the crop. The final selection was as follows: Managuayabo-1 with  $3.1 \times 10^1$  nodulating bacteria per g of soil represented the fields with less than  $10^2$  bacteria per g of soil; Arroyo Loro-1 ( $5.8 \times 10^2$ ) represented the fields with between  $10^2$  and  $10^3$  nodulating bacteria per g soil; and Santomé ( $3.1 \times 10^4$ ) represented the fields with more than  $10^4$  nodulating bacteria per g of soil. Moreover, for this analysis we selected the cultivar “IDIAF Primor” and two out of the three strains, namely ALSPC3051 and AMBPC1040. The reasons for the selection of the strains ALSPC3051 and AMBPC1040 have been described in Section 2.2. Finally, the two carriers were included in the nodulation assessment. Thus, five central plants from the second row of each block of the four following treatments, were collected for inoculation assessment in “IDIAF primor”, five weeks after the emergence of the plants: i) inoculated with ALSPC3051 formulated with biochar; ii) the same but formulated with perlite; iii) inoculated with AMBPC1040 and formulated with biochar; and iv) the same but formulated with perlite. The following parameters were evaluated: number of nodules per plant; dry biomass of nodules (mg); and nodule occupancy by the inoculated strain (%).

To determine nodule occupancy by the inoculated strain, five random effective nodules from the upper 30 % part of the root were collected from each of the five plants (25 nodules per each block of each treatment). Each nodule was retrieved by cutting the root at a distance of approximately 5 mm on either side of the nodule, and superficially disinfected (10 s in 95 % ethanol, 2 min in 5 % bleach, and rinsed four times in sterile water). The nodules were then detached from the root fragments. Each nodule was crushed aseptically and a loop was used to spread the bacterial content onto a single YMA plate. The YMA plates were incubated at  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  for six to nine days. A single colony was randomly chosen, sub-cultured to ensure purity and then compared with the inoculated strain. The molecular fingerprinting profile was used to compare the strains. For fingerprinting analysis, the bacterial DNA was isolated according to Álvarez-Martínez et al. (2009) and used to obtain the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) patterns (which are strain dependent) following the procedure described by Rivas et al. (2006) and using primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') (2 mM final concentration) purchased from ISOGEN and Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR conditions were as follows: preheating at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min, 40 cycles of denaturing at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min, annealing at  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min and extension at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min, and a final extension at  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min. Seventeen microlitres of each PCR product were used in electrophoresis on a 1.5 % agarose gel

in TBE buffer (100 mM Tris, 83 mM boric acid and 1 mM EDTA; pH 8.5) at 6 V  $\text{cm}^{-1}$ , stained in a solution containing 0.5  $\text{g ml}^{-1}$  ethidium bromide, and then photographed under UV light. Standard VI (Roche, USA) was used as a size marker.

#### 2.7.4. Sampling at crop harvesting

Sampling at harvesting was carried out in the rows that remained complete after the first sampling had been conducted (five weeks after emergence of plants), leaving at least one untouched row at each edge as a border. Fifteen central plants from each experimental unit were hand-harvested at the “green-pod stage”, which is the preferred type of consumption in the Caribbean region (Singh 1995). Such harvesting was repeated once each week. The pods were shelled and the yield was recorded as the weight of the green seeds, and then corrected to absolute dry weight after drying the seeds in the oven at 80 °C to a constant weight. The fresh and dry yield of the 15 plants was referred to the corresponding 15  $\text{m}^2$ , and finally expressed as kg per ha. The following yield components were also recorded for each plant: (i) number of pods per plant; (ii) number of seeds per pod; and (iii) 1000-seeds dry weight in g. Also, the harvest index, the concentration of N in the seeds (Kjeldahl method) and the total N content of the seeds (in  $\text{kg ha}^{-1}$ ) were calculated.

#### 2.8. Statistical analysis

To analyse the data corresponding to the nodulation assessment five weeks after emergence, the level of native bacteria nodulating the crop was considered as a covariable, whereas the strain used for the inoculation (either ALSPC3051 or AMBPC1040) and the carrier used in the formulation (either pine bark biochar or perlite) were considered to be fixed effects. The percentage nodule occupancy by the inoculated strain was transformed according to the arcsine transformation in order to normalise data. Analysis of covariance (ANCOVA) was performed using the general linear model (GLM) procedure of SPSS statistics v. 21.0. To check for normality, standardised residuals were subjected to Kolmogorov-Smirnov’s test, and to check for homoscedasticity Levene’s test was used. The estimated marginal means were compared with the post-hoc Bonferroni test.

To analyse the data corresponding to the sampling at harvesting, the experimental site was considered the environment, and included in the statistical model as a random factor, along with the replicate in site as additional covariate. The pigeonpea cultivar, the fertilisation strategy and the carrier were considered to be fixed effects. Combined analysis of variance (ANOVA) appropriate to a split-split plot design was performed using the univariate procedure of SPSS statistics v. 21.0. The Tukey post-hoc test was used to compare mean values for the factor fertilisation strategy. The normality of standardised residuals was checked with Kolmogorov-Smirnov’s test and the homoscedasticity with Levene’s test. In order to meet both criteria, data were subjected to logarithmic transformation before the statistical analysis.

Moreover, we also analysed the effect of the fertilisation strategy, i.e. inoculation, non-inoculation or mineral fertilisation, in the fresh grain yield at each single farm. In this way, as the different farms have different levels of native nodulating bacteria (Table 2), it was possible to appraise if the level of resident bacteria with nodulation ability has any effect on the effectiveness (in terms of grain yield) of the inoculation or of the mineral fertilisation with N. For this purpose, we performed an independent ANOVA for each farm, considering the replicate in farm as a random factor, and the pigeonpea cultivar, the fertilisation strategy and the carrier as fixed factors. The results were presented in a graphic (Fig. 4).

### 3. Results

#### 3.1. Analysis of the 16S rRNA gene sequences

The analysis of the 16S rRNA gene of the strain AMBPC1040 showed that it belongs to the genus *Bradyrhizobium*. According to the results

obtained from the comparison with sequences held in Genbank, the 16S rRNA gene of the strain AMBPC1040 showed more than 99 % similarity with respect to the type strains of several *Bradyrhizobium* species. Our phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene (Supplementary material 2, Figure S.M. 2) confirmed that the genus *Bradyrhizobium* is divided into two main groups namely I and II, as was reported by Menna et al. (2009). The strains ALSPC3051 and AMBPC1010 included in this work but reported before, belong to two different clusters within group I. However, the AMBPC1040 strain, analysed for the first time in this study, belongs to group II (Supplementary material 2, Figure S.M. 2).

#### 3.2. Survival of *Bradyrhizobium* strains ALSPC3051 and AMBPC1040 in the inoculants (shelf-life assessment)

The survival of the two strains was assessed in the solid inoculants kept at 4–6 °C for 365 days (Fig. 1 and Table 3). The two *Bradyrhizobium* strains showed similar survival, as was demonstrated by the absence of significant differences between the mean survival data of the two strains in a Student’s *t*-test (*T*-value 0.581 for 190 degrees of freedom with a *p*-value = 0.562). However, the carriers showed different capacities for maintaining adequate survival of the bacteria. The best results were obtained for the pine bark biochar and the perlite, which was the control. The total loss of viability during the whole 365-day period was less than two logarithmic units for the two carriers and remained higher than  $10^8$  cfu per g of inoculant at the end of the period. However, the bacterial count in the formulation with pine bark biochar was significantly higher than in the formulation with perlite, for all the sampling dates except the first one, in which it was the opposite. However, for the last sampling and the strain AMBPC1040 there were no differences between the two carriers (Fig. 1 and Table 3). In contrast,

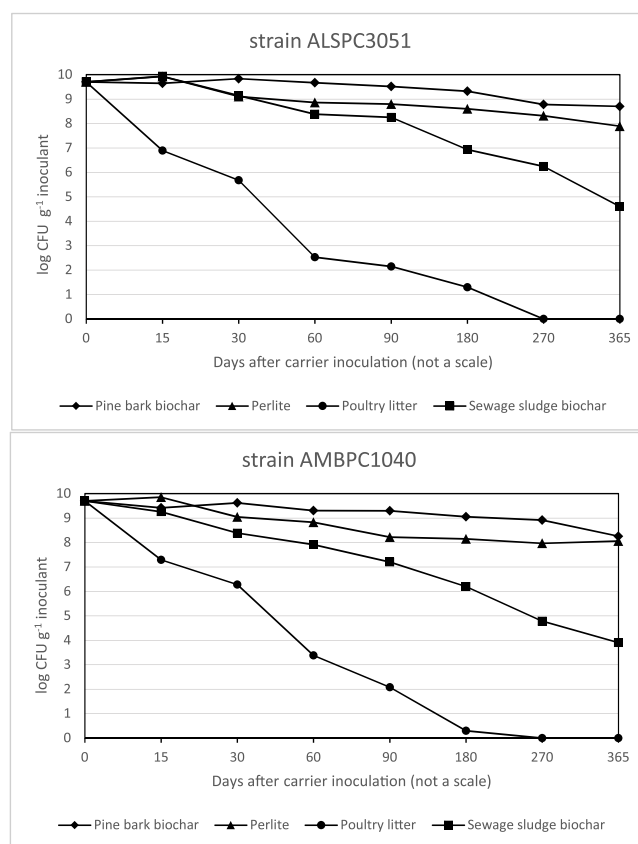


Fig. 1. Evolution in time of the survival of *Bradyrhizobium* strains ALSPC3051 and AMBPC1040 in different carrier materials at 4–6 °C. Each point represents decimal logarithmic of viable cells  $\text{g inoculant}^{-1}$  and it is the mean value of three replicates (with two independent counts per replica).



**Table 3**

Survival of *Bradyrhizobium* strains ALSPC3051 and AMBPC1040 in different carrier materials at 4–6 °C at seven different times after the carrier inoculation. The values correspond to decimal logarithmic of viable cells g inoculant<sup>-1</sup> and are the mean values of three independent replicas (with two independents counts per replica). One-way ANOVA has been performed within each line; the values followed by the same letter, within each line, are not significantly different at p < 0.05 in the Tukey test.

Strain	Days after carrier inoculation	Carrier material				F value (level of significance p ≤ 0.001 for all)
		Perlite	Pine bark biochar	Poultry litter	Sewage sludge biochar	
ALSPC3051	15	9.92 c	9.64 b	6.89 a	9.93 c	1266.665
	30	9.11 b	9.83 c	5.68 a	9.12 b	1266.665
	60	8.86 c	9.67 d	2.53 a	8.37 b	5788.217
	90	8.79 c	9.52 d	2.13 a	8.24 b	3329.850
	180	8.60 c	9.32 d	1.27 a	6.93 b	3187.053
	270	8.32 c	8.78 d	0.00 a	6.22 b	9098.381
	365	7.89 c	8.70 d	0.00 a	4.60 b	12827.331
AMBPC1040	15	9.85 d	9.41 c	7.30 a	9.25 b	980.127
	30	9.03 c	9.62 d	6.27 a	8.36 b	411.799
	60	8.82 c	9.30 d	3.37 a	7.91 b	4644.226
	90	8.22 c	9.29 d	2.07 a	7.20 b	2839.281
	180	8.14 c	9.03 d	0.26 a	6.18 b	1760.650
	270	7.97 c	8.91 d	0.00 a	4.87 b	35625.894
	365	8.07 c	8.24 c	0.00 a	3.90 b	6130.588

the poultry litter produced the worst results, significantly lower than the other three carriers for all the sampling dates. For poultry litter, the number of viable cells reached almost zero, 180 days after inoculation. Finally, sewage sludge biochar, produced intermediate counts between perlite and poultry litter, with a deep decline in the bacteria counts from 90 days onwards, reaching a bacterial count of only 10<sup>4</sup> cfu per g of inoculant at the end of the period.

In view of the results obtained, the following experiments on bacteria survival in the seed coat and the field experiment, were carried out only with the formulation based on pine bark biochar and perlite as the control.

### 3.3. Survival of *Bradyrhizobium* strains ALSPC3051 and AMBPC1040 on the pigeonpea seed coat

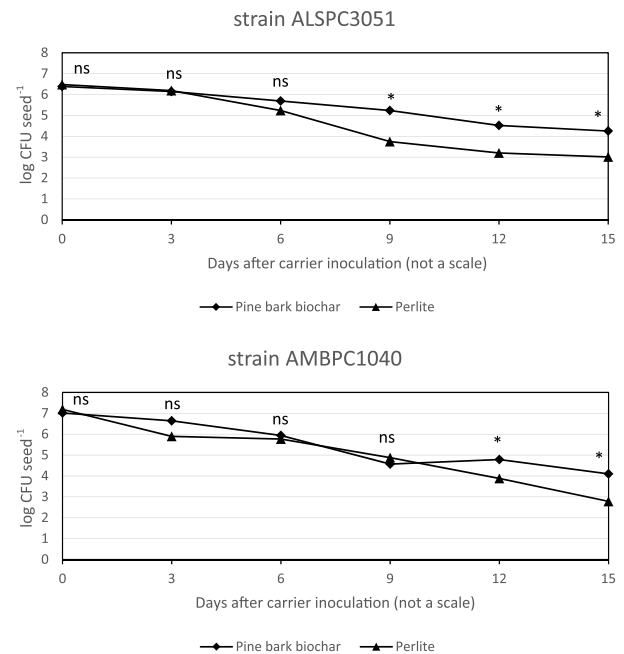
The survival of the *Bradyrhizobium* strains on the pigeonpea seed coat was evaluated from 0 to 15 days at 20 +/- 5 °C, for the formulations based on pine bark biochar and perlite (the control) (Fig. 2). Although during the first week there were no significant differences in the bacterial survival in the seed coat between the two carriers, the pine bark biochar produced significantly higher survival from the 9th day onwards in the strain ALSPC3051, and from the 12th day onwards for the strain AMBPC1040. The initial population was around 10<sup>7</sup> cfu seed<sup>-1</sup> and decreased in a continuous way, with a final viability 15 days after inoculation of around 10<sup>4</sup> cfu seed<sup>-1</sup> for the pine bark biochar carrier and 10<sup>3</sup> cfu seed<sup>-1</sup> for the perlite control.

### 3.4. Field experiment

#### 3.4.1. Nodulation parameters five weeks after the emergence of the plants

Sampling was conducted in three different fields with a different number of resident nodulating bacteria: Manoguyabo-1 (< 10<sup>2</sup> nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup>)<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> bacteria g soil<sup>-1</sup>)<sup>4</sup> bacteria g soil<sup>-1</sup>).

The ANCOVA allows to know the effect of the strain and the carrier on nodulation parameters, whilst controlling for the effect of the number of resident nodulating bacteria. The partial ETA squared showed that the covariate has a moderate effect on the number of nodules and nodules dry biomass, which is slightly larger in the nodule occupancy, whereas the independent variables had a very small effect, of less than 1.5 % (Table 4). As a consequence, the covariable (the number of native nodulating bacteria) induced significant differences in the three nodulation parameters evaluated, whereas the strain and the carrier did not produce any significant effect (Table 4). Thus, the estimated marginal means corresponding to the nodulation parameters did



**Fig. 2.** Evolution in time of the survival of *Bradyrhizobium* strains ALSPC3051 and AMBPC1040 on pigeonpea cultivar “IDIAF primor” seed coat, using pine bark biochar and perlite as carriers. Storage temperature was 20 °C (+/- 3 °C). Each point represents decimal logarithmic of viable cells seed<sup>-1</sup> and it is the mean value of three independent replicas (with two independent counts per replica). \* indicates that the mean values obtained for the two carriers at a given date, differed at a significance level of p ≤ 0.05, whereas ns indicates the absence of significant differences (Student’s t-test for homogeneous variances according to Levene’s test).

not show any significant differences due to the strain used in the inoculant, or the carrier, showing very similar values (Table 5). Moreover, there were no significant interactions between the two independent variables, strain and carrier, for any of the nodulation parameters (Table 4).

We then compared the mean values of the dependent variables for the different levels of soil native nodulating bacteria with an ANOVA test and a Tukey post-hoc (Fig. 3). The number and dry biomass of nodules were less than half in the soil containing < 10<sup>2</sup> nodulating bacteria g of soil<sup>-1</sup> (Manoguyabo-1) compared with those in the soil containing > 10<sup>4</sup> nodulating bacteria (Santomé), a big difference which

**Table 4**

ANCOVA of the data obtained in the nodulation assessment five weeks after the emergence of the plants in the field trial. Sampling was carried out on three different farms with similar soil physical-chemical characteristics, but with a different level of native nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup> (Manoguyabo-1, 3.1 × 10<sup>1</sup>; Arroyo Loro-1, 5.8 × 10<sup>2</sup>; Santomé, 3.1 × 10<sup>4</sup>). The level of soil native nodulating bacteria was considered a covariable. The strain (either ALSPC3051 or AMBPC1040, see text for explanation on the selection criteria) and the carrier (either pine bark biochar or perlite) were considered to be fixed factors. Significance level \*\*\* p ≤ 0.001.

Source of variation	DF	Number of nodules			Nodules dry biomass (mg)			Nodule occupancy by the inoculated strain (%)		
		Mean squares	F	Partial ETA squared	Mean squares	F	Partial ETA squared	Mean squares	F	Partial ETA squared
Covariable	1	840.69	28.53 ***	0.479	40.984	27.402***	0.469	2.592	56.75***	0.647
Strain	1	7.11	0.241	0.008	0.224	0.150	0.005	0.020	0.445	0.014
Carrier	1	0.81	0.027	0.001	0.101	0.067	0.002	0.011	0.238	0.008
Strain * carrier	1	0.09	0.003	< 0.001	0.036	0.024	0.001	0.043	0.949	0.056

DF: degrees of freedom.

was statistically significant. Conversely, nodule occupancy by the inoculated strain was more than three times greater in the soil containing < 10<sup>2</sup> nodulating bacteria g of soil<sup>-1</sup> (88 %) than in the soil containing > 10<sup>4</sup> nodulating bacteria (23.7 %), also a statistically significant difference (Fig. 3). The results obtained for RAPD analysis of nodule occupancy are presented in Supplementary Material 3 (Figure S.M.3).

**3.4.2. Crop evaluation at harvesting**

The pigeonpea cultivar (A) produced highly significant differences (p ≤ 0.001) in the three yield components analysed (Table 6). However, the grain yield was similar in the two cultivars; it was 3 % higher for “Arroyo Loro”, but this difference was not statistically significant (Table 7). “Arroyo Loro” had a significantly higher number of pods per plant and larger seeds (higher 1000-seed weight), whereas “IDIAF Primor” had a significantly higher number of seeds per pod. Moreover, the harvest index was significantly higher in “IDIAF primor” (p ≤ 0.05), which is a dwarf variety (Table 7).

The fertiliser strategy (B) produced highly significant differences (p ≤ 0.001) in terms of the yield, the total N content of seeds and the following yield components: pods per plant and seeds per pod; also in terms of the harvest index (p ≤ 0.05) (Table 6). From all the yield components, the number of pods per plant showed the best correlation with the yield (Pearson correlation coefficient 0.785, p < 0.01). The yield of the inoculated treatments was significantly higher than that of the non-inoculated control, between a 39 % and a 46 % higher depending on the strain (Table 7). The yield of the N-fertilised non-inoculated control was less than 2 % higher than the yield of the best inoculated treatment (AMBPC1040), and less than 7 % higher than the yield of the worst inoculated treatment (AMBPC1010), although the differences were not statistically significant.

The carrier (C) did not produce any significant differences in terms of the yield and the yield components, nor the harvest index. It only produced significant differences (p < 0.05) in the N content in seeds (g N kg seeds<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>

There was no interaction between the fertilisation strategy and the pigeonpea cultivar, which indicates that the three strains used for inoculation, performed similarly in the two pigeonpea cultivars. There

**Table 5**

Estimated marginal means, with standard error in parenthesis, obtained for the dependent variables evaluated in the nodulation assessment five weeks after the emergence of the plants in the field trial. The marginal means were obtained after ANCOVA (Table 4) considering the level of soil native nodulating bacteria a covariable, whereas the strain and the carrier were fixed factors. The estimated marginal means did not significantly differ (ns) according to the Bonferroni test.

Factors	Number of nodules		Nodules dry biomass (mg)		Nodule occupation by the inoculated strain (%)	
<b>Strain</b>						
ALSPC3051	14.5 (1.30)	ns	3.37 (0.29)	ns	62 (4.4)	ns
AMBPC1040	15.4 (1.30)		3.53 (0.29)		59 (4.4)	
<b>Carrier</b>						
Pine bark biochar	15.1 (1.30)	ns	3.40 (0.29)	ns	62 (4.4)	ns
Perlite	14.8 (1.30)		3.50 (0.29)		59 (4.4)	

was also no interaction between the carrier and the pigeonpea cultivar, or between the carrier and the fertilisation strategy. The lack of interaction between the carrier and the fertilisation strategy (Table 6) means that the three bacterial strains performed similarly in the pigeonpea crop, regardless of the carrier used.

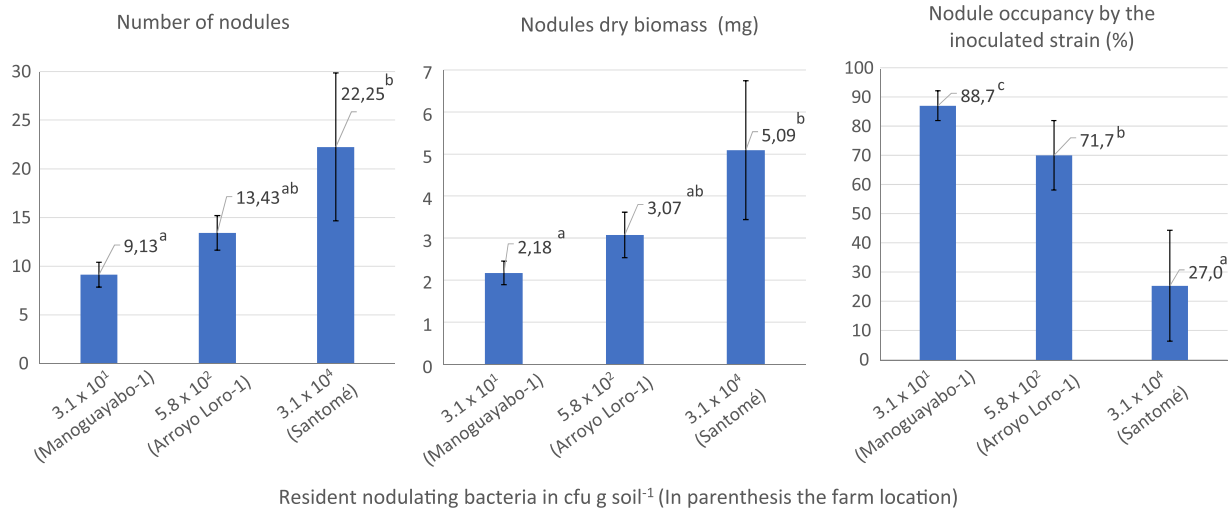
Fig. 4 provides additional information on the effect of the fertilisation strategy on the fresh grain yield on each farm separately. Such information is useful to examine the effectiveness of the inoculation or mineral N fertilisation practices, depending on the level of soil resident bacteria able to naturally nodulate the crop, because the different farms have different levels of nodulating bacteria (Table 2). Interestingly, the fertilisation strategy produced significant differences in the six farms with less than 1 × 10<sup>3</sup> cfu g soil<sup>-1</sup> but not in the two with more than 1 × 10<sup>4</sup> cfu g soil<sup>-1</sup> (Fig. 4). Metadata corresponding to the treatment x location mean values are provided in Table S.M. 4. On the other hand, in general terms, the non-irrigated fields produced lower yields (average fresh yield from 1.3 to 2.7 t ha<sup>-1</sup>) and the irrigated fields produced higher yields (from 3.0–4.6 t ha<sup>-1</sup>). The exception within the irrigated fields was Santomé (yield of 2.3 t ha<sup>-1</sup>) in which the last harvest was seriously affected by heavy rains in mid-August and this reduced the total yield (Table S.M.4).

**4. Discussion**

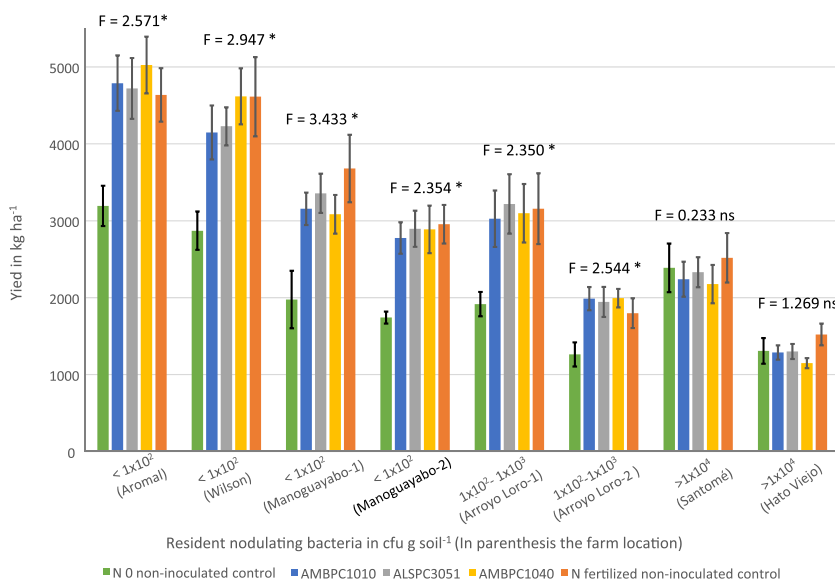
The scientific knowledge generated during the last few years enables the use of inoculants to improve crop yields and the efficiency of nutrient uptake, although to achieve in-field efficacy and thus commercial success, desired quality and stability should be achieved (Stamenković et al., 2018). The two key aspects for the development of successful inoculants on a field-scale, are the selection of the strain or the mix of strains and an adequate formulation. The present study tackles the two reported aspects in pigeonpea crops, testing the final product at field scale.

**4.1. Native strains isolated from pigeonpea root nodules and their use for the formulation of inoculants**

The nodulation of pigeonpea in the Dominican Republic is poor (Araujo et al., 2015) and the most probable number of pigeonpea



**Fig. 3.** Mean values  $\pm$  standard error bars for the parameters used to evaluate the nodulation process, in three selected farms, which have different levels of soil resident nodulating bacteria (according to the most probable number). Different letters indicate significant differences among farms (one-way ANOVA with Tukey test,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Mean values  $\pm$  standard error bars of the fresh grain yield produced by the different fertilisation strategies in eight different farms, indicating the level of soil resident nodulating bacteria (according to the most probable number) in each soil. The F-value corresponds to the ANOVA performed inside each farm for the factor fertilisation strategy, considering the replicate in farm as a random factor, and the pigeonpea cultivar, the fertilisation strategy and the carrier as fixed factors (ns not significant; \* significant for  $p \leq 0.05$ ).

nodulating bacteria was less than  $10^2$  bacteria  $g\ soil^{-1}$  in half of the eight fields sampled (Table 2). In spite of this in a previous study, Araujo et al. (2015) created a genetically-diverse rhizobia collection

from pigeonpea root nodules, showing a great range of N-fixing effectiveness. From such a collection, the three more effective strains in hydroponic conditions (Araujo et al., 2015; Díaz-Alcántara et al., 2015

**Table 6**

F values and significance level corresponding to the ANOVA for the dependent variables evaluated at harvesting in the field trial. The site (8 different sites) and replicate in site (3 replicas) were considered the environment and analysed as random factor. The factors pigeonpea cultivar (A), fertilisation strategy (B) and carrier (C) were considered to be fixed factors. Significance level \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*  $0.001 < p \leq 0.01$ ; \*  $0.01 < p \leq 0.05$

Source of variation	DF	Pods per plant	Seeds per pod	1000-seed weight (g)	Fresh yield (kg $ha^{-1}$ )	Yield in dry matter (kg $ha^{-1}$ )	Harvest index	N in seeds (Kjeldahl) (g N kg seeds $^{-1}$ )	Total N content in seeds (kg N $ha^{-1}$ )
Analysis of the first factor (pigeonpea cultivar)									
A (pigeonpea cultivar)	1	36.793***	73.370***	21.687***	0.147	0.148	11.725*	0.442	0.002
Analysis of the second factor (fertilisation strategy)									
B (fertilisation strategy)	3	10.669***	10.993***	1.244	23.282***	23.285***	4.503*	0.731	16.990***
A $\times$ B	3	1.298	0.648	1.346	2.209	2.212	0.810	0.310	1.713
Analysis of the third factor (carrier)									
C (carrier)	1	0.304	3.290	0.443	3.918	3.912	0.128	5.387*	5.677*
A $\times$ C	1	0.604	0.044	1.010	0.155	0.155	0.070	0.037	0.117
B $\times$ C	2	0.023	0.416	0.194	0.345	0.345	0.756	1.335	0.384

DF: Degrees of freedom.

**Table 7**  
 Mean values obtained for the dependent variables evaluated at harvesting in the field trial. For the factors pigeonpea cultivar and carrier, ns means no significant differences, and the asterisks indicate the significance level (p value) of the differences between the mean values, according to the corresponding ANOVA (Table 6) (significance level \*\*\* p ≤ 0.001; \*\* 0.001 ≤ p ≤ 0.01; \* 0.01 < p ≤ 0.05). For the factor fertilisation strategy, Tukey test was used to compare mean values; the means followed by the same letter did not significantly differ for p ≤ 0.05.

Independent variables	Pods per plant	Seeds per pod	1000-seed weight (g)	Fresh yield (kg ha <sup>-1</sup> )	Yield in dry matter (kg ha <sup>-1</sup> )	Harvest index	N in seeds (g kg <sup>-1</sup> )	N in seeds (Kj/dahl)	Total N content in seeds (kg N ha <sup>-1</sup> )	N fixation effectiveness of the <i>Bradyrhizobium</i> strains (%) <sup>1</sup>
<b>Pigeonpea cultivar</b>										
Aroyo Loro	110.0	4.80	125.0	2933	1320	22.1	30.4	ns	40.2	n.a.
IDIAF Primor	84.9	6.66	107.5	2847	1281	29.5	32.0	ns	41.2	n.a.
<b>Fertilisation strategy</b>										
Non N-fertilised non-inoculated control	97.6	4.9	121.0	2090	940	23.5	31.5	a	29.7	n.a.
AMBPC1010	124.0	5.3	125.2	2915	1312	25.9	31.1	a	40.6	66
ALSPC3051	124.1	5.4	125.0	3009	1354	25.8	30.7	a	41.7	73
AMBPC1040	127.2	5.4	124.9	3046	1371	26.4	31.1	a	42.6	79
N fertilised non-inoculated control	129.5	5.3	123.5	3101	1396	27.0	32.6	a	46.1	n.a.
<b>Carrier</b>										
Pine bark biochar	124.2	5.34	124.7	3028	1363	25.8	31.4	*	43.0	n.a.
Perlite	126.0	5.31	125.4	2952	1328	26.3	30.5	*	40.2	n.a.

<sup>1</sup>N fixation effectiveness (%) estimated from the total N content in seeds (kg N ha<sup>-1</sup>) as follows: [(N content in seeds of plants inoculated with the strain-N content in seeds of plants of the non-N supplied non-inoculated control)/(N content in seeds of plants of the N supplied non-inoculated control-N content in seeds of plants of the non-N supplied non-inoculated control)] × 100. n.a. not applicable.

and unpublished data) were tested in this study at field-scale in eight different environments. We observed that the average N fixation effectiveness (Table 7) was 65 %, 73 % and 79 %, respectively, for the three strains, which was even slightly higher than the N fixation effectiveness measured for the strain ALSPC3051 by Araujo et al. (2015) in hydroponic conditions, i.e. in a soilless medium and axenic conditions. Furthermore, the average yield, as well as the total N content of seeds did not significantly differ between the N-fertilised control and the treatments inoculated with any of the three strains. Therefore, there was a good agronomic response of pigeonpea to the inoculants based on the three autochthonous elite strains tested in this study. To our knowledge, we are the first to report results for pigeonpea on the successful use of inoculants designed by selecting highly effective and adapted strains from the local diverse populations. However, for other crops, there are a number of examples on the success of this strategy for the development of inoculants (Ferreira and Hungria, 2002; Batista et al., 2007; Mulas et al., 2011, 2015; Elías and Herridge 2015; Chibebba et al. 2017).

The three strains from this study are, based on their growth habit in YMA medium, slow-growing rhizobia belonging to the genus *Bradyrhizobium*. The strain AMBPC1010 is the type strain of *Bradyrhizobium cajani* (Araujo et al., 2017), the strain ALSPC3051 is related to the type strain of the species *B. yuanmingense* (Araujo et al., 2015) and the strain AMBPC1040, reported for the first time in this study, is related to the type strains of several *Bradyrhizobium* species (Supplementary material 2, Figure S.M.2). Interestingly, all the pigeonpea nodulating strains isolated to date in the Dominican Republic and Trinidad Tobago (the Caribbean region) have been reported as belonging to slow-growing rhizobia, i.e. the genus *Bradyrhizobium*, (Ramsubhag et al., 2002; Araujo et al. 2015, 2017), except for one single isolate from Trinidad-Tobago which was fast-growing belonging to the genus *Rhizobium* (Ramsubhag et al., 2002). In Brazil, the nodulation of pigeonpea chiefly by slow-growing rhizobia has been reported, although few isolates were fast-growing rhizobia (Ramsubhag et al., 2002; Fernandes et al., 2003; Stepkowski et al., 2003; Costa et al., 2014). In Western Africa (Côte d'Ivoire), the isolates were reported to belong to the genus *Bradyrhizobium* (Fossou et al., 2016). Conversely, in the primary and secondary centres of pigeonpea diversity (Northern India and Eastern Africa) (Khoury et al., 2015), the nodule isolates were reported as predominantly belonging to fast-growing rhizobia (Wolde-Meskel et al., 2005; Dubey et al., 2010; Degefu et al., 2013; Singh et al., 2018). The nodulation of pigeonpea by slow and fast growing rhizobia are in agreement with the results found for other legumes from the same tribe, phaseoleae, such as cowpea (Hakim et al., 2018).

#### 4.2. Development of the formulation

The first step of the formulation development was to find a carrier that performed at least as well as perlite, the control, which produced similar results to peat in the experiment of Albareda et al. (2008). We used, apart from perlite, one organic carrier, poultry litter, and two kinds of biochar.

The poultry litter used in this experiment was not compatible with any of the two *Bradyrhizobium* strains because there was an unacceptable loss of viability during the shelf-life. Poultry litter has been proposed by Rivera-Cruz et al. (2008) as a carrier for Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) with good results, as they observed an improvement in plant growth at a mesocosm scale. They mixed the bacteria with the carrier and shortly thereafter they applied the mix to the pots. However, there was no analysis of the evolution of the survival of the inoculated bacteria during the shelf-life of the inoculant mix. Our hypothesis is that poultry litter might hold toxic substances for the bacteria. In the work from Rivera-Cruz et al. (2008), due to the short time elapsed between inoculant preparation and the field release, the toxic substances may not have had enough time to act. Another possible explanation is the different sensitivity to the toxic substances of

different bacteria taxa, because the above indicated authors worked with *Enterobacter* while we worked with *Bradyrhizobium*. Interestingly, the two carriers based on biochar used in this study produced different results during the shelf-life. Whereas the pine bark biochar performed as well as the perlite control or even slightly better, the sewage sludge biochar produced inferior results, especially after the third month. A more in depth analysis of the chemical components of the sewage sludge biochar are needed to explain the loss of viability because, depending on its origin, sludge composition can show large variations and can even contain considerable amounts of heavy metals (Sampaio et al., 2016).

Hale et al. (2015) tested different pyrolysed materials as carriers for the PGPR *Enterobacter cloacae* with good overall results, but the pine-wood biochar obtained at 600 °C was the best option, performing as well as the standard carriers. In our case, we used the pine bark instead of the whole wood, because the bark is considered to be an undervalued resource and a solid residue of the mills where logs are debarked (Miranda et al., 2012).

Engamberdieva et al. (2017) demonstrated that a *Bradyrhizobium* inoculant formulated with biochar improved plant growth in lupins at microcosm scale compared with the same strain without formulation. They assigned this improvement to protection of the bacteria by the biochar. However, they did not compare the effect of biochar with that of another carrier. Hale et al. (2015) demonstrated at a microcosm scale that biochar performed as well as peat and better than vermiculite in sustaining population densities in the soil, but our study is the first to test a biochar-based inoculant in real field conditions, involving eight different environments and continuing until the end of the crop cycle, thus evaluating crop yield. The biochar performed in the field as well as the control (perlite) and the carrier had no effect on the final yield, any of the yield components, the nodule occupancy, or the number and weight of nodules per plant. Also, there were no interactions between the carrier and the cultivar or the strain, and therefore it is possible to replace perlite by pine bark biochar as a carrier. The use of biochar obtained from a residue fits well with the principles of the circular economy (López-Cano et al., 2018). Hence, biochar from pine bark is preferable from the environmental viewpoint to the use of perlite, which is obtained from a volcanic siliceous rock after an industrial process which requires temperatures around or even higher than 1000 °C (Angelopoulos et al., 2014).

Given the climatic conditions of the Caribbean countries, commercialisation of the inoculant separate from the seed is recommended rather than pre-inoculated seeds, because the loss in viability measured in the pre-inoculated seeds was approximately 50 % in two weeks at 20 °C, up to less than  $10^4$  cfu seed<sup>-1</sup>. In Caribbean countries, temperatures in warehouses are commonly much higher than 20 °C and the survival of the inoculant bacteria could worsen. Hence, the inoculant could be distributed in the traditional form, in mono-dose packages for one hectare. In this way it would be easier to ensure optimal shelf-life by keeping the inoculant refrigerated and, therefore, maximise the efficiency of the product.

#### 4.3. Field performance of the formulated inoculant, based on autochthonous strains

It is well-known, that BNF abilities are uncoupled from colonisation and nodulation abilities (Westhoek et al., 2017). Thus, a successful inoculant strain needs to be a good N-fixer, similar to the strains used in this work, and it also needs an outstanding ability to form and colonize nodules.

Although the nodule colonisation by the inoculated strain can be influenced by abiotic soil factors such as pH (Pérez-Fernández et al., 2015), usually the number of resident nodulating bacteria in the soil (Laguerre et al., 2003; Howieson and Ballard, 2004; Elias and Herridge, 2015) and their competitive ability (Ferreira and Hungria, 2002; Grange et al., 2007) are the most influencing factors. In this context, in

our field trial we analysed the nodule occupancy by the inoculated strains, in soils with different counts of resident nodulating bacteria, and the obtained results confirmed that for pigeonpea, the number of resident nodulating bacteria had a statistically significant effect on the level of nodule occupancy by the inoculated strain. Hence, in the field with less than log<sub>10</sub> 2.0 (1.49) nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup>, the occupancy by the inoculated strain was nearly 90 %. The occupation percentage decreased by 18 % with the increase of 1.27 log units in the number of resident nodulating bacteria, similar to the values reported by Elias and Herridge (2015) for chickpea. However, for the following increase of 1.73 log units, the reduction in the occupancy was a further 45 %, which was higher compared to the values reported by other authors.

Even if the resident bacterial populations usually explain the most important part of the nodule occupancy, the intrinsic competitive ability of the inoculated strain is also a determinant of its nodulation capability. Strains with different competitive ability show a differential expression of nod genes, as a response to the interaction with the root exudates (Liu et al., 2017). However, in our case, the strains ALSPC3051 and AMBPC1040 did not show statistically significant differences in their nodulation ability, as the nodule occupancy was similar for the two strains.

The population of soil resident nodulating bacteria also affected the number and biomass of nodules, and the usefulness of the agronomic strategies of inoculation or N fertilisation, for improving the crop yield. In the soil with more than  $1 \times 10^4$  bacteria g soil<sup>-1</sup>, the number and biomass of nodules was significantly higher than in the soil with less than  $1 \times 10^2$  bacteria g soil<sup>-1</sup>. Interestingly, unlike the more generalised situation in which the resident bacteria are highly competitive for nodule occupancy but poor N-fixers (Checcucci et al., 2017), in our field experiment, the resident bacteria in the two soils with greater than  $10^4$  bacteria g soil<sup>-1</sup>, were effective in terms of BNF. This conclusion can be drawn from the fact that in the two soils with greater than  $10^4$  nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup>, the inoculation or the fertilisation with N, produced the same yield as the non-inoculated non-N-fertilised control and thus the natural rhizobial population was as effective as 210 kg N ha<sup>-1</sup> in the irrigated field of Santomé and as effective as 125 kg N ha<sup>-1</sup> in the non-irrigated field of Hato Viejo. Two further conclusions can arise; the first is that the selected elite strains, ALSPC3051 and AMBPC1040, produced a low number of very efficient nodules in the soils with few nodulating bacteria, compared with the nodules produced by the resident rhizobia in the soils with high abundance of nodulating bacteria; the second one was that for more than  $1 \times 10^4$  rhizobia g soil<sup>-1</sup>, the inoculation was futile, with little or no response in terms of crop yield. Our results with pigeonpea were similar to those with other crops, as it has been observed that an MPN of  $10^3$  resident rhizobia per g of soil is the maximum for achieving efficiency with inoculation (Atieno et al., 2012; Furseth et al., 2012; Elias and Herridge, 2015).

Interestingly, the presence of native bacteria able to nodulate pigeonpea is low in the soils of the Dominican Republic, with six out of the eight farms with  $1 \times 10^3$  or less resident nodulating bacteria g soil<sup>-1</sup>. In this situation, inoculation produced on average, a significant yield increase compared to the non-inoculated and non-N-fertilised control, regardless of the elite strain used in the inoculant. Moreover, the yield with the inoculated treatments did not significantly differ from the yield of the N-fertilised control, and hence inoculation can completely replace mineral N fertilisation in the Dominican agroecosystems.

Furthermore, there was no interaction between the cultivar and the fertilisation strategy in the field experiments, which means that the response to the inoculation was similar in the two cultivars regardless of the strain. Although the lack of crop cultivar – rhizobia strain specificity is uncommon (Abou-Shanab et al., 2017), other cases of lack of interaction in other crops have been reported (Pauferro et al., 2010). Our result seems to indicate that the pigeonpea cultivars used for this

study are promiscuous. In the case of soybean, it was demonstrated that promiscuous cultivars responded markedly better to inoculation than non-promiscuous ones (Chibeba et al., 2017). However, with regard to pigeonpea, there is a lack of up-to-date and in-depth knowledge about the cultivar-inoculant interaction and specificity, which is necessary when deciding whether inoculation is required and for the design of efficient inoculants (Agoyi et al., 2016; Gyogluu et al., 2016). Therefore, for the future development of improved pigeonpea cultivars, the optimisation of BNF is a criterion that must be included.

## 5. Conclusions

Based on our results, it is possible to isolate bacterial strains from pigeonpea nodules to create a successful inoculant, which, if formulated as proposed in this study, could be used to increase the yield of pigeonpea in agroecosystems with insufficient levels of native N-fixing bacteria. However, in the few cases where the number of nodulating rhizobia was high enough, the grain yield was not improved either by inoculation or by N-fertiliser application. Interestingly, the three autochthonous strains used in this study, produced similar yield, even if they were genetically diverse. Inoculation can completely replace fertilisation with mineral N. As pigeonpea responds well to inoculation, this environmentally friendly approach is a good alternative to ensure food security in tropical agroecosystems with pigeonpea. The two formulations tested on the farms, one based on pine bark biochar and one based on perlite, were equally effective as inoculants of pigeonpea and can be used to produce commercial inoculants. The formulation based on pine bark biochar is recommended, mainly because it aligns better with the principles of a circular economy.

## Author contributions

Juan Araujo: Participated in every section as training researcher. This work is part of his PhD Tesis. He collected all the experimental data

César-Antonio Díaz-Alcántara: Responsible for the coordination of field trials

Beatriz Urbano: Responsible for data processing

Fernando González-Andrés: Responsible for the experimental design and paper design and writing

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work has been financially supported by the following research projects: FONDOCYT project 2012-2C1-69 (Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología, MESCOT) from Dominican Republic; AECID project 2015/ACDE/001339 (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo) from Spain. Juan Araujo was granted by Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) from Dominican Republic, and by Universidad de León from Spain.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125985>.

## References

Abou-Shanab, R.A.I., Wongphatcharachai, M., Sheaffer, C.C., Orf, J.C., Sadowsky, M.J.,

2017. Competition between introduced *Bradyrhizobium japonicum* strains and indigenous bradyrhizobia in Minnesota organic farming systems. *Symbiosis* 73, 155–163.
- Agoyi, E., Afutu, E., Tumuhairwe, J., Odong, T., Tukamuhabwa, P., 2016. Screening soybean genotypes for promiscuous symbiotic association with *Bradyrhizobium* strains. *Afr. Crop Sci. J.* 24, 49–59.
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Temprano, F.J., 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2771–2779.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Álvarez-Martínez, E.R., Valverde, Á., Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P.F., Velázquez, E., 2009. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from divergent continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch. Microbiol.* 191, 659–668.
- Anderson, S., Gundel, S., Pound, B., Triomphe, B., 2001. Cover crops in smallholder agriculture: Lessons from Latin America. Intermediate Technology Development Group (ITDG) Publishing London, United Kingdom.
- Angelopoulos, P.M., Gerogiorgis, D.I., Paspaliaris, I., 2014. Mathematical modeling and process simulation of perlite grain expansion in a vertical electrical furnace. *Appl. Math. Model.* 38, 1799–1822.
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C.A., Velázquez, E., Urbano, B., González-Andrés, F., 2015. *Bradyrhizobium yuanmingense* related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization. *Sci. Hortic.* 192, 421–428.
- Araujo, J., Flores-Félix, J.D., Igual, J.M., Peix, A., González-Andrés, F., Díaz-Alcántara, C.A., Velázquez, E., 2017. *Bradyrhizobium cajani* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2236–2241.
- Arora, N.K., Khare, E., Singh, S., Tewari, S., 2018. Phenetic, genetic diversity and symbiotic compatibility of rhizobial strains nodulating pigeon pea in Northern India. *3 Biotech* 8, 52.
- Atieno, M., Herrmann, L., Okalebo, R., Lesueur, D., 2012. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2541–2550.
- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., Deaker, R., 2018. Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7521–7539.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives, 1998–2013. *Plant Soil* 378, 1–33.
- Batista, J.S.S., Hungria, M., Barcellos, F.G., Ferreira, M.C., Mendes, I.C., 2007. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrado soil. *Microb. Ecol.* 53, 270–284.
- Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F., 1993. Practical *Rhizobium*-legume technology manual. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., Tyagi, R.D., 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresour. Technol.* 98, 3535–3546.
- Cedano, J., 2006. Guía técnica cultivo de guandul. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Santo Domingo, República Dominicana, pp. 86.
- Checucci, A., DiCenzo, G.C., Bazzicalupo, M., Mengoni, A., 2017. Trade, diplomacy, and warfare: The quest for elite rhizobia inoculant strains. *Front. Microbiol.* 8, 2207.
- Chibeba, A.M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M., de F., Nogueira, M.A., Hungria, M., 2017. Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agric. Ecosyst. Environ.* 246, 291–305.
- Costa, F.M., Schiavo, J.A., Brasil, M.S., Leite, J., Xavier, G.R., Fernandes, P.I., 2014. Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. *Genet. Med. Res.* 13, 469–482.
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., Frostegård, Å., 2013. Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 272–280.
- Díaz-Alcántara, C.A., Araujo, J., Marcano, I.E., Vicioso, A.F., Pimentel, A., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2015. Symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Cajanus cajan* in Dominican Republic. XV National Meeting of the Spanish Society of Nitrogen Fixation and IX Portuguese-Spanish Congress on Nitrogen Fixation pp. 27.
- Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Kumar, H., Choure, K., 2010. Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 8619–8629.
- Egamberdieva, D., Reckling, M., Wirth, S., 2017. Biochar-based *Bradyrhizobium* inoculum improves growth of lupin, *Lupinus angustifolius* L. Under drought stress. *Eur. J. Soil Biol.* 78, 38–42.
- Elias, N.V., Herridge, D.F., 2015. Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea, *Cicer arietinum* L. Cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea. *Plant Soil* 378, 233–249.
- España, M., Cabrera-Bisbal, E., Lapez, M., 2006. Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using<sup>15</sup>N. *Interciencia* 31, 197–201.
- FAOSTAT, 2018. Food and Agriculture Data. Food and Agriculture Organization of the United Nations Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Last Accessed October 26th 2018.
- Fernandes, M.F., Fernandes, R.P.M., Hungria, M., 2003. Seleção de rizóbios nativos para

- gandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38, 835–842.
- Ferreira, M.C., Hungria, M., 2002. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. Field Crops Res. 79, 139–152.
- Fossou, R.K., Ziegler, D., Zézé, A., Barja, F., Perret, X., 2016. Two major clades of bradyrhizobia dominate symbiotic interactions with pigeonpea in fields of Côte d'Ivoire. Front. Microbiol. 7, 11.
- Furseth, B.J., Conley, S.P., Ané, J.-M., 2012. Soybean response to soil rhizobia and seed-applied rhizobia inoculants in Wisconsin. Crop Sci. 52, 339.
- Grange, L., Hungria, M., Graham, P.H., Martínez-Romero, E., 2007. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean, *Phaseolus vulgaris* in Brazil. Soil Biol. Biochem. 39, 867–876.
- Guimarães, S.L., Neves, L.C.R.D., Bonfim-Silva, E.M., Da Silva Campos, D.T., 2016. Development of pigeon pea inoculated with rhizobium isolated from cowpea trap host plants | Desenvolvimento do feijão gandu inoculado com rizóbio isolado de plantas iscas de feijão caupi. Rev. Caatinga 29, 789–795.
- Gyogluu, C., Boahen, S.K., Dakora, F.D., 2016. Response of promiscuous-nodulating soybean, *Glycine max* L. Merr. Genotypes to *Bradyrhizobium* inoculation at three field sites in Mozambique. Symbiosis 69, 81–88.
- Hakim, S., Mirza, S., Zaheer, A., Mclean, J.E., Imran, A., Yasmin, S., Mirza, M.S., 2018. Retrieved 16S rRNA and *nifH* sequences reveal co-dominance of *Bradyrhizobium* and *Ensifer* (*Sinorhizobium*) strains in field-collected root nodules of the promiscuous host *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 485–497.
- Hale, L., Luth, M., Crowley, D., 2015. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. Soil Biol. Biochem. 81, 228–235.
- Hale, L., Luth, M., Kenney, R., Crowley, D., 2014. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. Appl. Soil Ecol. 84, 192–199.
- Howieson, J., Ballard, R., 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. Soil Biol. Biochem. 36, 1261–1273.
- Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P., Miransari, M., 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean, *Glycine max* L. inoculants. Enzyme Microb. Technol. 41, 780–784.
- Khoury, C.K., Castañeda-Alvarez, N.P., Achicanoy, H.A., Sosa, C.C., Bernau, V., Kassa, M.T., Struik, P.C., 2015. Crop wild relatives of pigeonpea [*Cajanus cajan*, L. Millsp.]: distributions, ex situ conservation status, and potential genetic resources for abiotic stress tolerance. Biol. Conserv. 184, 259–270.
- Khurana, A.L., Dudeja, S.S., 1981. Field populations of rhizobia and response to inoculation, molybdenum and nitrogen fertilizer in pigeonpea. Proceedings of the International Workshop on Pigeonpea Ed. ICRISAT Centre, Patancheru, India 381–386.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111–120.
- Kumar Rao, J.V.D.K., Dart, P.J., Matsumoto, T., Day, J.M., 1981. Nitrogen fixation by pigeonpea. Proceedings of the International Workshop on Pigeonpea Ed. ICRISAT Centre, Patancheru, India 190–199.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870–1874.
- Laguette, G., Louvrier, P., Allard, M.R., Amarger, N., 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2276–2283.
- Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota - A review. Soil Biol. Biochem. 43, 1812–1836.
- Liu, Y., Jiang, X., Guan, D., Zhou, W., Ma, M., Zhao, B., Li, J., 2017. Transcriptional analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates. Sci. Rep. 7, 1.
- López-Cano, I., Cayuela, M.L., Sánchez-García, M., Sánchez-Monedero, M.A., 2018. Suitability of different agricultural and urban organic wastes as feedstocks for the production of biochar-Part 2: Agronomical evaluation as soil amendment. Sustainability 10, 6.
- Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M., 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2934–2950.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F.G., Bangel, E.V., Hess, P.N., Martínez-Romero, E., 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. Syst. Appl. Microbiol. 29, 315–332.
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., Pereira, H., 2012. Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. Ind. Crops Prod. 36, 395–400.
- Mula, M.G., Saxena, K.B., 2010. Lifting the Level of Awareness on Pigeonpea - a Global Perspective. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics ed, Andhra Pradesh, India.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C.A., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P., González-Andrés, F., 2013. Inoculants based in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. In: Rodelas González, M.B., González-López, J. (Eds.), Beneficial Plant-Microbial Interactions: Ecology and Applications. CRC Press, USA, pp. 300–328.
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.H., Casquero, P., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2011. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. Soil Biol. Biochem. 43, 2283–2293.
- Mulas, D., Seco, V., Casquero, P.A., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2015. Inoculation with indigenous rhizobium strains increases yields of common bean, *Phaseolus vulgaris* L. in northern Spain, although its efficiency is affected by the tillage system. Symbiosis 67, 113–124.
- Oviedo, F., Cedano, J., Carrasco, A., Godoy de Lutz, G., Arias, J., Segura, Y., 2013. 'Arroyo Loro IDIAF': Variedad de gaudul de alta productividad. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales ed, Santo Domingo, República Dominicana.
- Pauffer, N., Guimarães, A.P., Jantalia, C.P., Urquiaga, S., Alves, B.J.R., Boddey, R.M., 2010. 15N natural abundance of biologically fixed N<sub>2</sub> in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. Soil Biol. Biochem. 42, 1694–1700.
- Pérez-Fernández, M.A., Hill, Y.J., Calvo-Magro, E., Valentine, A., 2015. Competing Bradyrhizobia strains determine niche occupancy by two native legumes in the Iberian Peninsula. Plant Ecol. 216, 1537–1549.
- Ramsubhag, A., Umaharan, P., Donawa, A., 2002. Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea, *Cajanus cajan* L. Millsp. nodulating rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 216, 139–144.
- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P.F., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. Plant Soil 287, 23–33.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Córdova Ballona, G., Kohler, J., Caravaca, F., Roldán, A., 2008. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. Soil Biol. Biochem. 40, 3092–3095.
- Rosas, J.G., Gómez, N., Cara, J., Ubalde, J., Sort, X., Sánchez, M.E., 2015. Assessment of sustainable biochar production for carbon abatement from vineyard residues. J. Anal. Appl. Pyrolysis 113, 239–247.
- Rufini, M., Oliveira, D.P., Trochmann, A., Soares, B.L., de Andrade, M.J.B., Moreira, F.M., de S., 2016. *Bradyrhizobium* spp. strains in symbiosis with pigeon pea cv. Fava-Larga under greenhouse and field conditions. Rev. Bras. Cienc. Solo 40.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Sampaio, T.F., Guerrini, I.A., Otero, X.L., Vazquez, F.M., Bogiani, J.C., Oliveira, F.C., Harrison, R.B., 2016. The impact of biosolid application on soil and native plants in a degraded Brazilian Atlantic rainforest soil. Water Air Soil Pollut. 227, 1.
- Sanginga, N., Wirkom, L.E., Okogun, A., Akobundu, I.O., Carsky, R.J., Tian, G., 1996. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savanna in Nigeria. Biol. Fertil. Soils 23, 441–448.
- Schütz, L., Gättinger, A., Meier, M., Müller, A., Boller, T., Mäder, P., Mathimaran, N., 2018. Improving crop yield and nutrient use efficiency via biofertilization—A global meta-analysis. Front. Plant Sci. 8.
- Sharma, R., Paliwal, J.S., Chopra, P., Dogra, D., Pooniya, V., Bisaria, V.S., Sharma, S., 2017. Survival, efficacy and rhizospheric effects of bacterial inoculants on *Cajanus cajan*. Agric. Ecosyst. Environ. 240, 244–252.
- Silva Guzmán, H., González-Andrés, F., Urbano López de Meneses, B., 2009. Optimización de la fertilización mineral en cultivos de regadío de República Dominicana. AECID - Publicaciones INEA.
- Singh, K., Gera, R., Parshad, J., 2018. An overview on the potential of pigeon pea rhizobia. LAP Lambert Academic Publishing.
- Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M., Nikolić, N., 2018. Microbial fertilizers: a comprehensive review of current findings and future perspectives. Spanish J. Agric. Res. 16, 1.
- Stępkowski, T., Czaplińska, M., Miedzinska, K., Moulin, L., 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 26, 483–494.
- Sun, D., Hale, L., Crowley, D., 2016. Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. Biol. Fertil. Soils 52, 515–522.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876–4882.
- Upadhyaya, H.D., Reddy, K.N., Ramachandran, S., Kumar, V., Singh, S., Reddy, M.T., Irshad Ahmed, M., 2015. Status and genetic diversity in pigeonpea germplasm from Caribbean and Central American regions at ICRISAT genebank. Plant Genet. Resour. Charact. Util. 13, 247–255.
- Urbano, P., 2008. Fitotecnia. Ingeniería de la Producción Vegetal. Mundi-Prensa Libros, S.A. ed, Madrid, España.
- Van der Maesen, L.J.G., 2006. *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. In: Brink, M., Belay, G. (Eds.), Plant Resources of Africa 1. Cereals and Pulses. Backhuys Publishers, Wageningen, pp. 35–47.
- Varshney, R.K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A.K., Saxena, R.K., Schlueter, J.A., Jackson, S.A., 2012. Draft genome sequence of pigeonpea, *Cajanus cajan*, an orphan legume crop of resource-poor farmers. Nat. Biotechnol. 30, 83–89.
- Vincent, J.M.J., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15, 164.
- Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P.S., et al., 2017. Policing the legume-Rhizobium symbiosis: A critical test of partner choice. Sci. Rep. 7, 1419.
- Wolde-Meskel, E., Terefeork, Z., Frostegård, Å., Lindström, K., 2005. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1439–1452.

3.6. Texto completo artículo 4. (Araujo et al. 2020b)

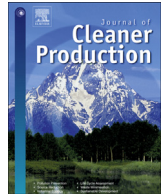
Journal of Cleaner Production 267 (2020) 122065



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Cleaner Production

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jclepro](http://www.elsevier.com/locate/jclepro)



# Comparative environmental life cycle and agronomic performance assessments of nitrogen fixing rhizobia and mineral nitrogen fertiliser applications for pulses in the Caribbean region

Juan Araujo<sup>a</sup>, Beatriz Urbano<sup>b</sup>, Fernando González-Andrés<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Agronomic and Veterinary Sciences, Universidad Autónoma de Santo Domingo, Dominican Republic

<sup>b</sup> Department of Agricultural and Forestry Engineering, Universidad de Valladolid, Spain

<sup>c</sup> Institute of Environment, Natural Resources and Biodiversity, Universidad de León, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 February 2020

Received in revised form

1 May 2020

Accepted 3 May 2020

Available online 12 May 2020

Handling editor: Meisam Tabatabaei

#### Keywords:

Life cycle analysis

*Cajanus cajan*

*Phaseolus vulgaris*

Caribbean region

Inoculation technology

Mineral nitrogen fertiliser

### ABSTRACT

Replacing legume fertilisation using mineral nitrogen (N) (conventional technology, CT) with rhizobial/bradyrhizobial inoculation (inoculation technology, IT) is currently encouraged worldwide due to environmental concerns. However, the environmental effect of such inoculants has scarcely been addressed using a systematic methodology like life cycle analysis (LCA). The objective of this work was to assess, in tropical developing countries, the agronomic and environmental performance of rhizobial inoculants. We worked with two contrasting pulses, common bean, which is conventionally grown using an intensive mineral fertilisation strategy, and Pigeon pea, which is subject to a deficit fertilisation strategy. From the agronomic point of view, the replacement of CT by IT improved Pigeon pea yield by 30%, while increasing common bean yield by a not significant 2%. The Global Warming Potential (GWP) and Cumulative Energy Demand (CED) of inoculant production for 1 ha is less than 1% of the GWP and CED corresponding to the production of the mineral N fertiliser used in CT. The high input-high output crop (common bean) caused less environmental damage than the less productive and low input crop (Pigeon pea), indicating that an improvement in the yield would reduce agriculture's overall environmental impact. Considering the five most impacted categories (CML-IA methodology), the substitution of CT by IT in the common bean resulted in an average reduction of environmental burdens by 19% per ha and 21% per t; in Pigeon pea, the average reduction was 12% per ha and 32% per t. However, phytosanitary treatments and irrigation accounted for higher impacts than N. Thus, improvement in environmental performance must include other technologies to optimise plant protection and irrigation and other strategies to increase yield, such as the optimisation of P, K fertilisation.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pulses, with more than 95 million ha and 92 million t worldwide (FAOSTAT, 2020) are essential to provide dietary proteins to humans, particularly in countries where the consumption of animal proteins is limited due to several reasons, including economic resources shortage (Boye, 2010). Among pulses, the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), with more than 34 million ha and 30 million t worldwide (FAOSTAT, 2020) is an essential foodstuff for human beings (Broughton et al., 2003). Besides that, Pigeon pea (*Cajanus*

*L.*) with almost 7 million ha and almost 6 million t worldwide is a major source of protein in developing countries located at tropical and subtropical regions. In the Caribbean region, common bean is the first pulse in terms of acreage and production, and Pigeon pea the second one (FAOSTAT, 2020).

Legumes associate with specific soil rhizobial bacteria, forming root nodules in which atmospheric nitrogen (N) is biologically fixed in a process commonly known as symbiotic nitrogen fixation (SNF) (Bargaz et al., 2018). SNF plays an important role in fixation and accumulation of millions tons of N in the biosphere (Herridge et al., 2008). In agriculture, SNF allows the saving of N fertilisers in legumes, with economic and environmental benefits (Irisarri et al., 2019). Due to the high economical relevance of the SNF, inoculation with selected rhizobial bacteria strains is recommended for

\* Corresponding author. Institute of Environment, Natural Resources and Biodiversity, Av. de Portugal, 41, E-24009, Leon, Spain.

E-mail address: [fgona@unileon.es](mailto:fgona@unileon.es) (F. González-Andrés).



### Abbreviations

C -	negative control (non-N-fertilised and non-inoculated control for common bean)
CED	Cumulative Energy Demand
CFU	colony forming units
CT	conventional technology
GWP	Global Warming Potential
IT	Inoculation technology
LCA	Life Cycle Analysis
LCA-CP	Life Cycle Analysis of the crop production (both common bean and Pigeon pea)
LCA-RI	Life Cycle Analysis of rhizobial inoculant manufacture
LCI	Life Cycle Inventory
LCIA	Life Cycle Impact Assessment
N	nitrogen

legume crops, in environments where compatible and naturally occurring rhizobia are absent or they are inefficient (Chemining'wa and Vessey, 2006). In such cases, inoculation can increase crop yield mediated largely through symbiotic nitrogen fixation (Checcucci et al., 2017), even completely replacing the need for mineral N fertilisation, e.g. in common bean (Mulas et al., 2015) and in Pigeon pea (Araujo et al., 2015). Moreover, legumes cropping using inoculants instead of mineral N fertilisers has been considered adequate for resource-poor farmers in less developed regions because they could be cheaper and more affordable for farmers in the mentioned situation (Singh et al., 2016). The inoculants are a growing market with an increase of 14% annually and an expected value of USD 1.88 billion worldwide by the end of 2020 (Keswani et al., 2019).

Notwithstanding, the performance of inoculants in the field is sometimes hampered by different issues, with the most serious being the presence of a native rhizobial population highly competitive for nodule occupancy but with low nitrogen fixing abilities; in such a case, the competition for nodule occupancy between the strains in the inoculant and the native strains is the reason for the failure of the inoculation (Dwivedi et al., 2015; diCenzo et al., 2019). However, it has been found that inoculants consisting of native-naturalised rhizobia selected because of their N fixation efficiency – so called elite autochthonous strains – are generally successful (Koskey et al., 2017). Adaptation to the local environment makes them highly competitive, which usually results in greater nodule occupancy, producing a good field performance, expressed in superior yield (Irisarri et al., 2019).

Furthermore, apart from the use of an autochthonous, good N-fixer, the success of an inoculant is largely dependent on the non-biological components of formulations (Atieno et al., 2018). An optimal formulation must keep the highest count of viable cells during shelf-life, attaining enough viable cells in the rhizosphere to trigger the plant response (Herrmann and Lesueur, 2013).

Another key aspect for the viability of the inoculant is the production of the strain by industrial fermentation in cheap and environmentally friendly conditions (Checcucci et al., 2017), using inexpensive growth media based on low-cost compounds (Lobo et al., 2019), such as residues, industrial wastes or by-products (Pastor-Bueis et al., 2017), according to the principles of circular economy (López-Cano et al., 2018).

In spite of all the existing information about basic aspects of legume inoculants, there is a lack of holistic agronomic-environmental approaches regarding the integration of the

inoculants in the agricultural systems for pulses production. From the environmental side, the LCA approach is the most comprehensive tool for the assessment of the environmental impact of agricultural production (Goglio et al., 2015), and it is useful to appraise the differences between the environmental effects of varied production systems (Dekamin et al., 2018), as in this case with the conventional N fertilisation and the inoculation with specific N-fixing rhizobia.

The Caribbean is a tropical region, and the economies of the countries from this region are considered developing economies by the United Nations (UN, 2019). The Dominican Republic is a Caribbean country, where pulses are the most important sources of proteins for the human food (Nedumaran et al., 2015). However, there is an absolute lack of commercially available rhizobia strains for legume crops production in the Caribbean. For this reason, in our previous works on this region, we selected two different elite autochthonous strains to be used as inoculants for common bean (Díaz-Alcántara et al., 2014) and Pigeon pea (Araujo et al., 2015) respectively, and developed a successful formulation (Araujo et al., 2020).

In this work, we have scaled up to pilot the production of the fully formulated inoculants for common beans and Pigeon pea, using the aforementioned elite autochthonous strains and environmentally friendly, locally available raw materials. The aim of this work was to assess the agronomic and environmental performance of the inoculants' technology in pulse crops compared with the CT. For the environmental assessment, the LCA methodology was used, and two different links of the inoculants value chain were analysed, namely, the manufacturing of the rhizobial inoculant on one hand and the crop production process comparing the conventional scenario with the inoculant's scenario on the other.

## 2. Materials and methods

### 2.1. The LCA approach

The LCA followed the ISO 14044 guidelines (ISO, 2006a). These guidelines state that the first step is to define the goal and scope, the second is life cycle inventory (LCI) (ISO, 2006b), the third is the life cycle impact assessment (LCIA), and the fourth is life cycle interpretation.

### 2.2. LCA goal and scope definition

The general goal of the LCA was to analyse, from an environmental perspective, the use of IT for pulse production in tropical developing countries (Dominican Republic). The first scope defined was to analyse the rhizobial inoculant manufacture (LCA-RI) from the points of view of GWP and energy demand, based on an assessment from cradle to biofertiliser plant gate. This information is not available in databases and thus it was necessary to establish it before tackling the LCA of pulse production with IT.

The second defined scope was to analyse, in terms of damage categories (i.e. human health, ecosystems and resources), the crop production process of common bean and Pigeon pea (LCA-CP) in two different scenarios, either with CT or by replacing mineral N fertilisation with rhizobial inoculants (IT), based on a cradle to farm gate assessment.

### 2.3. Description of the functional units

The functional unit for the measurement of LCA-RI was one inoculant unit, which is defined as the quantity of inoculant necessary to inoculate 1 ha of the relevant crop. The inoculant consists of two components, the first one being the powdery

component that contains the rhizobial strain specific to each crop, adequately formulated, and the second one being the binder to the seed (see Table 1 for further details). In the case of the inoculant for common bean, the functional unit consisted of 1200 g of the powdery component and 600 g of the binder. For Pigeon pea, the functional unit consisted of 140 g of the powdery component and 70 g of the binder.

The LCA-CP was based on two different functional units for comparative purposes: i) one t of grain produced from either of the two different pulses, ii) one cropped ha of either of the pulses, in both cases starting from preparation of the soil for the crop until harvesting. The use of two different functional units is a common practice in the LCA of agricultural products (Abeliotis et al., 2013) because it improves the interpretation of the environmental results obtained (Van der Werf et al., 2007).

#### 2.4. LCA of rhizobial inoculant manufacture (LCA-RI)

##### 2.4.1. Rhizobial inoculant manufacture

The manufacturing process for the rhizobial inoculant is outlined in Fig. 1. The bacterial strains were selected in previous studies because of their effectiveness in N fixation and high colonization capability (Mulas et al. (2013) for common bean and Araujo et al. (2020) for Pigeon pea). The strain used for common bean was OAC1020, isolated from a root nodule of common bean in the Dominican Republic, and denoted *Rhizobium* sp. as it was not identified as any described species of the genus *Rhizobium* according to *recA* and *atpD* gene sequence analyses (Díaz-Alcántara et al., 2014). The strain used for Pigeon pea was AMBPC1010, which is the type strain of *Bradyrhizobium cajanii*, isolated from a *Cajanus cajan* root nodule in the Dominican Republic (Araújo et al., 2017).

The inoculants were produced in a pilot plant located at the Universidad Autónoma de Santo Domingo. The fermentation process to obtain the bacterial broth (Fig. 1) was carried out in a fermenter consisting of a 22.2 L capacity reactor. The growth medium was composed of sugar molasses and beer vinasse in the proportions shown in Table 2. The pH of the growth media was adjusted to 6.7 with  $K_2HPO_4$  2M before sterilization and no correction was performed during fermentation. The primary inoculum consisted of a cell suspension with  $1 \times 10^9$  CFU per mL obtained after incubation at 28 °C in Yeast Mannitol medium for five days, it was added to the growth medium at 0.5% (vol:vol). Dissolved oxygen was fixed to a minimum of 10%. Fermentation lasted 96 h and at the end of the fermentation process the cells protectors, were added (Fig. 1) in the proportions indicated in Table 2.

The bacterial broth thus obtained was mixed with the carrier, consisting of sieved and sterilised expanded perlite (Fig. 1), in the proportions indicated in Tables 1 and 2. Expanded perlite was selected following Araujo et al. (2020), as it was easily available in the local market and at a competitive price.

##### 2.4.2. LCI data collection and system model

Table 2 shows the inventory of inputs needed to manufacture the rhizobial inoculant. The inventory data were taken from the ecoinvent v. 3.2 database (Wernet et al., 2016) using the system model Allocation at the Point of Substitution (APOS), and using unit processes, which are fully transparent and include uncertainty data. The APOS system model follows the attributional approach in which burdens are attributed proportionally to specific processes. The data include the inputs, energy consumption and emissions. The distances used to calculate transport emissions are shown in Supplementary Material 1 (Table S1).

#### 2.5. Comparative LCA of the crop production (LCA-CP) of common bean and Pigeon pea

##### 2.5.1. Scenarios for the LCA-CP and data collection of crop yield in the different scenarios

The scenarios considered for the LCA of the production process of each one of the crops were the following.

**Common bean.** CT treatment (CT): fertilised with 133.8 kg N ha<sup>-1</sup>, 37.7 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> and 87.7 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>. Following the practice commonly used by farmers, the doses of the three nutrients were calculated to cover the theoretical crop extraction for an expected yield of 2500 kg ha<sup>-1</sup> of commercial grains, following the criteria of Silva-Guzman et al. (2009).

IT treatment (IT): full replacement of N fertilisation by inoculation with 2% w:vol  $9 \times 10^6$  CFU per seed. This treatment received the same phosphorus and potassium fertilisation.

Negative control (C-): non-N-fertilised and non-inoculated control. This third treatment also received the same phosphorus and potassium fertilisation.

**Pigeon pea.** CT treatment (CT): fertilised with 18.8 kg N ha<sup>-1</sup>, 10.7 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> and 22.7 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>. Following the practice commonly used by farmers, the doses of the three nutrients are below the crop extraction for an average yield, and this is intended to improve crop establishment.

IT treatment (IT): full replacement of N fertilisation by inoculation with  $7 \times 10^6$  CFU per seed. This treatment received the same phosphorus and potassium fertilisation.

There was no negative control for this crop.

As the inoculation of legume crops is not a technology that is used in Caribbean agriculture, there are no data sets available regarding the yield of pulses produced under IT. For this reason, quantification of the crop yield under the different scenarios proposed was based on a set of field trials carried out in commercial farms from 2016 to 2018 and presented here for the first time. The field trials were performed on eight farms for the common bean and nine farms for Pigeon pea. The location of each field with coordinates, the edapho-climatic conditions of the experimental fields during the experimental season and the sowing dates are presented in Supplementary Material 1 (Table S2).

**Table 1**

Components of the rhizobial inoculants for legumes and constituent elements of each component, indicating the percentage of each element in the final composition for each component.

Component	Elements	Quantity
Powdery component with $\geq 2 \times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> at manufacturing, and $\geq 1 \times 10^9$ CFU g <sup>-1</sup> at expiry date	Bacterial broth with $\geq 5 \times 10^9$ CFU ml <sup>-1</sup> plus two bacterial cells protectors	50% (w:w)
	Carrier: perlite ground, passed through a 70- $\mu$ m sieve, and autoclaved at 120 °C for 20 min	50% (vol.:w)
Binder component	Refined gum arabic	40% (w:vol.)
	Water	60% (vol.:vol.)

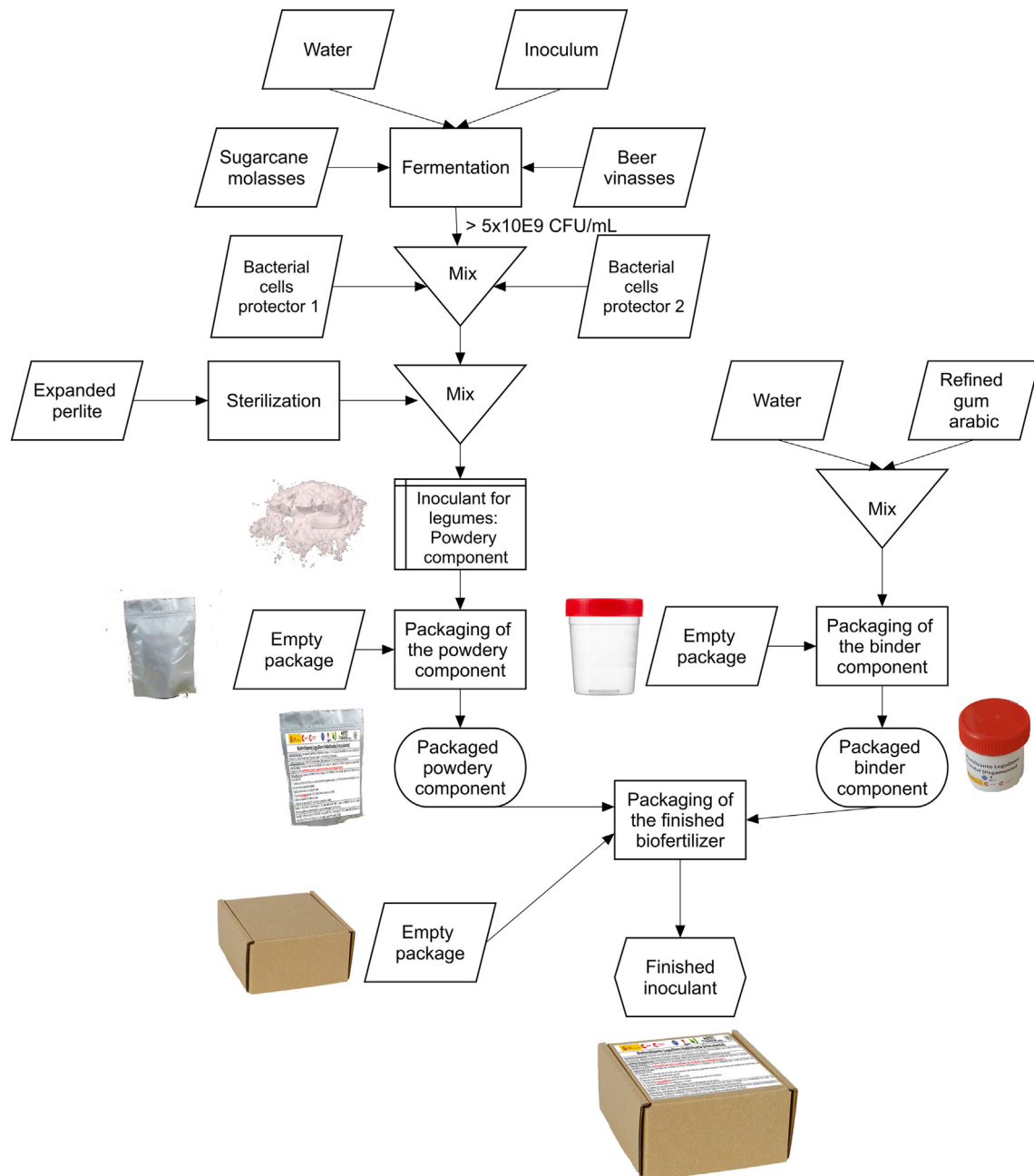


Fig. 1. Flow chart for the manufacturing process of inoculant production.

The experimental design in each field was a randomised complete block, with three blocks for common bean and four for Pigeon pea. The yield and the yield components were recorded and subjected to analysis of variance (ANOVA) appropriate to a randomised complete block design, for which the location or site of the field trial was considered a random factor whereas the treatment was a fixed factor. The Tukey pot-hoc test was used to compare mean values in the case of the common bean. The normality of standardised residuals was checked with Kolmogorov-Smirnov's test and the homoscedasticity with Levene's test. All the statistical analysis was performed using the statistics package SPSS v.21.0. Further details of the design of the field trial and agronomic practices are in Supplementary Material 2 (Field trial details).

#### 2.5.2. LCI data collection and system model

The agronomic practices followed by the farmers using CT were obtained from a focus group and are given in Table 3, together with the inventory of inputs needed for agricultural production in the different scenarios (CT, C-, IT). The inventory data for the LCA-CP were taken from the ecoinvent database v. 3.2 using the same system model as for LCA-RI, extrapolating, where necessary, the data obtained from the database to adapt it to conditions in the Dominican Republic. However, the phytosanitary products were taken from the Agri-footprint database, which provides more accurate information about specific products' families (Durlinger et al., 2014). The distances used to calculate the transport emissions of agricultural inputs are in Supplementary Material 1

**Table 2**

Inventory of inputs for the manufacturing of one unit of rhizobial inoculants for legume crops, which is defined as the inoculant necessary to inoculate 1 ha of the corresponding crop. The dose of the powdery component of the inoculant is 2% in weight with respect to the seeds weight, and the dose of the binder component is 1% in volume with respect to the seeds weight. The seeds weight necessary for 1 ha is 60 kg for common bean and 7 kg for Pigeon pea.

Component or element according to Table 1 or Fig. 1	Input	Process (Fig. 1)	Unit	Quantity for 1 unit of common bean inoculant	Quantity for 1 unit of Pigeon pea inoculant	Origin
Bacterial broth	Sugarcane molasses	Fermentation	mL	13.8	1.6	Residue from local industry
	Beer vinasses	Fermentation	mL	8.4	1.0	Residue from local industry
	Inoculum	Fermentation	mL	6.0	0.7	From the own industry
	Water	Fermentation	mL	559.8	65.3	From nature
Bacterial cells protectors	Polysaccharide (bacterial cells protector 1)	Mix with bacterial broth	g	6.0	0.7	USA industry
	Disaccharide (bacterial cells protector 2)	Mix with bacterial broth	g	6.0	0.7	USA industry
Carrier	Sieved expanded perlite	Mix with bacterial broth with cell protectors	g	600	70	USA industry
Binder component	Refined gum arabic	Mix with water	g	240	28	USA industry
	Water	–	mL	360	42	From nature
Packaged powdery component	Package for the powdery component of the inoculant: Packaging film, low density polyethylene	Packaging of the powdery component	g	50	10	USA industry
Packaged binder component	Package for the binder component: Polyethylene, low density, granulate	Packaging of the binder component	g	20	15	Local industry
Packaged finished inoculant	Package for the finished inoculant: Corrugated board box	Packaging of the finished inoculant	g	80	20	Local industry

(Table S3). Irrigation needs were calculated with Cropwat v.8.0 (FAO, 2018), taking into account the characteristics of local irrigation systems.

## 2.6. System boundaries

Regarding the LCA-RI, the production processes of the carrier, the cells protectors, the binder, the empty packages and the raw materials for the bacterial growth media, which are the by-products sugarcane molasses and beer vinasse, have been considered for the LCA (Fig. 2), including transportation and excluding infrastructure processes and long-term emissions.

Regarding the LCA-CP, all the systems of common bean and Pigeon pea production were covered by the system boundaries. Thus, fieldwork and agricultural activities resulting in pollutant emissions to the soil, water and air have been considered. The following steps were included in the agricultural activities: soil occupation, preparation of soil (consisting of tillage using a tractor), irrigation, fertilisation, seed inoculation, sowing, phytosanitary control and harvesting. Further details on the system boundaries are in Supplementary Material 2 (System boundaries details).

## 2.7. LCIA

The LCIA was performed using the software SimaPro v.9.0 (PRé Sustainability, 2018), excluding, in all cases, infrastructure processes and long-term emissions. For the LCA-RI, two specific issues were analysed in the manufacturing process: the GWP and the CED. To assess the GWP, the method selected was that developed by the International Panel on Climate Change with a timeframe of 20 years (IPCC, 2013), and for the CED, the method was based on the lower heating values of fuels, which were developed forecoinvent version 1.01 and subsequently expanded (Frischknecht et al., 2007; Weidema et al., 2013).

For the LCA-CP, the method used was the one proposed by Centre of Environmental Science of Leiden University (CML-IA), which is defined for the midpoint approach, using the baseline version (Guinée et al., 2001) with ten impact categories.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Environmental impact assessment of the rhizobial inoculant (RI) production

Table 4 shows the values obtained for the LCIA of the manufacturing process of the RI from cradle to gate. Shown values consist of GWP and the CED and refer to one unit of inoculant. Considering that the composition of one inoculant's unit depends on the crop, Table 4 presents the LCIA for each crop separately.

The GWP corresponding to the manufacturing of one unit of finished inoculant for common bean (1200 g of powdery component + 600 ml of the binder component + package) was estimated at 1.95 kg CO<sub>2</sub>eq unit<sup>-1</sup>. Then this value was compared with the GWP corresponding to the manufacturing process of the mineral N fertilisers it replaces (120 kg N as ammonium sulphate 21% N + 13.8 kg N as urea 46 %N) and was estimated at 238 kg CO<sub>2</sub>eq ha<sup>-1</sup>. In terms of CED, the energy corresponding to the inoculant was 25.3 MJ unit<sup>-1</sup>, compared to the 3500 MJ ha<sup>-1</sup> of the mineral N fertiliser.

For the Pigeon pea, the GWP and CED values corresponding to the rhizobial inoculant were even lower than for the common bean (Table 4) because one unit of finished inoculant contains smaller quantities of each component due to the smaller seeding rate. The GWP was estimated at 0.27 kg CO<sub>2</sub>eq unit<sup>-1</sup> and the CED at 3.8 MJ unit<sup>-1</sup>. However, the conventional N fertilisation for the Pigeon pea was also lower than for the common bean because the strategy followed for the CT in this crop is to provide a deficit fertilisation, just with the purpose of helping in crop establishment. Thus, the

**Table 3**  
Inventory of inputs and agronomic practices for the production of common bean and Pigeon pea in the conventional technology (CT) and in the inoculation-based technology (IT). For common bean, C- is the negative control without inoculation nor N fertilisation. DAS means days after sowing.

Agronomic practice	Common bean			Pigeon pea		
	CT	IT	C- DAS	CT	IT	DAS
Soil preparation with tractor	Tillage, ploughing			Tillage, ploughing		
	Tillage, harrowing, by spring tine harrow			Tillage, harrowing, by spring tine harrow		
	Swath, by rotary windrower			Swath, by rotary windrower		
Pre-sowing N fertilization	Distributed by hand No			No No		
	75 kg N ha <sup>-1</sup> as Ammonium sulphate 21% N					
Pre-sowing P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> and K <sub>2</sub> O fertilization	Distributed by hand			No No		
	35 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> as single superphosphate 21% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 85 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> as potassium chloride 60% K <sub>2</sub> O					
Pre-sowing irrigation	150 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>			150 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup>		
Seeds inoculation	No			No		
	1200 g powdery + 600 g binder component			140 g powdery component + 70 g binder component		
Sowing	Machine-sowing with 60 kg ha <sup>-1</sup> of seeds			Sowing by hand with 7 kg ha <sup>-1</sup> of seeds		
Post-nascence N fertilization	Distributed by hand No			Distributed by hand No		
	45 kg N ha <sup>-1</sup> as Ammonium sulphate 21% N			15 kg N ha <sup>-1</sup> as Ammonium sulphate 21%		
Post-nascence P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> and K <sub>2</sub> O fertilization	No No			Distributed by hand 60		
Irrigation	1460 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> calculated with Cropwat 8.0 and the database Climwat 2.0 for Cropwat (FAO, 2018)			2409 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> calculated with Cropwat 8.0 and the database Climwat 2.0 for Cropwat (FAO, 2018)		
	Using manual instruments and labour			Using manual instruments and labour		
Phytosanitary treatment 1	Distributed by backpack manual sprayer			Distributed by backpack manual sprayer		
	Insecticide Imidacloprid 20% a.i. 0.35 kg ha <sup>-1</sup>			Insecticide Imidacloprid 20% a.i. 0.35 kg ha <sup>-1</sup>		
Foliar N Fertilization 1	Distributed during the phytosanitary treatment 1 No			Distributed during the phytosanitary treatment 1 No		
	4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N			4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N		
Foliar P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> and K <sub>2</sub> O fertilization 1	Distributed during the phytosanitary treatment 1 10			Distributed during the phytosanitary treatment 1 15		
	0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O			0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O		
Phytosanitary treatment 2	Distributed by backpack manual sprayer 30			Distributed by backpack manual sprayer 31		
	Insecticide Imidacloprid 20% a.i. 0.35 kg ha <sup>-1</sup> Fungicide Cyproconazole 10% a.i. 0.15 kg ha <sup>-1</sup>			Insecticide Imidacloprid 20% a.i. 0.35 kg ha <sup>-1</sup> Insecticide Cypermethrin 10% a.i. 0.35 L ha <sup>-1</sup>		
Foliar N Fertilization 2	Distributed during the phytosanitary treatment 1 No			Distributed during the phytosanitary treatment 1 No		
	4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N			4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N		
Foliar P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> and K <sub>2</sub> O fertilization 2	Distributed during the phytosanitary treatment 2 30			Distributed during the phytosanitary treatment 2 31		
	0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O			0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O		
Phytosanitary treatment 3	Distributed by backpack manual sprayer 50			Distributed by backpack manual sprayer 61		
	Insecticide Imidacloprid 20% a.i. 0.35 kg ha <sup>-1</sup> Fungicide Cyproconazole 10% a.i. 0.15 kg ha <sup>-1</sup>			Insecticide Thiamethoxam, 25% a.i. 0.20 kg ha <sup>-1</sup> Fungicide Cyproconazole 10% a.i. 0.15 kg ha <sup>-1</sup>		
Foliar N Fertilization 3	Distributed during the phytosanitary treatment 1 No			Distributed during the phytosanitary treatment 1 No		
	4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N			4.6 kg N ha <sup>-1</sup> as urea 46% N		
Foliar P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> and K <sub>2</sub> O fertilization 3	Distributed during the phytosanitary treatment 3 50			Distributed during the phytosanitary treatment 3 61		
	0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O			0,9 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +0,9 kg K <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> from a liquid product with 60% K <sub>2</sub> O		
Phytosanitary treatment 4	Distributed by backpack manual sprayer 60			Distributed by backpack manual sprayer 91		
	Insecticide Cypermethrin 10% a.i. 0.35 L ha <sup>-1</sup>			Insecticide Cypermethrin 10% a.i. 0.35 L ha <sup>-1</sup> Fungicide Cyproconazole 10% a.i. 0.15 kg ha <sup>-1</sup>		
Hand harvest	Hand collection and thresh 80			In successive collections 30;60;90;114		

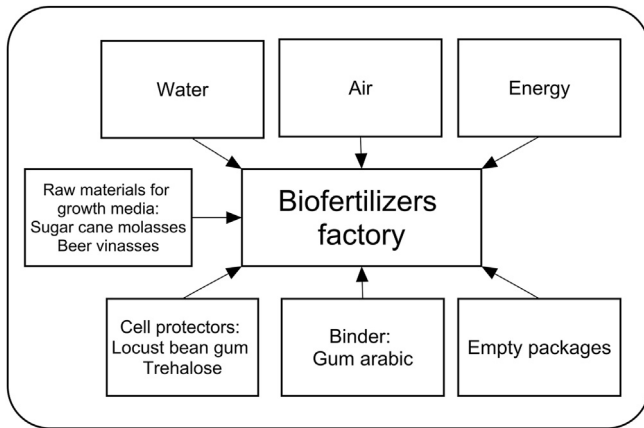


Fig. 2. System boundaries for the LCA corresponding to the manufacturing process of the inoculant production.

GWP was estimated at 76 kg CO<sub>2</sub>eq ha<sup>-1</sup> and the CED at 1040 MJ ha<sup>-1</sup>.

In summary, the GWP of the inoculant is only 0.8% that of the mineral N fertiliser used in the conventional production of common bean and 0.36% in the case of Pigeon pea. The CED showed a similar behaviour.

The main burden corresponded to the packaged powdery component, which ranged from 62% to 66% of the total GWP and from 56% to 61% of the total CED (the lower percentage is for Pigeon pea, and the higher percentage is for common bean) (Table 4). The packaged binder component contributed around 30% of GWP and CED, whereas the remaining percentage corresponded to the package used to deliver the two components together.

A more detailed analysis of the relative environmental burdens of the powdery and binder components separately is in Supplementary Material 1 (Tables S4 and S5 respectively). In brief, in the powdery component (Table S4), interestingly, the carrier accounted for most of the GWP (67%) and CED (54%), whereas the bacterial broth, which is the active ingredient, only accounted for around a 10%. To explain this, it has to be considered that the ingredients for the bacteria growth media, whose composition has been published here by the first time, were by-products from local food industries, and thus their environmental burdens were very low; in fact, 75% of the GWP and CED of the bacterial broth was due to the energy consumed by the reactor where fermentation took place (data not shown). Conversely, the carrier is expanded perlite, a product obtained from a volcanic siliceous rock after an industrial process that requires temperatures around or even higher than 1000 °C (Angelopoulos et al., 2014); it is imported from the United States

because it is not produced locally. Literature indicates that biochar from organic residues, specifically from pine bark, is an optimal replacement for perlite, either alone (Araujo et al., 2020) or mixed with 25% perlite (Pastor-Bueis et al., 2019), but this product is difficult to obtain locally or internationally due to the lack of industrial facilities which produce them, and thus it is not realistic to calculate the LCA based on biochar as carrier in the Dominican Republic. The two cells protectors of the bacterial powdery component are in a very low proportion, 1% each with respect to the bacterial broth; therefore, the contribution to GWP and CED was less than 1.5% each. Finally, the package for the powdery component accounted for 15% of the GWP and 29% of the CED.

Regarding the binder component, the refined gum Arabic accounted for the highest impact (78% of the GWP and 70% of the CED), whereas the package represented 17% and 25%, respectively (Table S5).

### 3.2. Agronomic effect of the technological substitution, in the common bean and Pigeon pea yield

The yield obtained for common bean field tests, showed that the IT with the specific strain OAC1020 produced, on average, 2047 kg ha<sup>-1</sup> (Table 5), which is statistically similar to the CT (2011 kg ha<sup>-1</sup>). In contrast, the yield of the C- was significantly lower, with an average of 1613 kg ha<sup>-1</sup> due to a significantly lower number of pods per plant and number of seeds per pod (Table 5). This is, to the best of our knowledge, the largest field trial to demonstrate the effect of the rhizobial inoculants in common bean yield in the Caribbean region.

Regarding the Pigeon pea, the inoculation with the selected rhizobial strain significantly improved the average yield obtained with the CT, from 840 kg ha<sup>-1</sup> in the CT to 1097 kg ha<sup>-1</sup> in the IT (Table 6). The difference in the yield values was due to a significant variation in the pods per plant and 100 seeds weight.

Metadata disaggregated by farms are in the Supplementary Material 1 (Table S6 for common bean and Table S7 for Pigeon pea).

For the common bean, the substitution of the CT by the IT, using the autochthonous elite strain and the formulation presented in this work, did not affect the grain yield; indeed, the inoculation even increased the average yield by a non-statistically significant 1.8% compared to the CT. Other authors as for example Pastor-Buies et al. (2019), arrived at the same conclusion on the possibility of a complete replacement of mineral N fertilisation by inoculation with autochthonous selected rhizobia in common bean. The results obtained in the case of Pigeon pea demonstrated that the deficit fertilization of the CT underexploits the yield ceiling and that the shift to the IT could increase the yield by 30% on average.

Table 4

Life cycle impact assessment (LCIA) for one unit of inoculant for common bean and pigoenpea, respectively, in the Dominican Republic, compared to the alternative amount of mineral N fertiliser that is used in the conventional technology (CT). The LCIA was estimated as Global Warming Potential according to the methodology IPCC 2013 and also as cumulative energy demand (CED) based on Lower Heating Values (LHV) (v 1.05). The LCIA for the inoculant was desegregated for the finished inoculant and its components.

Crop	Impact assessment method	Unit	Inoculation Technology (IT)				CT
			FINISHED INOCULANT 1 unit for 1 ha	Components			Production of the alternative amount of mineral N
				Packaged binder component	Packaged powdery component	Empty package for finished inoculant	
Common bean	GWP IPCC 2013	20y kg CO <sub>2</sub> eq	1.95 (100%)	0.57 (29%)	1.29 (66%)	0.09 (5%)	238
	CED - LHV	MJ	25.3 (100%)	8.1 (32%)	15.3 (61%)	1.8 (7%)	3500
Pigeon pea	GWP IPCC 2013	20y kg CO <sub>2</sub> eq	0,27 (100%)	0.08 (29%)	0,17 (62%)	0.02 (9%)	76
	CED - LHV	MJ	3.8 (100%)	1.2 (32%)	2.2 (56%)	0.5 (12%)	1040

**Table 5**  
Mean values for yield and yield components of eight common bean field trials located at eight different farms that were considered as eight different environments. The treatment was the technology: conventional (CT), inoculation (IT) and the negative control (C-) without inoculation nor N-fertilisation. The asterisks indicate the significance level (p value) corresponding to the F values according to the ANOVA performed, in which the environment was considered a random factor and the treatment a fixed factor (significance level \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $0.001 < p \leq 0.01$ ; \*  $0.01 < p \leq 0.05$ ). A Tukey test was used to compare mean values; the means followed by the same letter did not significantly differ for  $p \leq 0.05$ .

Parameter	Technology used	Mean values obtained	F-value	Significance (p-value)
Plants per m <sup>2</sup>	C-	8.7 <sup>a</sup>	2.760	ns
	CT	8.7 <sup>a</sup>		
	IT	9.0 <sup>a</sup>		
Pods per plant	C-	10.8 <sup>a</sup>	10.105	***
	CT	13.6 <sup>b</sup>		
	IT	13.3 <sup>b</sup>		
100-seed weight (g) (dry matter)	C-	44.4 <sup>a</sup>	1.894	ns
	CT	43.1 <sup>a</sup>		
	IT	43.5 <sup>a</sup>		
Seeds per pod	C-	3.8 <sup>a</sup>	5.169	**
	CT	4.0 <sup>b</sup>		
	IT	4.0 <sup>b</sup>		
Yield of commercial beans (containing 89% dry matter) (kg ha <sup>-1</sup> )	C-	1613 <sup>a</sup>	9.686	***
	CT	2011 <sup>b</sup>		
	IT	2047 <sup>b</sup>		

### 3.3. Environmental impact assessment of the crop production process

Table 7 shows the LCIA of the crop production process, in three scenarios for common bean (C-, CT and IT) and two for Pigeon pea (CT, IT). Shown data consists of ten baseline categories from the CML-IA method; the impact category marine aquatic ecotoxicity was disregarded, as it was not relevant to the study. The impacts were allocated to 1 t of produced grains and to 1 ha. Normalised impacts (Fig. 3) indicate that, out of the ten categories, the higher impacts corresponded to the following five: Abiotic depletion of fossil fuels, global warming, human toxicity, fresh water aquatic ecotoxicity and acidification, and the following discussion will be focused in these categories.

For the common bean, the highest environmental impact per ha corresponded to the CT for all the impact categories. A hypothetical shift to IT would reduce the environmental impacts per ha in all the categories, ranging from 16% in fresh water aquatic ecotoxicity to 25% in acidification. In reference to one t of produced grains, the impact reduction would be slightly higher, by an additional 2%, on average, for each category. Interestingly, in reference to 1 ha, the IT barely increased the environmental impacts compared to the negative control (C-), which did not receive either N fertilisation or inoculation, and yet, when the environmental impacts were allocated to 1 t of produced grains, the IT reduced them by 21% on

average, compared to the C-, due to the yield increase as a consequence of the SNF. In addition, it is interesting to highlight that the CT produces similar or even lower (1%–5% lower) environmental impacts than the C- per t of produced grains; only the human toxicity was higher in the CT than in the C- (Table 7).

For Pigeon pea, the highest environmental impacts were produced by the CT. The hypothetical change to the IT would reduce the impacts of Pigeon pea production for all the categories; the reduction would be very relevant when the LCIA is based on 1 t of produced grain (26%–34%, depending on the category with an average of 32%) due to a combination of a yield increase produced by the inoculation and the suppression of mineral N fertilisation. The impacts reduction would be smaller, but also important, allocating the LCIA to 1 ha; in this case, the reduction would be between 4% and 14%, with an average of 12%, as a consequence of the suppression of the N fertilisation (Table 7).

Comparing the environmental impacts of the two crops using the CT, 1 ha of common bean produces higher impacts than 1 ha of Pigeon pea for all the categories except for the fresh aquatic ecotoxicity, in which the highest irrigation dose of Pigeon pea (2409 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> versus 1460 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of common bean) penalised this category. Conversely, using the IT, 1 ha of Pigeon pea produces higher impacts than 1 ha of common bean, for all the categories except for acidification. Allocating the impacts to 1 t of produce grains, Pigeon pea generates higher environmental burdens than

**Table 6**  
Mean values for yield and yield components of nine Pigeon pea's field trials located at nine different farms that were considered as nine different environments. The treatment was the technology: conventional (CT) or inoculation (IT). The asterisks indicate the significance level (p value) corresponding to the F values according to the ANOVA performed, in which the environment was considered a random factor and the treatment a fixed factor (significance level \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $0.001 < p \leq 0.01$ ; \*  $0.01 < p \leq 0.05$ ).

Parameter	Technology used	Mean values obtained	F-value	Significance (p-value)
Pods per plant	CT	47.3	9.241	**
	IT	58.8		
100-seed weight (g) (dry matter)	CT	37.2	4.955	*
	IT	38.3		
Seeds per pod	CT	4.5	3.533	ns
	IT	4.7		
Grain yield referred to dry matter (kg ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	CT	840	10.526	**
	IT	1097		

<sup>a</sup> Pigeon pea is collected and consumed as green grains, but due to the great variation of dry matter content of green grains, the yield has been corrected to dry matter for more constant values.

**Table 7**

Comparison between environmental impacts per cropped ha and per produced ton of common bean and Pigeon pea under two different technologies: conventional (CT) and inoculation (IT), plus, in the case of common bean, a negative control (C-) per ha. CML-IA methodology baseline version.

Impact category	Unit	Common bean			Pigeon pea	
		C-	CT	IT	CT	IT
Abiotic depletion	kg Sb eq ha <sup>-1</sup>	3.85E-04	5.84E-04	3.85E-04	3.38E-04	1.40E-04
	kg Sb eq t <sup>-1</sup>	2.38E-04	2.91E-04	1.88E-04	3.59E-04	1.13E-04
Abiotic depletion (fossil fuels)	MJ ha <sup>-1</sup>	1.69E+04	2.09E+04	1.70E+04	2.08E+04	1.79E+04
	MJ t <sup>-1</sup>	1.05E+04	1.04E+04	8.29E+03	2.20E+04	1.46E+04
Global warming (GWP100a)	kg CO <sub>2</sub> eq ha <sup>-1</sup>	1.15E+03	1.44E+03	1.15E+03	1.38E+03	1.19E+03
	kg CO <sub>2</sub> eq t <sup>-1</sup>	7.10E+02	7.15E+02	5.61E+02	1.46E+03	9.67E+02
Ozone layer depletion (ODP)	kg CFC-11 eq ha <sup>-1</sup>	1.62E-04	1.90E-04	1.63E-04	1.79E-04	1.48E-04
	kg CFC-11 eq t <sup>-1</sup>	1.01E-04	9.47E-05	7.94E-05	1.90E-04	1.20E-04
Human toxicity	kg 1.4-DB eq ha <sup>-1</sup>	2.02E+02	2.70E+02	2.02E+02	2.65E+02	2.28E+02
	kg 1.4-DB eq t <sup>-1</sup>	1.25E+02	1.34E+02	9.88E+01	2.80E+02	1.85E+02
Fresh water aquatic ecotoxicity	kg 1.4-DB eq ha <sup>-1</sup>	1.66E+02	1.98E+02	1.66E+02	2.25E+02	2.16E+02
	kg 1.4-DB eq t <sup>-1</sup>	1.03E+02	9.83E+01	8.13E+01	2.38E+02	1.75E+02
Terrestrial ecotoxicity	kg 1.4-DB eq ha <sup>-1</sup>	1.62	1.80	1.63	1.70E+00	1.60E+00
	kg 1.4-DB eq t <sup>-1</sup>	1.00	0.893	0.796	1.80E+00	1.30E+00
Photochemical oxidation	kg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> eq ha <sup>-1</sup>	3.65E-01	4.30E-01	3.66E-01	4.11E-01	3.51E-01
	kg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> eq t <sup>-1</sup>	2.26E-01	2.14E-01	1.79E-01	4.36E-01	2.85E-01
Acidification	kg SO <sub>2</sub> eq ha <sup>-1</sup>	5.99	7.13	6.00	6.61	5.82
	kg SO <sub>2</sub> eq t <sup>-1</sup>	3.71	3.55	2.93	7.01	4.72
Eutrophication	kg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> eq ha <sup>-1</sup>	2.05	2.28	2.05	2.08E	1.92
	kg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> eq t <sup>-1</sup>	1.27	1.14	1.00	2.20	1.55

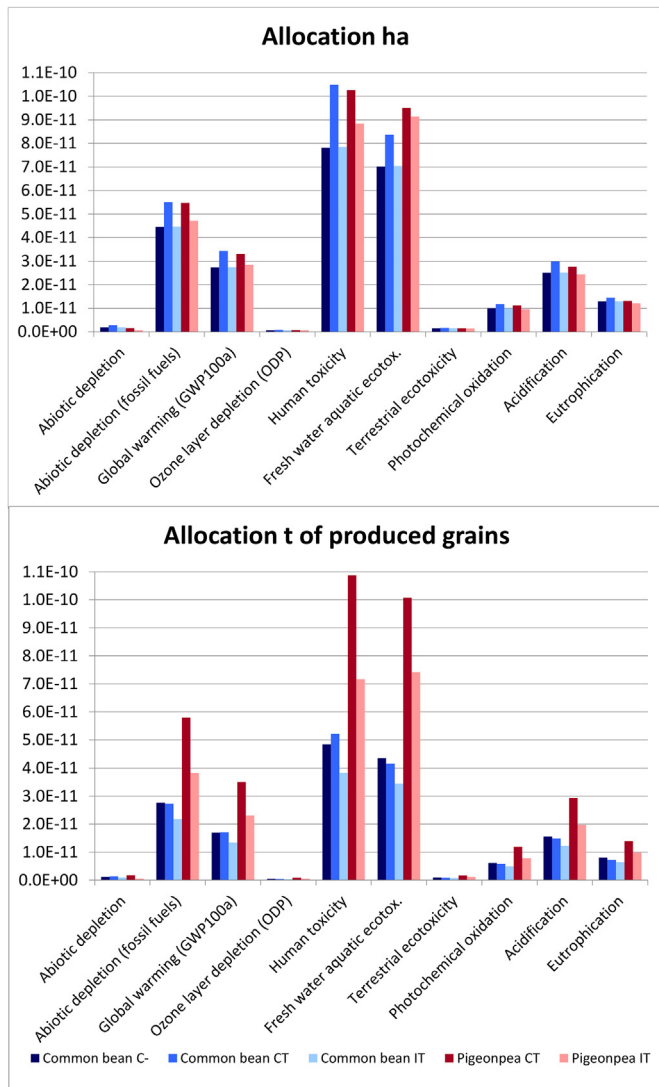
common bean, both for CT and IT in all the categories, due to the smaller yield of Pigeon pea. This result is in agreement with the general observed trend in which the high input-high output agricultural systems show more favourable environmental behaviour (Abeliotis et al., 2013; Cerutti et al., 2011). According to Araujo et al. (2020) and Araujo et al. (2015), inoculation can provide Pigeon pea all the N needed by the crop; moreover, in the two mentioned works, the authors obtained higher yields than in this work. For that, they provided the crop with a higher P and K fertilisation than in this work, up to complete the expected crop nutrients extraction. As a consequence, it can be concluded that the change from CT to IT, plus the increase of the P and K fertilisation in order to cover the expected extractions, could improve Pigeon pea yield, and thus it could also improve the environmental performance of Pigeon pea in the Dominican Republic.

To the best of our knowledge, in the existing literature, there is no other LCA about Pigeon pea production, and thus this is the first time that the environmental effect of Pigeon pea production has been studied. Conversely, there are few LCAs of common bean that are mainly focused on GWP; Adewale et al. (2016) analysed the carbon footprint of a small-scale irrigated vegetable farm in Washington State, USA, in an organic system, thus without phytosanitary treatments, and obtained a value of GWP of 980 kg CO<sub>2</sub> eq ha<sup>-1</sup> for common bean production, which is a 15% lower compared to the 1150 kg CO<sub>2</sub> eq ha<sup>-1</sup> obtained in our study for the IT. Based on a t of common bean grains, the GWP values obtained by Adewale et al. (2016) were 36% lower than ours because the crop yield in USA conditions was higher. Do Carmo et al. (2016) obtained a GWP per ha for irrigated common bean in Brazil that was between 2% and 5% lower than ours depending on the farming system (conventional and integrated, respectively); however, the mentioned authors obtained a higher yield, and thus the difference of the GWP

per t of common bean grain was even higher. Abeliotis et al. (2013) obtained values lower than all the works mentioned above for common bean GWP, which ranged from 289 to 950 kg CO<sub>2</sub> eq ha<sup>-1</sup> depending on the agricultural system and the cultivar.

The contribution of the different agronomic practices to the midpoint impact categories depends on the category analysed and can be observed in Supplementary Material (Fig. S1). Considering the five most impacted categories, for three of them, i.e. abiotic depletion (fossil fuels), GWP and acidification, the phytosanitary treatments and irrigation accounted for the first and second most impactful agronomic practices, whereas the mineral N fertilisation was the third most impactful agronomic practice in the case of the common bean with CT (19% of the total impact), just before the soil tillage; in the case of Pigeon pea with CT, the mineral N fertilisation was the fourth most impactful agronomic practice after the soil tillage. The agricultural system has a very important influence on the contribution of the different agronomic activities in the environmental burdens of agriculture production. For example, Adewale et al. (2016) worked with common bean in an organic system, and thus there was no phytosanitary treatments, but there was a more intense tillage; in such conditions, the highest contribution of carbon footprint corresponded to tillage, followed by organic fertilisation and irrigation. Dekamin et al. (2018) worked with an industrial legume crop such as soybean and introduced the organic fertilisation with manure as an agronomic practice; interestingly, in this case, the main contribution to the GWP derived from manure, followed by the irrigation and the mineral N fertilisation. Canaj et al. (2020) calculated the LCA for tomato production in a greenhouse and observed that for this particular agricultural system, the main environmental burdens to GWP are those derived from fertilisation, tillage, irrigation and phytosanitary treatment, in this order.





**Fig. 3.** Normalised impacts for common bean and Pigeon pea production under two different technologies, conventional (CT) and inoculation (IT); plus, in the case of common bean, a negative control (C-). Environmental impact categories were calculated using the CML-IA method, and the normalisation was based on the reference situation world 2000.

Regarding human toxicity and fresh water aquatic ecotoxicity, the highest environmental burden was due to irrigation instead of to the phytosanitary treatments for all the crops and technologies. The irrigation's environmental burden was mainly due to the electricity needed for the impulsion; Houshyar (2017) and (Abeliotis et al., 2013) arrived to the same conclusion about the environmental burdens of irrigation. For the common bean with CT, the second burden in the category of human toxicity was due to the N fertilisation, although the sum of N, P and K fertilisation exceeded the irrigation impact. For the rest of the common bean scenarios, the P, K fertilisation showed similar impacts to the phytosanitary treatments, whereas for Pigeon pea, the impacts from the phytosanitary treatments were clearly higher than those from fertilisation.

#### 4. Concluding remarks and future prospects

For the two pulses analysed, IT enables mineral N fertilisation to be replaced, producing a significant yield increase in Pigeon pea (by

30%), and even a weak yield increase (less than 2%) in common bean, when compared to the technology used today in the Caribbean. From an environmental viewpoint, the GWP and energy demand for manufacturing one unit of inoculant – defined as the inoculant needed for 1 ha – are less than 1% of those corresponding to the production of mineral N fertiliser. Consequently, this technological substitution reduces the environmental burdens per cropped ha and per produced t, for the five most impacted categories of the CML-IA methodology, although in different percentages. For common bean, the reduction ranged from 16% to 25%, and was similar per ha and per t. For Pigeon pea the reduction ranged from 4% to 14% per ha and from 26% to 34% per t.

However, in the agrosystems analysed, the environmental impact of pulse production due to irrigation and phytosanitary treatments are higher than those of mineral N fertilisation. Moreover, Pigeon pea receives deficit P and K fertilisation in conventional methods, and this restricts the yield and increases the environmental burden per t of grain produced. Thus, future action to improve the environmental performance of pulses in the Caribbean region should include not only the substitution of mineral N fertilisation by inoculation, but also other technological advances. The IT presented in this work is short-term readily available in the Caribbean region and future actions should be focused on logistic optimisation, and on the achievement of sufficient production volume.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

No financial interests nor personal relationships which may be considered as potential competing interests.

#### CRedit authorship contribution statement

**Juan Araujo:** Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Beatriz Urbano:** Formal analysis, Writing - review & editing, Supervision. **Fernando González-Andrés:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Project administration.

#### Acknowledgements

This work has been financially supported by the AECID project 2015 ACDE 001339 (Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo). Juan Araujo received a grant by Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) from the Dominican Republic and by Universidad de León from Spain.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122065>.

#### References

- Abeliotis, K., Detsis, V., Pappia, C., 2013. Life cycle assessment of bean production in the Prespa National Park, Greece. *J. Clean. Prod.* 41, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.09.032>.
- Adewale, C., Higgins, S., Granatstein, D., Stöckle, C.O., Carlson, B.R., Zaher, U.E., Carpenter-Boggs, L., 2016. Identifying hotspots in the carbon footprint of a small scale organic vegetable farm. *Agric. Syst.* 149, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.09.004>.
- Angelopoulos, P.M., Gerogiorgis, D.I., Paspaliaris, I., 2014. Mathematical modeling and process simulation of perlite grain expansion in a vertical electrical furnace. *Appl. Math. Model.* 38, 1799–1822. <https://doi.org/10.1016/j.apm.2013.09.019>.

- Araújo, J., Díaz-Alcántara, C.-A., Urbano, B., González-Andrés, F., 2020. Inoculation with native Bradyrhizobium strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Eur. J. Agron.* 113, e125985 <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125985>.
- Araújo, J., Díaz-Alcántara, C.-A., Velázquez, E., Urbano, B., González-Andrés, F., 2015. Bradyrhizobium yuanmingense related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization. *Sci. Hortic.* 192, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.009>.
- Araújo, J., Flores-Félix, J.D., Igual, J.M., Peix, A., González-Andrés, F., Díaz-Alcántara, C.A., Velázquez, E., 2017. Bradyrhizobium cajani sp. Nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2236–2241. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001932>.
- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., Deaker, R., 2018. Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7521–7539. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9086-2>.
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., Dhiba, D., 2018. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* 9, e1606 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil* 252, 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>.
- Canaj, K., Mehmeti, A., Cantore, V., 2020. LCA of tomato greenhouse production using spatially differentiated life cycle impact assessment indicators: an Albanian case study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 6960–6970. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07191-7>.
- Cerutti, A.K., Bruun, S., Beccaro, G.L., Bounous, G., 2011. A review of studies applying environmental impact assessment methods on fruit production systems. *J. Environ. Manag.* 92, 2277–2286. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.04.018>.
- Checucci, A., DiCenzo, G.C., Bazzicalupo, M., Mengoni, A., 2017. Trade, diplomacy, and warfare: the quest for elite rhizobia inoculant strains. *Front. Microbiol.* 8, e2207 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02207>.
- Chemining'wa, G.N., Vessey, J.K., 2006. The abundance and efficacy of Rhizobium leguminosarum bv. viciae in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biol. Biochem.* 38, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.05.007>.
- Dekamin, M., Barmaki, M., kanooni, A., 2018. Selecting the best environmental friendly oilseed crop by using Life Cycle Assessment, water footprint and analytic hierarchy process methods. *J. Clean. Prod.* 198, 1239–1250. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.115>.
- Díaz-Alcántara, C.-A., Ramírez-Bahena, M.-H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2014. Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.005>.
- diCenzo, G.C., Zamani, M., Checucci, A., Fondi, M., Griffiths, J.S., Finan, T.M., Mengoni, A., 2019. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can. J. Microbiol.* 65, 1–33. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0377>.
- do Carmo, H.F., Madari, B.E., Wander, A.E., Moreira, F.R.B., Gonzaga, A.C. de O., da Silveira, P.M., Silva, A.G., da Silva, J.G., de Almeida, P.L.O.M., 2016. Energy balance and carbon footprint in the conventional and integrated production systems of irrigated common bean. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 1069–1077. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900006>.
- Durlinger, B., Tyszler, M., Scholten, J., Broekema, R., Blonk, H., 2014. Agri-Footprint: a Life Cycle Inventory Database Covering Food and Feed Production and Processing. LCA Food Database. 9th International Conference LCA of Food San Francisco, USA.
- Dwivedi, S.L., Sahrawat, K.L., Upadhyaya, H.D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E.G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M.W., Ortiz, R., 2015. Advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. *Adv. Agron.* 129 <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.09.001>, 1–116.
- FAO, 2018. CROPWAT 8.0. Land and water development division. Food and agriculture organization of the united Nations. Available at: <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/cropwat/es/>, accessed April 7th 2020.
- FAOSTAT, 2020. Food and agriculture data. Food and agriculture organization of the united Nations. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, accessed April 7th 2020.
- Frischknecht, R., Editors, N.J., Althaus, H.-J., Bauer, C., Doka, G., Dones, R., Hischer, R., Hellweg, S., Köllner, T., Loerincik, Y., Margni, M., 2007. Implementation of life cycle impact assessment methods. *Am. Midl. Nat.* 150, 1–151.
- Goglio, P., Smith, W.N., Grant, B.B., Desjardins, R.L., McConkey, B.G., Campbell, C.A., Nemecek, T., 2015. Accounting for soil carbon changes in agricultural life cycle assessment (LCA): a review. *J. Clean. Prod.* 104, 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.05.040>.
- Guinée, J.B., Heijungs, R., Huppes, G., Kleijn, R., de Koning, A., van Oers, L., Wegener Sleswijk, A., Suh, S., Udo de Haes, H.A., de Bruijn, H., van Duin, R., Huijbregts, M.A.J., Gorrée, M., 2001. Handbook on life cycle assessment — operational guide to the ISO standards. *Int. J. Life Cycle Assess.* 6, 255. <https://doi.org/10.1007/BF02978784>.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.
- Herrmann, L., Lesueur, D., 2013. Challenges of formulation and quality of bio-fertilizers for successful inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8859–8873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>.
- Houshyar, E., 2017. Environmental impacts of irrigated and rain-fed barley production in Iran using life cycle assessment (LCA). *Spanish J. Agric. Res.* 15, e0204 <https://doi.org/10.5424/sjar/2017152-9094>.
- IPCC, 2013. IPCC fifth assessment report (AR5) - the physical science basis. The intergovernmental Panel on climate change. <https://dx.doi.org/10.1017/CB09781107415324.004> accessed April 7th 2020.
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F.A., Rebuffo, M., Monza, J., 2019. Selection of competitive and efficient rhizobia strains for white clover. *Front. Microbiol.* 10, e768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>.
- ISO, 2006a. 14044. Environmental Management – Life Cycle Assessment – Requirements and Guidelines. The International Organization for Standardization.
- ISO, 2006b. 14040. Environmental Management—Life Cycle Assessment—Principles and Framework. The International Organization for Standardization.
- Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vilchez, J., Sansinenea, E., Lally, R., Borriss, R., Singh, S., Gupta, V., Fraceto, L., de Lima, R., Singh, H., 2019. Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. *Sci. Total Environ.* 690, 841–852. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.046>.
- Koskey, G., Mburu, S.W., Njeru, E.M., Kimiti, J.M., Ombori, O., Maingi, J.M., 2017. Potential of native rhizobia in enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of eastern Kenya. *Front. Plant Sci.* 8, e443. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00443>.
- Lobo, C.B., Juárez Tomás, M.S., Viruel, E., Ferrero, M.A., Lucca, M.E., 2019. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiol. Res.* 219, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>.
- López-Cano, I., Cayuela, M.L., Sánchez-García, M., Sánchez-Monedero, M.A., 2018. Suitability of different agricultural and urban organic wastes as feedstocks for the production of biochar-Part 2: agronomical evaluation as soil amendment. *Sustainability* 10, e2077. <https://doi.org/10.3390/su10062077>.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P., González-Andrés, F., 2013. Inoculants based in autochthonous microorganisms, a strategy to optimize agronomic performance of biofertilizers. In: Rodelas-González, M.B., González-López, J. (Eds.), *Beneficial Plant-Microbial Interactions*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca-Ratón, FL, pp. 301–328.
- Mulas, D., Seco, V., Casquero, P.A., Velázquez, E., González-Andrés, F., 2015. Inoculation with indigenous rhizobium strains increases yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in northern Spain, although its efficiency is affected by the tillage system. *Symbiosis* 67, 113–124. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0359-6>.
- Nedumaran, S., Abinaya, P., Jyosthnaa, P., Shraavya, B., Rao, P., Bantilan, C., 2015. Grain legumes production, consumption and trade trends in developing countries. ICRIASAT Research Program, Markets, Institutions and Policies Working Paper Series 502, 4–7. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.41>.
- Pastor-Bueis, R., Mulas, R., Gómez, X., González-Andrés, F., 2017. Innovative liquid formulation of digestates for producing a biofertilizer based on *Bacillus siamensis* : field testing on sweet pepper. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 180, 748–758. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700200>.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E.K., González-Andrés, F., 2019. Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain of rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, and genomic-based insights into its agronomic performance. *Front. Microbiol.* 10, e2724 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02724>.
- PRé Sustainability, 2018. About Simapro. <https://simapro.com/about/> accessed 05 february 2020.
- Silva Guzmán, H., González-Andrés, F., Urbano López de Meneses, B., 2009. Optimización de la fertilización mineral en cultivos de regadío de República Dominicana. AECID – Publicaciones INEA, Madrid-Valladolid, Spain.
- Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R., 2016. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. In: *Functional Applications*, vol. 2. Springer, India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>.
- United Nations, 2019. World economic situation and prospects. [https://www.un.org/development/desa/dpad/wp-content/uploads/sites/45/WESP2019\\_BOOK-ANNEX-en.pdf](https://www.un.org/development/desa/dpad/wp-content/uploads/sites/45/WESP2019_BOOK-ANNEX-en.pdf) accessed 05 february 2020.
- Van der Werf, H.M.G., Tzilivakis, J., Lewis, K., Basset-Mens, C., 2007. Environmental impacts of farm scenarios according to five assessment methods. *Agric. Ecosyst. Environ.* 118, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.06.005>.
- Weidema, B.P., Bauer, C., Hischer, R., Mutel, C., Nemecek, T., Reinhard, J., Vadenbo, C.O., Wenet, G., 2013. Overview and Methodology. Data Quality Guideline for the Ecoinvent Database Version 3. Ecoinvent Report 1(v3). Swiss Centre for Life Cycle Inventories. The ecoinvent Centre, St. Gallen, Switzerland.
- Wernet, G., Bauer, C., Steubing, B., Reinhard, J., Moreno-Ruiz, E., Weidema, B., 2016. The ecoinvent database version 3 (Part I): overview and methodology. *Int. J. Life Cycle Assess.* 21, 1218–1230. <https://doi.org/10.1007/s11367-016-1087-8>.



## 4. Compendio de materiales y métodos

### 4.1. Aislamiento, purificación y conservación de simbiontes procedentes del interior de los nódulos

La obtención de rizobios con capacidad para nodular guandul se llevó a cabo a partir de la recolección de nódulos de plantas cultivadas y su posterior aislamiento en el laboratorio. En cada parcela se seleccionaron 15 plantas aleatoriamente en distintos puntos de las parcelas. Las plantas fueron extraídas del suelo con su sistema radicular. Los nódulos con coloración rojiza fueron introducidos en recipientes herméticos con cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) como agente secante.

Para la extracción de los rizobios, los nódulos se rehidrataron en agua destilada durante 6 h a 4 °C. Los nódulos rehidratados se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por 7 minutos, seguida de sucesivos lavados en agua destilada estéril. Los nódulos esterilizados superficialmente fueron aplastados para la liberación de las bacterias viables del interior del nódulo hasta la obtención de una suspensión viscosa de las partes fragmentadas del nódulo. Esta suspensión fue sembrada sobre medio de cultivo YMA (Vincent, 1970). El medio inoculado fue incubado a 28 °C entre 7 y 9 días llevándose a cabo sucesivas resiembras hasta obtener colonias puras. Una vez asegurada la pureza de las cepas, para su conservación a largo plazo, una cantidad adecuada de crecimiento bacteriano fue suspendida en un criotubo con solución salina (0.8 % NaCl peso:vol) estéril a la que se añadió glicerol (30% vol.:vol.) procediendo inmediatamente a su almacenamiento a -80 °C.

### 4.2. Métodos moleculares y no moleculares para la identificación y caracterización de aislados

#### 4.2.1. Extracción del ADN de las cepas de *Bradyrhizobium* para el análisis de RAPD

La extracción del ADN bacteriano se realizó a partir de masa bacteriana crecida sobre medio TY (que contiene para 1 litro triptona-peptona (DIFCO) 5,0 g; extracto de levadura 3,0 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,9 g; pH 7.2) tras su incubación por 7-9 d a 28 °C. La masa bacteriana de cada cepa fue recogida en un tubo Eppendorf, se suspendió en 200  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q estéril y se sometió a una centrifugación a 12.000 rpm durante 30 seg. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de la masa se resuspendió en una solución acuosa al 0,1 % de N-laurilsarcosina y se centrifugó por 4 min a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Para romper las células el sedimento bacteriano se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,05 M y fue sometido a una temperatura de 100 °C durante 4 minutos, pasado este tiempo se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de agua y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. Del sobrenadante obtenido, se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  a un nuevo Eppendorf. Para realizar la purificación y eliminar las proteínas presentes en el medio, se procedió a añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), esta mezcla se agitó y se centrifugó a 12.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos.

La fase superior que quedó después de la centrifugación se pasó a Eppendorf nuevos y se le adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó por agitación y se centrifugó de igual manera. El sobrenadante de la fase superior se transfirió a Eppendorf nuevos para realizar la precipitación del ADN mediante la adición de 0,07  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio

a pH 5,2 (Fluka, Alemania) y 4  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Merck, Alemania), por cada 100  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN rescatada del sobrenadante. La mezcla se agitó suavemente y se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante al menos 12 horas. Pasado este tiempo, se sometió a una centrifugación a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos a 12000 rpm, pasado el tiempo se retiró el sobrenadante, quedando el ADN sedimentado en las paredes del Eppendorf. Para evaporar el etanol de las muestras se secaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h en estufa y posteriormente se disolvió cada pellet en 200  $\mu\text{L}$  de agua Mili-Q estéril. Finalmente se hicieron varias alícuotas de la dilución de ADN para su conservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2. *Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD)*

El marcador molecular RAPD, a pesar de su antigüedad y dependencia de las condiciones de la reacción, lo que le convierte en una técnica inestable en comparaciones inter-laboratorios es de gran utilidad en microbiología. Por tratarse de un marcador dependiente de cepa es el más discriminante que se conoce, salvo los basados en *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*, cuyo desarrollo exige un análisis genómico que cae fuera de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

Los RAPD se utilizaron con las finalidades que se expresan a continuación:

- Realizar un agrupamiento previo de los aislados y reducir el número de cepas que se somete a secuenciación del gen 16S rRNA (Araujo et al. 2015, apartado 2.2, Pág. 24 de esta memoria).
- Comprobar que los aislados AMBPC1010 y AMBPC1040, representantes de la nueva especie descrita (*Bradyrhizobium cajani* sp. nov.) son cepas diferentes y no se trata de clones (Araujo et al. 2017, Pág. 31 de esta memoria).
- Identificar, entre las cepas aisladas del interior de los nódulos en el ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2020a), cuáles corresponden a la cepa inoculada (Araujo et al, 2020a, apartado 2.7.3, Pág. 40 de esta memoria).

En resumen, a partir del ADN extraído de la bacteria, la técnica RAPD se aplicó según el protocolo propuesto por Rivas et al. (2006) con un único cebador, M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'), el cual permite obtener una elevada variabilidad en los patrones de bandas obtenidos. El RAPD se amplificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando el kit "*Dream Taq Green PCR Master Mix*" de Thermo Fischer Scientific, EE.UU. A la *Master Mix* ya preparada se añadieron 1,5  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN molde con una concentración adecuada y 2,5  $\mu\text{L}$  del primer M13 preparado a una concentración 20 mM. Las condiciones de la PCR consistieron en un precalentamiento a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 min, seguido de 35 ciclos con las siguientes fases: desnaturalización a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 min; anillamiento a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 min; extensión a  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 min y una extensión final a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 7 min. En el artículo de Araujo et al. (2020a) se introdujeron algunas modificaciones en las condiciones de la PCR que pueden observarse en el apartado 2.7.3 (Pág. 40 de esta memoria).

Las electroforesis de los amplicones se realizó en geles de agarosa (SeaKem LE, Lonza, EE.UU.) a una concentración de 1,5%. En la electroforesis se usó como tampón único TBE (Tris-borato-EDTA) (tris 12,11  $\text{g l}^{-1}$ , ácido bórico 5,13  $\text{g l}^{-1}$ , EDTA 0,37  $\text{g l}^{-1}$ , de Fluka) con un pH 8,5. El marcador molecular utilizado fue el "*DNA Molecular Weight Marker VI*" (Roche, Alemania) en una dilución

1:4. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un campo eléctrico de 6 V/cm y utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad, EE.UU). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (Sigma, EE.UU) a  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  por un periodo de 30 min y se fotografiaron con luz ultravioleta utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EE.UU).

#### 4.2.2. Secuenciación de determinados genes bacterianos

##### 4.2.2.1. Secuenciación del gen 16S rRNA

Esta metodología se utilizó en todos los trabajos de identificación y caracterización de aislados, como primera fase del proceso de identificación. En consecuencia, se utilizó en los artículos que se indican a continuación, con la finalidad que se expresa.

- Araujo et al. (2015): Se utilizó como única fase en el proceso de identificación de los aislados (Apartado 2.2, Pág. 24 de esta memoria), lo que permitió llegar a la identificación del género al que pertenece, y de manera provisional a la especie.
- Araujo et al. (2017): Se utilizó como primera fase del MLSA (*multilocus sequence analysis*) de los aislados. Condujo a la identificación del género al que pertenece.
- Araujo et al. (2020a): Se utilizó como única fase en el proceso de identificación del aislado AMBPC1040 (Apartado 2.2, Pág. 32 de esta memoria), lo que permitió llegar a la identificación del género al que pertenece.

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con la pareja de primers 27F (5'–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG –3') y 1492R (5'– TACGGYTACCTTGTTACGACTT –3'). La secuenciación del gen se llevó a cabo con los primer 518F (5'– CCAGCAGCCGCGGTAATACG –3') y 800R (5'– TACCAGGGTATCTAATCC –3') (Lane, 1991; Weisburg *et al.*, 1991). Tanto la extracción del ADN como la secuenciación fue llevada a cabo por Macrogen (The Netherlands). El tamaño de la secuencia fue mayor o igual a 1400 pb.

##### 4.2.2.2. Secuenciación de otros genes diferentes al 16S rRNA en el multilocus sequence analysis (MLSA)

En el trabajo Araujo et al. (2017) se secuenciaron otros genes, con el objeto de identificar la especie de pertenencia de las cepas AMBPC1010 y AMBPC1011, con idéntica secuencia en el gen 16S rRNA. Los genes fueron los siguientes: *recA* y *glnII*. Ambos genes se secuenciaron siguiendo la metodología propuesta por Vinuesa et al. (2008). Adicionalmente se secuenció el gen *nodC*, para determinar el simbiovar de pertenencia de las mencionadas cepas; para la secuenciación se utilizó la metodología de Velázquez et al. (2010).

##### 4.2.2.3. Ensamblaje, comparación y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa Seqman (Madison, Wisconsin, USA) y se compararon con las secuencias correspondientes a las cepas tipo depositadas en las bases de datos. Para el gen 16S rRNA la comparación se realizó con la base de datos EzTaxon-e server (Yoon *et al.*, 2017) que solamente incluye secuencias de cepas tipo. Para otros genes se utilizó la base de datos de Genbank (Benson *et al.*, 2013) y el programa BLASTN para la comparación (Altschul *et al.*, 1990). Para los alineamientos múltiples se utilizó el software Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), y las distancias genéticas se calcularon con el modelo denominado *Kimura's two-parameter model* (Kimura, 1980). Los árboles filogenéticos se obtuvieron

mediante el modelo neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) (Saitou & Nei 1987). Todos los análisis filogenéticos se llevaron a cabo con el software Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

#### 4.2.3. Otras técnicas de caracterización molecular

En el trabajo de Araujo *et al.* (2017) se utilizó la técnica de la hibridación DNA-DNA para analizar la similitud entre el ADN de las cepas AMBPC1010 y AMBPC1011 entre sí y con las más próximas en el análisis MLSA. La metodología utilizada fue la indicada por Ezaki *et al.* (1989) y Willems *et al.* (2001). Además, en el mismo trabajo se analizó la composición de bases del ADN con la metodología de Chun y Goodfellow (1995).

#### 4.2.4. Otras técnicas de caracterización de bacterias

En el trabajo de Araujo *et al.* (2017) se utilizaron otras técnicas de caracterización, con el objetivo de cumplir los requisitos establecidos por el Subcomité de Taxonomía de Rhizobia y Agrobacteria para la descripción de nuevos taxa bacterianos. Entre ellos destacan el análisis de los ácidos grasos utilizando el denominado "*Microbial Identification System (MIDI, Microbial ID)*" (Sasser, 2001); la caracterización fenotípica se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos en trabajos previos del género *Bradyrhizobium* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2009; Chahboune *et al.*, 2011; Guerrouj *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

### 4.3. Determinación de la efectividad de la simbiosis entre las cepas de *Bradyrhizobium* y *Cajanus cajan* en condiciones hidropónicas

Este análisis se ha llevado a cabo con la finalidad de detectar, entre los aislados, las cepas de élite por su efectividad en la fijación de N en simbiosis nodular con plantas de guandul. Se ha utilizado en el trabajo de Araujo *et al.* (2015) (Apartado 2.3, Pág. 25 de esta memoria) para seleccionar las cepas ALSPC3050 y ALSPC3051, y también para la selección de las cepas AMBPC1010 y AMBPC1040 (ver apartado 5.3.3. de esta memoria resumen), que se emplearon en los ensayos de campo.

Los aislados obtenidos a partir de los nódulos fueron inoculados en plantas de guandul del cultivar local "Idiaf Primor" en un medio axénico, con un sustrato inerte. Las semillas de guandul fueron desinfectadas superficialmente antes de la siembra en una solución hipoclorito de sodio al 5% durante 7 minutos y posteriormente se realizaron lavados con agua destilada estéril para retirar el agente desinfectante. El sustrato empleado fue vermiculita exfoliada (Verlite, España) empapada previamente en agua destilada y esterilizada en autoclave durante 50 minutos a 121 °C. Se emplearon vasos opacos de polietileno de 1 L de capacidad con orificio inferior colocados sobre un recipiente inferior que sirvió como reservorio de la solución de riego, ambos desinfectados superficialmente con una solución acuosa de etanol al 70%. Cuatro semillas desinfectadas fueron colocadas a dos centímetros de profundidad en la vermiculita ya distribuida en los recipientes. Posteriormente se añadió un volumen de 250 ml de agua destilada estéril en los reservorios para el mantenimiento de la humedad en el sustrato. Siete días después de la siembra se retiraron las plantas emergidas sobrantes para dejar dos plantas de guandul por recipiente. Los nutrientes para la planta fueron aportados en forma de una solución nutritiva estéril (Rigaud y Puppo, 1975) libre de nitrógeno.

El cultivo se llevó a cabo en cámara de crecimiento, donde el fotoperíodo estuvo regulado (16 h de luz y 8 h de oscuridad), al igual que la termoperíodo (26 °C durante las horas de luz y 20 °C durante las de oscuridad) y la humedad relativa, del 65% ± 5%. Las plantas crecieron durante 50 días, al final de los cuales fueron extraídas y su sistema radicular fue lavado. El diseño de los experimentos fue completamente aleatorizado, con dos testigos, uno de ellos sin inocular regado con la solución nutritiva normal y otro testigo también sin inocular, pero añadiendo a la solución de Rigaud nitrógeno químico en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a una concentración de  $1,4 \text{ g l}^{-1}$ . Cada tratamiento constó de 16 plantas, que crecían en 8 vasos.

#### Inoculación de las plantas con los aislados

Cada aislado fue producido de manera independiente en medio YMB para obtener un caldo con una concentración de células de al menos  $10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$  tras 7-9 días de incubación a 28 °C. La inoculación de las plantas se realizó con 1 ml de caldo por planta, aplicados en vermiculita en el entorno de la corona radicular de la plántula siete días después de la siembra del guandul.

#### 4.4. Otras técnicas microbiológicas utilizadas en la evaluación de los soportes o carrier

Para evaluar la supervivencia de las bacterias en el soporte y seleccionar los que mejor *shelf-life* proporcionan (Araujo et al. 2020a) se utilizó la técnica de preparación de suspensiones decimales en solución salina 0,8 % NaCl (peso:vol.) en agua destilada estéril, seguido de plaqueo de 100  $\mu\text{l}$  de la correspondiente suspensión en placas de Petri con medio YMA. Las placas inoculadas fueron incubadas durante 7-9 días en estufa a 28 °C. El conteo se realizó en aquella dilución que presentara entre 20 y 100 colonias separadas, y la concentración fue expresada en UFC por g de inoculante (Apartado 2.5 del artículo de Araujo et al. 2020a, Pág. 39 de esta memoria) o por semilla (Apartado 2.6 del artículo de Araujo et al. 2020a, Pág. 39 de esta memoria).

Los resultados obtenidos fueron transformados mediante logaritmos decimales y sometidos a análisis de varianza (ANOVA) de una vía o a la prueba t de Student, dependiendo del número de estados de variable independiente (ANOVA de una vía para más de dos estados y t de Student para dos estados).

#### 4.5. Diseño experimental de los ensayos de campo

Los 21 ensayos de campo constituyen por la robustez de su diseño y el amplio rango de localizaciones (ambientes en términos estadísticos) que abarcan, el punto más fuerte del presente trabajo. Se encuentran presentes en todos los artículos salvo en el artículo de Araujo et al. (2017).

Las características particulares de cada ensayo de campo, que han sido elegidas para alcanzar los objetivos específicos de cada uno de ellos, figuran en el apartado 7 “Capítulo III. Ensayo en campo para comprobar la efectividad de los inoculantes diseñados en campo”. A continuación, se presentan las características generales del diseño experimental en cada ensayo.



- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2015): El diseño experimental fue bloques completos al azar (*randomized complete block*) con cuatro réplicas. El tamaño de la parcela elemental fue 20 m<sup>2</sup>.
- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2020a): El diseño experimental fue de parcelas subdivididas (*split-split plots*) con tres réplicas, en bloques completos al azar (*randomized complete block*). El tamaño de la parcela elemental fue 49 m<sup>2</sup>.
- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2020b): El diseño experimental fue bloques completos al azar (*randomized complete block*) con cuatro réplicas para el cultivo principal, el guandul, y tres para el cultivo auxiliar utilizado para efectuar comparaciones, que fue la habichuela. Al trabajar en fincas agrarias en explotación comercial, el tamaño de la parcela elemental varió de acuerdo a las características de cada finca; el tamaño mínimo fue 80 m<sup>2</sup> y el máximo 150 m<sup>2</sup>.

### Operaciones agronómicas

Las operaciones agronómicas realizadas aparecen descritas en cada trabajo en particular. En general se trata de las operaciones habituales en el cultivo del guandul, con excepción de la fertilización nitrogenada, que en los tratamientos inoculados es remplazada por la inoculación. Como regla general para el cálculo de las necesidades de fertilización se siguen los criterios de Silva-Guzmán et al. (2009), que corresponden a un proyecto de racionalización de la fertilización mineral en los agrosistemas de la República Dominicana. En los trabajos de Araujo et al. (2015 y 2020a) se incorporan agrosistemas de secano y de regadío, mientras que en el trabajo Araujo et al. (2020b) solamente se trabaja en agrosistemas de regadío.

## 4.6. Parámetros analizados e índices calculados en los ensayos en planta

### 4.6.1. Número y biomasa de nódulos

Los parámetros de nodulación se analizaron en el ensayo en condiciones axénicas y medio hidropónico (apartado 4.3 de esta memoria) que corresponde al trabajo de Araujo et al. (2015). También se analizaron en el ensayo en campo de Araujo et al. (2020a). En este último, el muestreo se realizó cinco semanas después de la nascencia de las plantas, en el inicio de la floración.

Tras un lavado de la raíz bajo el chorro de agua corriente, se retiraron los nódulos, se contó su número y se determinó su biomasa fresca tras la desecación a 70 °C durante 48 horas.

### 4.6.2. Biomasa aérea y contenido de nitrógeno en la biomasa

La determinación de la biomasa aérea y del contenido de N se realizó tanto en el ensayo en condiciones axénicas y medio hidropónico (Araujo et al. 2015), como en todos los ensayos en campo (Araujo et al. 2015, 2020a, b).

La biomasa aérea fresca se determinó inmediatamente después de la recolección de las plantas. La biomasa seca se obtuvo tras un secado a 70 – 80 °C hasta peso constante. La determinación del contenido de N se realizó mediante el método de Kjeldahl.

#### 4.6.3. Cálculo de índices sobre fijación simbiótica de nitrógeno

En el ensayo en condiciones axénicas y medio hidropónico (Araujo et al. 2015) y en el ensayo en campo de Araujo et al. (2020a) se calcularon los siguientes índices:

**Efectividad en la fijación de N de una cepa concreta (%)** =  $100 \cdot [(N \text{ en la biomasa aérea de las plantas inoculadas con la cepa} - N \text{ en la biomasa aérea del control sin N}) / (N \text{ en biomasa aérea del control con N} - N \text{ en biomasa aérea del control sin N})]$

**Nitrógeno derivado de la fijación atmosférica con una cepa concreta (Ndfa %)** =  $100 \cdot [(N \text{ en la biomasa aérea de las plantas inoculadas con la cepa} - N \text{ en biomasa aérea del control sin N}) / N \text{ en biomasa aérea de las plantas inoculadas con la cepa}]$ .

#### 4.6.4. Rendimiento, componentes del rendimiento e índice de cosecha

El rendimiento en grano, sus componentes y el índice de cosecha se determinaron en todos los ensayos de campo (Araujo et al. 2015, 2020a, b). Los componentes del rendimiento determinados fueron los siguientes: i) vainas por planta; ii) semillas por vaina; iii) peso de 100 o 1000 semillas. Por ser el guandul un cultivo en el que se consumen los granos frescos, los rendimientos en grano se han determinado siempre en peso seco en estufa a 80 °C hasta peso constante, puesto que el contenido de humedad presenta variaciones importantes según el momento exacto de muestreo y el tiempo y las condiciones ambientales entre la recolección y el pesado. Además, en los trabajos de Araujo et al. (2015, 2020a), también se han proporcionado los pesos en fresco, ya que se aproxima más a los valores de rendimiento que manejan los agricultores en el campo. El índice de cosecha se determinó como el peso seco del grano dividido entre el peso seco de la biomasa aérea total.

#### 4.7. Análisis estadísticos

Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los resultados de los ensayos en plantas fueron principalmente los basados en el Análisis de Varianza (ANOVA), con el procedimiento denominado “modelo lineal general” (*general linear model*, GLM) del programa informático SPSS statistics V.21.0, salvo indicación expresa en contra. Las características generales de los ANOVAs efectuados en cada uno de los trabajos se destacan a continuación:

- Ensayo en condiciones axénicas y medio hidropónico (Araujo et al., 2015): Se realizó un ANOVA de una vía con el programa informático SPSS statistics V.21.0, utilizando como variable independiente la cepa inoculada.
- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2015) los factores fijos fueron el ambiente y el tratamiento (para la justificación de este análisis en función de los objetivos, ver apartados 7.3.1 y 7.3.2 de la presente memoria resumen).
- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2020a): se realizaron los análisis estadísticos que se indican a continuación (para la justificación de este análisis en función de los objetivos, ver apartados 7.3.1 y 7.3.3 de la presente memoria resumen):
  - Los datos procedentes del ensayo de nodulación se analizaron mediante un análisis de la covarianza (ANCOVA), en el que la concentración en el suelo de rizobios con capacidad de nodular fue considerada una covariable, mientras que los factores fijos fueron la cepa utilizada para la inoculación y el soporte o *carrier* empleado.

- Los datos de rendimiento se analizaron mediante ANOVA en el que ambiente fue considerado un factor aleatorio, mientras que los factores fijos fueron el cultivar de guandul, el tratamiento de inoculación, y el soporte o *carrier* del inoculante.
- Ensayo de campo del trabajo Araujo et al. (2020b): el ambiente fue considerado un factor aleatorio, mientras que la tecnología utilizada fue el factor fijo (para la justificación de este análisis en función de los objetivos, ver apartados 7.3.1 y 7.3.4 de la presente memoria resumen).

Con carácter general, en todas las bases de datos se realizó una prueba de normalidad consistente en aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y una prueba de homocedasticidad basada en la prueba de Levene.

#### 4.8. Análisis del ciclo de vida (ACV)

En el artículo de Araujo et al. (2020b) se utilizó la metodología ACV para analizar los efectos ambientales de: i) la producción del inoculante; ii) el proceso de producción del cultivo del guandul en dos escenarios, con la tecnología convencional y con la tecnología de la inoculación, comparándolo con la producción del cultivo de la habichuela, producto sustitutivo del guandul, en los mismos escenarios, más un tercero basado en la supresión del abonado nitrogenado y sin inoculación.

Para la realización del ACV se siguieron las pautas recogidas en la norma ISO 14044 (ISO, 2006a), que es el estándar oficial de la ISO para la realización de este tipo de estudios (ISO, 2006a). Según la norma ISO 14044, los pasos que deben abordarse de manera secuencial en el ACV son los siguientes:

- 1) Definición del objetivo y el alcance del análisis del ciclo de vida
- 2) Inventario del ciclo de vida (*Life Cycle Inventory, LCI*) de acuerdo a los principios recogidos en ISO (2006b)
- 3) Evaluación del impacto del ciclo de vida (*Life Cycle Inventory Analysis LCIA*)
- 4) Interpretación del ciclo de vida.

Para la realización del inventario ambiental se han utilizado las bases de datos ecoinvent v. 3.2 (Wernet *et al.*, 2016) y Agri-footprint (Durlinger *et al.*, 2014). De las dos etapas a las que se aplicó la metodología del ACV, es decir la fabricación del inoculante por una parte y el proceso de producción vegetal por otra, la base de datos ecoinvent v. 3.2 se utilizó en las dos, mientras que Agri-footprint se empleó para el inventario ambiental del proceso de producción vegetal, y en concreto para los productos fitosanitarios.

Para realizar el ACV se utilizó el software Sima Pro v.9.0 (PRé Sustainability, 2018).

## 5. Capítulo I. Aislamiento de rizobios autóctonos de guandul en República Dominicana, identificación de cepas y pres-selección mediante ensayos preliminares en planta

### 5.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo

El capítulo I cubre los siguientes objetivos específicos

- O.E. 1. Aislar, a partir de nódulos radiculares de cultivos de guandul en República Dominicana, cepas bacterianas autóctonas del grupo de los rizobios, con potencial interés para la producción de inoculantes.
- O.E. 2. 2. Pre-seleccionar entre las cepas aisladas, las más efectivas en fijación de N en condiciones hidropónicas y axénicas, lo que conduce a la optimización de la interacción genotipo de la bacteria – genotipo del guandul y a la creación de una colección de cepas de élite.
- O.E. 3. Identificar taxonómicamente las bacterias de élite seleccionadas en condiciones hidropónicas y axénicas.

### 5.2. Artículos que contribuyen al capítulo

Artículo 1: Araujo et al. 2015

Artículo 2: Araujo et al. 2017

Artículo 3: Araujo et al. 2020a

### 5.3. Resumen de los resultados obtenidos

#### 5.3.1. Aislamiento de cepas

En total se ha establecido una colección de 12 cepas, nueve de ellas procedentes del lugar denominado “La Siembra” en el municipio de Padre las Casas, en la provincia de Azua (República Dominicana) (18° 43' 51" N, 70° 56' 43" W) (Araujo et al. 2015), y otras tres cepas en el distrito municipal de Monte Bonito, también en la provincia de Azua (18° 43' 52" N, 70° 53' 03" W) (Araujo et al. 2017 y Araujo et al. 2020a) (Tabla 5.1. y Figura 5.1).

Los aislamientos se realizaron en parcelas dedicadas a la producción de guandul. Se trata de pequeñas fincas familiares que producen en un sistema de subsistencia, y por tanto no realizan abonados minerales. El único abonado que realizan consiste en el aporte de residuos orgánicos de los animales domésticos, así como residuos sólidos orgánicos procedentes del hogar, sometidos a un proceso de compostaje.

Tabla 5.1. Denominación de las cepas aisladas y lugar de aislamiento.

Denominación de la cepa	Lugar o paraje de aislamiento	Municipio	Provincia
AMBPC1010	Monte Bonito	Monte Bonito	Azua
AMBPC1011	Monte Bonito	Monte Bonito	Azua
AMBPC1040	Monte Bonito	Monte Bonito	Azua
ALSPC3051	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3050	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3031	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3021	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3020	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3041	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3030	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3010	La Siembra	Padre las Casas	Azua
ALSPC3040	La Siembra	Padre las Casas	Azua

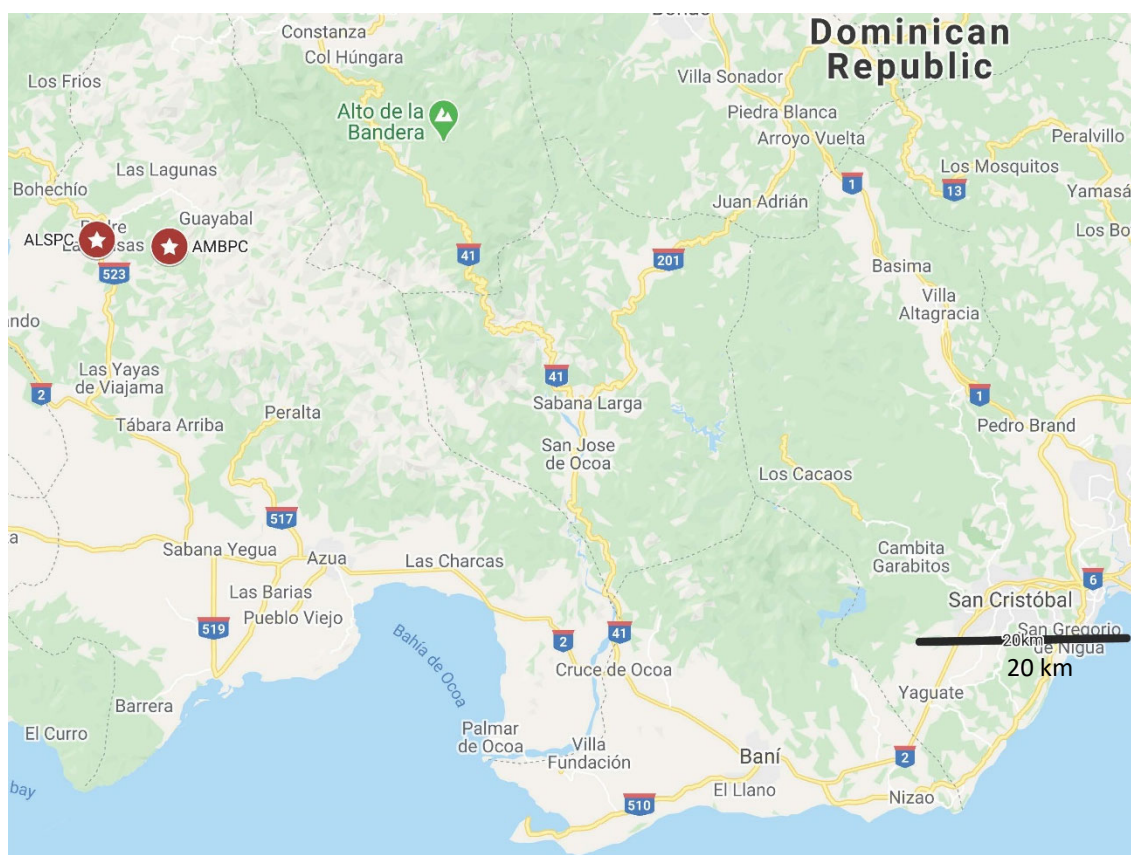


Figura 5.1. Ubicación de los lugares de recolección y aislamiento de cepas a partir del interior de los nódulos de cultivos de guandul. Las dos localidades están situadas en la provincia de Azua. ALSPC corresponde al paraje “La Siembra” en el municipio de Padre las Casas, y AMBPC al municipio de Monte Bonito (Tabla 5.1).

### 5.3.2. Identificación de las cepas aisladas

Todas las cepas aisladas fueron de crecimiento lento, y por tanto pertenecieron al grupo de rizobios denominado “*slow-growing*”. Las 12 cepas pertenecieron al género *Bradyrhizobium*, según se desprende del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA de cada una de ellas. Para algunas cepas, la financiación disponible permitió profundizar en la taxonomía y definir la especie de *Bradyrhizobium* a la que pertenecen, lo que llevó a la descripción de una nueva especie, *B. cajani*.

#### Identificación de las cepas aisladas en “La Siembra” (Padre las Casas, Azua)

Las nueve cepas procedentes del paraje “La Siembra” en el municipio de Padre las Casas, codificadas como ALSPCXXX (Tabla 5.1), fueron sometidas a secuenciación del gen 16S rRNA para proceder a su identificación. La secuencia de bases coincidió al 100% en las nueve cepas, para una longitud de 1323 pb. La comparación contra las secuencias depositadas en la base de datos de cepas tipo EzTaxon<sup>3</sup> arrojó un 99,8% de coincidencia con la cepa tipo de la especie *Bradyrhizobium yunamingense* CCBAU11071<sup>T</sup> (Araujo et al. 2015, Apartado 3.1, Pág. 26 de esta memoria). Además, se llevó a cabo un análisis filogenético de la secuencia problema frente a la de todos los *Bradyrhizobium* depositados en la base de datos EzTaxon, lo que confirmó la estrecha relación de las cepas de este estudio con *B. yunamingense* (Araujo et al. 2015 Fig. 2, Pág. 26 de esta memoria). Por consiguiente, quedaron provisionalmente asignadas a esta especie, a la espera de poder confirmar la taxonomía cuando sea posible realizar un MLSA basado en genes *housekeeping*.

Adicionalmente, se analizó la biodiversidad de las nueve cepas utilizando la técnica de RAPD con el cebador M13, que produce perfiles de bandas cepa-dependientes (Araujo et al. 2015, Fig. 1, Pág. 25 de esta memoria). Se determinó el índice de diversidad de Shannon para cada *locus* RAPD putativo, y el conjunto para todos los *loci*, obteniendo un valor de 0,5735, lo que indica una alta variabilidad inter-cepa.

#### Identificación de las cepas aisladas en Monte Bonito (Azua)

La cepa AMBPC1040 (Tabla 5.1) se presentó por primera vez en el trabajo de Araujo et al. (2020a). La secuencia del gen 16S rRNA se comparó con las depositadas en Genbank<sup>4</sup> arrojando más de un 99% de similitud con respecto a la cepa tipo de varias especies del género *Bradyrhizobium*, por lo que se identificó inequívocamente como perteneciente a este género. Sin embargo, con el análisis del gen 16S rRNA no fue posible identificar la especie y en consecuencia a falta de un análisis taxonómico más profundo que no es objeto del presente trabajo, queda identificada como *Bradyrhizobium* sp.

<sup>3</sup> Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:1613-1617

<sup>4</sup> Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GeneBank. *Nucleic Acids Res.* 41:D36–D42

Además, se realizó un análisis filogenético de la secuencia 16S rRNA de AMBPC1040 junto con otras cepas tipo del género *Bradyrhizobium* y otros tres aislados incluidos en el presente trabajo, en concreto AMBPC1010 y ALSPC3050 (Tabla 5.1), confirmando que AMBPC1040 presenta similitud con varias especies diferentes del género *Bradyrhizobium* (Araujo et al. 2020a, Supplementary Material 2, Figure S.M.2 que se encuentra en el anejo de la presente memoria). Otra información que se obtuvo del árbol filogenético fue la confirmación de que el género *Bradyrhizobium* está dividido en dos grupos denominados I y II. De las tres cepas aisladas en República Dominicana que fueron incluidas en el mencionado árbol filogenético (AMBPC1010, ALSPC3050 y AMBPC1040), las dos primeras pertenecieron al grupo I y la tercera el grupo II.

Las cepas AMBPC1010 y AMBPC1011 (Tabla 5.1) presentaron una secuencia idéntica para el gen 16S rRNA (Araujo et al. 2017). Para descartar que fueran clones se realizó una comparación de sus perfiles RAPD con el cebador M13, obteniendo patrones distintos, por lo que se trata de cepas diferentes. La comparación de la secuencia del gen 16S rRNA con las depositadas en la base de datos de cepas tipo EzTaxon permitió averiguar que pertenecen al género *Bradyrhizobium*. A continuación, se realizó un estudio filogenético con la cepa problema y las cepas tipo del género *Bradyrhizobium*, obteniendo un árbol filogenético en el que la cepa problema forma una rama independiente, con valores de similitud que oscilan entre el 99,0% y el 99,6% respecto a otras cepas tipo de especies del mismo género (Araujo et al. 2017 Fig. 1, Pág 33 de la presente memoria), y por tanto AMBPC1010 y AMBPC1011 quedaron provisionalmente identificadas como *Bradyrhizobium* sp. Con el objeto de avanzar en la identificación se secuenciaron dos genes de los determinados *housekeeping*, que son útiles para discriminar entre especies del género *Bradyrhizobium* con valores elevados de similitud en la secuencia del gen 16S rRNA. Concretamente se analizó la secuencia de los genes *recA* y *glnII*. Se obtuvo un árbol filogenético integrado por las secuencias concatenadas de ambos genes en las cepas problema y en las cepas tipo del género *Bradyrhizobium* (Araujo et al. 2017 Fig. 2, Pág 33 de la presente memoria), observando que AMBPC1010 y AMBPC1011 formaron un linaje independiente del resto. Además, la similitud de las secuencias de las cepas problema frente a otras especies previamente descritas es menor que las similitudes existentes entre las especies de *Bradyrhizobium* ya reconocidas, por lo que se concluyó que no pertenecen a ninguna especie previamente descrita, y por tanto se trata de una especie nueva. Para confirmar este extremo se procedió a realizar experimentos de hibridación de ADN, que confirmaron que AMBPC1010 y AMBPC1011 pertenecen a la misma especie porque presentaron un porcentaje de similitud mediante la mencionada técnica del 82% ( $\pm 3\%$ ). Además, la similitud con las especies del género *Bradyrhizobium* más próximas filogenéticamente fue menor al 70%, que es el valor límite de similitud DNA-DNA a partir del cual se considera pertenencia a la misma especie.

Por lo tanto, al haber confirmado que AMBPC1010 y AMBPC1011 constituyen una nueva especie, se describió la misma bajo la denominación de *Bradyrhizobium cajani* sp. nov. eligiendo como cepa tipo AMBPC1010<sup>T</sup> (Araujo et al. 2017). Para describir la nueva especie se utilizó la normativa del “Comité Internacional para la Sistemática de Procariones / Subcomité de Taxonomía de Rhizobia y Agrobacteria”, efectuando pruebas bioquímicas y obteniendo el perfil de ácidos grasos (Araujo et al. 2017).

### 5.3.3. Selección de cepas de élite en la fijación de nitrógeno mediante ensayos en planta en condiciones axénicas e hidropónicas

La Tabla 5.2 presenta los resultados obtenidos en el ensayo realizado para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno de la simbiosis entre las cepas autóctonas aisladas y el cultivar IDIAF primor. Se seleccionaron las cepas marcadas sobre un fondo azul, que pasaron a ser consideradas “cepas de élite” y se utilizaron en los ensayos de campo. Los criterios de selección fueron: i) efectividad en la fijación de nitrógeno; ii) desarrollo de la parte aérea.

Tabla 5.2. Valores medios y ANOVA de una vía correspondiente a los parámetros utilizados para evaluar la efectividad de la fijación de nitrógeno en condiciones axénicas e hidropónicas. Los valores seguidos por la misma letra no mostraron diferencias significativas en la prueba LSD para  $p < 0,05$ . Con fondo azul están marcadas las cepas que fueron consideradas de élite y son las que se sometieron a ensayos de campo.

Tratamiento (el código corresponde a la cepa según la Tabla 5.1)	Contenido de N en la biomasa aérea			Biomasa aérea total (mg por planta)	Número de nódulos
	mg por planta	Efectividad	Ndfa		
Control con N	63,0 a	100,0		1486 a	0
AMBPC1010	43,2 b	63,1	78,5	1280 b	32 ab
AMBPC1011	30,1 c	38,7	69,1	843 c	15 bcd
AMBPC1040	41,5 b	60,0	77,6	1247 b	25 abc
ALSPC3051	43,0 b	62,8	77,9	1250 b	30 ab
ALSPC3050	42,0 b	60,9	77,1	1214 bc	26 abc
ALSPC3031	40,6 bc	58,3	71,6	1138 bc	33 a
ALSPC3021	32,7 c	43,6	61,6	975 c	20 bc
ALSPC3020	24,2 cd	27,7	46,6	1143 bc	25 abc
ALSPC3041	17,4 de	15,1	42,2	475 d	11 d
ALSPC3030	16,1 def	12,7	41,1	571 d	11 d
ALSPC3010	15,8 ef	12,1	17,0	500 d	12 d
ALSPC3040	11,2 ef	3,5	78,4	525 d	10 d
Control sin N	9,3 f			336 d	0
Cuadrados medios	2862,465			1325,854	854,325
Nivel de significación*	***			***	***
Grados de libertad	13			13	13

\*\*\*\* significativo para  $p < 0,001$



## 6. Capítulo II. Optimización de la formulación del inoculante

### 6.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo

- O.E. 4. Diseñar una formulación sólida para recubrir la semilla en campo en el momento de la siembra, por ser la estrategia que mejor se adapta al nivel tecnológico del cultivo del guandul en la República Dominicana.
- O.E. 6. Desarrollar hasta un TRL 5 (Technology Readiness Level), el proceso de producción del inoculante para cultivos de guandul en la República Dominicana.

### 6.2. Artículos que contribuyen al capítulo

Artículo 3: Araujo et al. 2020a

Artículo 4: Araujo et al. 2020b

### 6.2. Resumen de los resultados obtenidos

El modelo de inoculante elegido es un producto en estado sólido que requiere una temperatura de 4-6 °C para su conservación, y que está destinado a recubrir las semillas. El inoculante se suministra de manera independiente a las semillas, y el agricultor debe realizar el recubrimiento justo antes de la siembra. Este modelo ha sido elegido teniendo en cuenta las características de los agrosistemas dominicanos, según se justifica en el apartado 1.5.2.

El producto está constituido por dos componentes: i) el inoculante propiamente dicho que tiene una consistencia pulverulenta y que consta del soporte o *carrier* y el caldo inoculante junto con los protectores celulares en una proporción del 50 % (volumen:peso); ii) el pegamento para unir el componente pulverulento a la semilla, constituido por goma arábica en solución acuosa del 40% (peso:volumen) (Araujo et al. 2020b Tabla 1 y Fig. 1, Págs. 51 y 52 de la presente memoria).

El diseño de la formulación se realizó en dos fases (Tabla 6.1). La primera llegó hasta un TRL4 y consistió en la optimización del soporte o *carrier* (corresponde al artículo de Araujo et al., 2020a). La segunda fase llegó hasta un TRL5 y consistió en el diseño del proceso productivo a escala piloto valorando los efectos ambientales del uso y transporte de las materias primas, así como la disponibilidad de las mismas, y considerando también la viabilidad económica de la propuesta (corresponde al artículo de Araujo et al., 2020b).

#### 6.2.1. Selección del soporte o *carrier* a escala de laboratorio – TRL4 (Araujo et al. 2020a)

##### Supervivencia de las cepas del inoculante durante el *shelf-life*

El primer aspecto analizado fue la evolución de la supervivencia de las bacterias en los soportes elegidos, durante el tiempo de almacenamiento (0 a 365 días) a 4- 6 °C, lo que se denomina *shelf-life*. Se trabajó con dos cepas pertenecientes a dos ramas diferentes en el árbol filogenético obtenido con la secuencia del gen 16S rRNA (Araujo et al. 2020a, Supplementary Material 2, Figure S.M.2 que figura en el anejo de esta memoria): ALSPC3051 y AMBPC1040. Los soportes analizados, todos ellos esterilizados antes de la inoculación, fueron: i) Biochar de

Tabla 6.1. Fases del diseño y optimización de la formulación de los inoculantes de guandul en el presente trabajo.

Componente de la formulación	TRL 4 (Araujo et al. 2020a)		TRL 5 (Araujo et al. 2020b)	
	Tecnología disponible	Mejora tecnológica	Tecnología disponible	Mejora tecnológica
Medio de cultivo para el proceso de producción del caldo inoculante por fermentación	Medio YMB ( <i>yeast mannitol broth</i> )	No se realizó ninguna mejora en esta fase	Medio YMB ( <i>yeast mannitol broth</i> )	Medio basado en residuos (melaza y digerido anaerobio y levadura de cerveza)
Soporte o <i>carrier</i>	Turba	Evaluación de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biochar de corteza de pino</li> <li>• Biochar de lodo de EDAR*</li> <li>• Estiercol de ave</li> <li>• Perlita</li> </ul> Selección de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biochar de corteza de pino</li> <li>• Perlita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biochar de corteza de pino</li> <li>• Perlita</li> </ul>	Se eligió perlita por cuestiones logísticas

\*Estación Depuradora de Aguas Residuales

corteza de pino; ii) Biochar de lodo de Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR); iii) Estiércol de ave; iv) Perlita como control.

En todos los casos se utilizó como protector celular goma garrofín (1% peso:volumen) y otro disacárido actualmente bajo secreto industrial (1% peso:volumen). Estos protectores fueron seleccionados por el grupo de investigación IQUIMAB en trabajos ajenos a esta Tesis Doctoral, aunque se citaron por primera vez, como trabajo no publicado, en Araujo et al. 2020a.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de supervivencia de las dos cepas analizadas.

Los soportes que mejor mantuvieron la viabilidad a lo largo del tiempo fueron la perlita, que actuaba como control, y el biochar de corteza de pino (Araujo et al. 2020a Fig. 1 y Tabla 3, Págs. 41 y 42 de esta memoria). En estos dos casos la pérdida de viabilidad fue menor a dos unidades logarítmicas en el período completo y se mantuvo superior a  $1 \times 10^8$  ufc  $g^{-1}$  al final del período de 365 días. Incluso, curiosamente, la supervivencia fue estadísticamente superior (prueba de Tukey  $p \leq 0.05$ ) para el soporte constituido por biochar de corteza de pino, en todos los muestreos salvo el primero, donde la superioridad correspondió a la perlita.

El estiércol de ave esterilizado, produjo una pérdida de viabilidad muy rápida; el biochar de lodo de EDAR produjo también una pérdida de viabilidad inadmisibile, que se hizo muy patente desde el día 90 en adelante (Araujo et al. 2020a Fig. 1 y Tabla 3, Págs. 41 y 42 de esta memoria).

#### Supervivencia de las cepas del inoculante en la cubierta de las semillas tras la inoculación

En general se recomienda a los agricultores sembrar la semilla inoculada justo después de la inoculación y secado a temperatura ambiente, lo más fresca posible y siempre protegidas del sol directo, para evitar pérdidas de viabilidad. Sin embargo, la supervivencia del inóculo en la semilla, en condiciones de desecación, proporciona una información importante sobre la capacidad de protección que tiene la formulación. La disminución de la viabilidad presentó una pendiente constante a lo largo del período, si bien a partir del día 9 (ALSPC3051) y del día 12 (AMBPC1040) la formulación con biochar de corteza de pino mantuvo mejor la viabilidad que la perlita, siendo las diferencias observadas estadísticamente significativas (Araujo et al. 2020a Fig. 2, Pág. 42 de esta memoria).

#### Efecto de la formulación en el comportamiento en campo

El efecto de la formulación en el comportamiento en campo se evalúa en Capítulo 3 relativo a ensayos en campo.

#### 6.2.2. Definición del proceso productivo del inoculante a escala de planta piloto - TRL5 (Araujo et al. 2020b)

El proceso de producción y formulación del inoculante se definió a escala piloto. Para la producción del caldo inoculante se empleó un fermentador piloto de 22,2 litros de capacidad, diseñado y construido por el grupo de investigación IQUIMAB de la Universidad de León, en el que se desarrolló el presente trabajo (Figura 6.1).



Figura 6.1. Fermentador piloto con reactor de 22,2 l de capacidad, diseñado por el grupo de investigación IQUIMAB, en el que se produjeron los inoculantes a escala piloto.

El diagrama de flujo del proceso productivo se presenta en la Fig. 1 del trabajo Araujo et al. (2020b) (Pág. 52 de la presente memoria). Las materias primas para la fabricación están en la Tabla 1 del trabajo Araujo et al. (2020b) (Pág. 51 de la presente memoria). Partiendo de la tecnología disponible y técnicamente viable, la elección de las materias primas que aparecen en el trabajo de Araujo et al. (2020b) (Tabla 2, Pág. 53 de la presente memoria), se hizo teniendo en cuenta criterios de: i) disponibilidad de materias primas durante el proceso de escalado de la producción; ii) coste de las materias primas. Los principales resultados se presentan a continuación.

#### Composición del medio de cultivo para la producción del inoculante

Se utilizaron residuos, por la inviabilidad económica de utilizar medio sintético. La composición fue un 2,3 % (vol.:vol.) de melazas de caña de azúcar y 1,2 % (vol.:vol.) de vinazas de producción de cerveza.

#### Soporte o carrier

A pesar de los datos obtenidos en el análisis de supervivencia durante el almacenamiento y en las semillas fueron ligeramente más favorables para el biochar de corteza de pino que para la perlita (Araújo et al. 2020a y resumen en el apartado 6.2.1 de esta memoria), la falta de disponibilidad local del biochar, al menos a corto plazo, condujo a la elección de la perlita.



## 7. Capítulo III. Ensayo en campo para comprobar la efectividad de los inoculantes diseñados

### 7.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo

- O.E. 5 Analizar el efecto agronómico de los inoculantes desarrollados mediante 21 ensayos de campo en agrosistemas situados en las zonas con mayor producción de guandul en la República Dominicana, seleccionando diversos factores como la cepa y la formulación, y utilizando como covariable el nivel de rizobios nativos en el suelo, para la evaluación de la efectividad de los inoculantes.

### 7.2. Artículos que contribuyen al capítulo

Artículo 1: Araujo et al. 2015

Artículo 3: Araujo et al. 2020a

Artículo 4: Araujo et al. 2020b

### 7.3. Resumen de los resultados obtenidos

#### 7.3.1. Descripción de la estructura de los ensayos de campo

Los ensayos de campo han sido estructurados en tres fases. En cada fase se ha producido un avance respecto a la anterior en la formulación del inoculante y en el escalado de la tecnología. Por tanto, el objetivo transversal que vertebra todos los ensayos de campo es diseñar un inoculante que pueda ser transferido de manera inmediata al sector, para cumplir con los compromisos adquiridos con los proyectos de I+D+i que han financiado este trabajo. Los factores fijos y aleatorios analizados en cada uno de los tres ensayos de campo se presentan, en la Tabla 7.1 y la ubicación de los mismos en la Figura 7.1.

**Tabla 7.1. Resumen de los ensayos de campo realizados con indicación de la ubicación de cada uno de ellos, los factores fijos y aleatorios analizados en el correspondiente ANOVA, y las cepas involucradas.**

Identificación del ensayo	Nº ambientes	Provincia de ubicación	Factores fijos	Factores aleatorios	Cepas (Tabla 3.1)
Araujo et al. (2015)	4	San Juan de la Maguana (1) Sto. Domingo Oeste (1) Azua (2)	Ambiente Inoculación <sup>♦</sup>	Repetición	ALSPC3051 ALSPC3050
Araujo et al. (2020a)	8	San Juan de la Maguana	Inoculación Cultivar Formulación <sup>♥</sup>	Ambiente Repetición	ALSPC3051 AMBPC1010 AMBPC1040
Araujo et al. (2020b)	9	Azua	Tecnología <sup>♣</sup>	Ambiente Repetición	AMBPC1010

<sup>♦</sup> Los tratamientos fueron las diferentes cepas utilizadas en el inoculante, más los dos controles sin inocular, uno de ellos sin fertilizar con N, y el otro fertilizado con N

<sup>♥</sup> El factor analizado fue el soporte o *carrier* con dos alternativas: biochar de corteza de pino y perlita

<sup>♣</sup> La comparación tecnológica fue entre la tecnología convencional y tecnología de inoculación

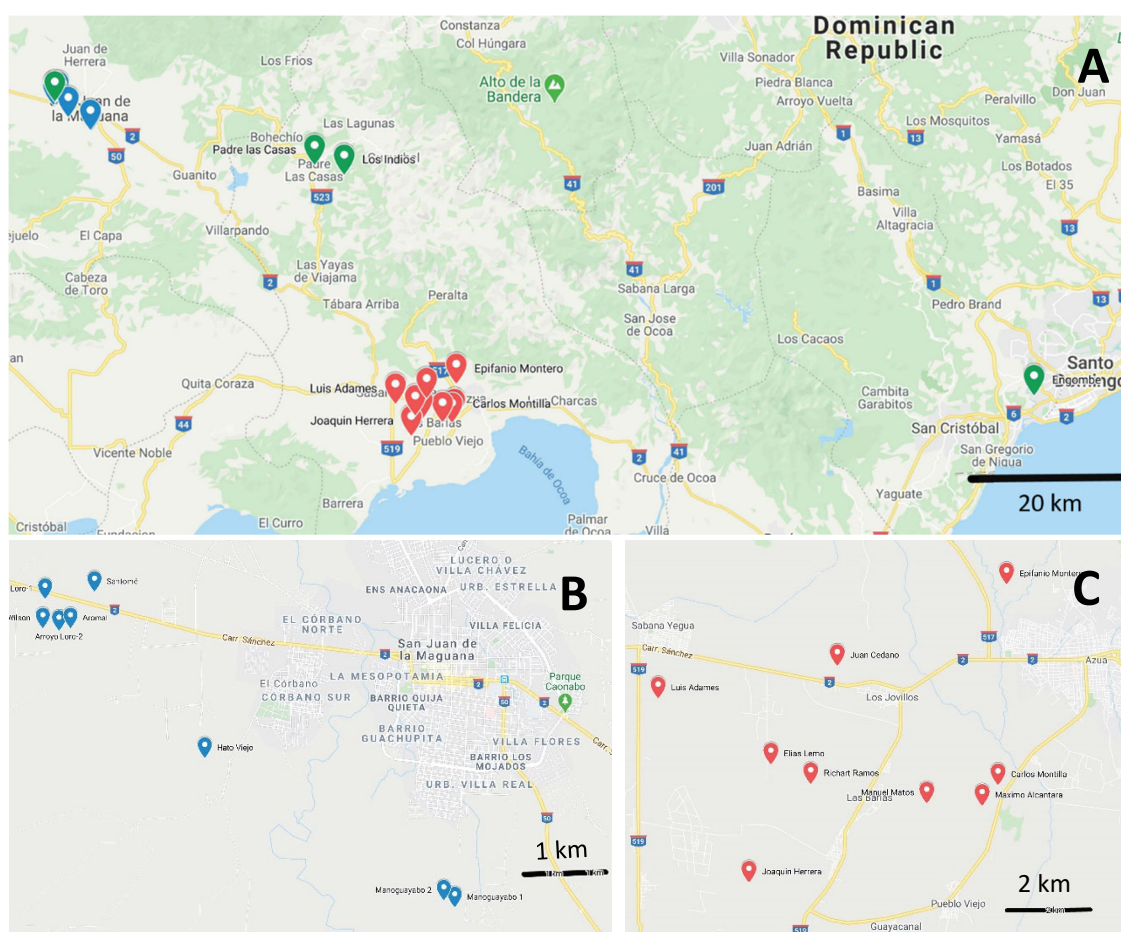


Figura 5.1. A) Ubicación de los lugares donde se realizaron los ensayos campo con guandul. Los de color verde corresponden al trabajo Araujo et al. (2015) compuesto por cuatro ensayos, los de color azul al trabajo Araujo et al. (2020a) (8 ensayos) y los de color rojo a Araujo et al. (2020b) (nueve ensayos). B) y C) son detalles correspondientes a la distribución de los ensayos de los trabajos Araujo et al. 2020 a, b respectivamente.

### 7.3.2. Primer ensayo de campo (Araujo et al., 2015)

El primero de los ensayos de campo (Araujo et al., 2015) tuvo como objetivo evaluar de forma preliminar la efectividad de la inoculación, con cepas autóctonas, en el cultivo de guandul en la República Dominicana. No existe ningún antecedente en la región del Caribe sobre inoculación de guandul, ni tampoco existen recomendaciones de inoculación con cepas alóctonas. Ante esta situación, el método científico aplicado consistió en realizar un ensayo de campo en varios ambientes diferentes, siendo los tratamientos a evaluar la inoculación con dos de las cuatro cepas más efectivas en fijación de nitrógeno en condiciones hidropónicas y axénicas (apartado 5.3.3), junto con los correspondientes controles. Los ambientes fueron representados por cuatro parcelas representativas de los diferentes agrosistemas en los que suele cultivarse el guandul en la República Dominicana (Tabla 7.2) En estas condiciones, en el ANOVA realizado, se consideró el ambiente como un factor fijo. La consideración del ambiente como factor fijo o aleatorio es un aspecto discutible, sometido a debate. En general se estima que si el ambiente ha sido escogido al azar debe considerarse un factor aleatorio, pero si, como sucede en trabajo de Araujo et al. (2015), los ambientes representan a agrosistemas concretos, en los que la

respuesta del cultivo es objeto de análisis, entonces debe ser considerado un factor fijo. En el presente ensayo de campo, la formulación del inoculante no ha sido objeto de análisis; se ha utilizado como soporte o *carrier* turba, que es el soporte más tradicional, aunque de difícil acceso en la República Dominicana.

Tabla 7.2. Características socio-agronómicas de cada una de las parcelas en las se han realizado los ensayos de campo del trabajo Araujo et al. (2015). En su conjunto representan los diferentes agrosistemas en los que suele cultivarse el guandul en la República Dominicana. Para datos edafológicos de cada parcela ver Tabla 1 del mencionado trabajo (Pág. 24 de esta memoria).

Identificación de la parcela	Descripción
Padre Las Casas (provincia Azua)	Parcela representativa de los pequeños productores con amplia tradición del cultivo de guandul; las rotaciones incluyen con frecuencia este cultivo. El análisis del suelo (Araujo et al., 2015, Tabla 1) demostró que en el suelo existen rizoibos con capacidad de nodular guandul en cantidad superior a $1 \times 10^4$ ufc g de suelo <sup>-1</sup>
Arroyo Loro (provincia San Juan de la Maguana)	Parcela situada en la zona del país especializada agrícolamente en la producción de leguminosas (habichuela y guandul). En la parcela se cultiva guandul de manera esporádica, pero no está tan especializada como la anterior en la producción de guandul
Los Indios (provincia Azua)	Parcela con características similares a la anterior (Arroyo Loro) pero ubicada en otra provincia, Azua
Engombe (provincia Santo Domingo Oeste)	Finca experimental de la Universidad Autónoma de Santo Domingo, en la que no existe tradición del cultivo del guandul, pero donde existe un elevado nivel tecnológico y se cultiva en regadío.

Los resultados del ANOVA se presentan en el trabajo de Araujo et al. (2015) (Tabla 3, Pág. 27 de la presente memoria), donde se observa que la localidad (ambiente) tiene un efecto significativo en el rendimiento y en dos componentes del mismo (vainas por planta y semillas por vaina). Por su parte, el tratamiento también produjo diferencias significativas en el rendimiento y los mismos componentes del rendimiento que en el caso anterior. Además, la localidad (ambiente) presenta una interacción significativa con el tratamiento de inoculación para los parámetros de rendimiento y vainas por planta.

En la Tabla 4 del trabajo Araujo et al. (2015) (Pág. 28 de la presente memoria) se presentan los valores medios obtenidos para el rendimiento y los componentes del rendimiento en los diferentes tratamientos de inoculación y en los diferentes ambientes. En tres de los cuatro ambientes (todos los ambientes excepto Padre Las Casas), los tratamientos de inoculación y la fertilización con N tuvieron un efecto significativo en el incremento del rendimiento comparado con el control sin inocular y sin fertilizar. En ninguno de estos tres ambientes se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con cualquiera de las dos cepas y el control fertilizado con N. Por el contrario, en la localidad de Padre Las Casas no hubo respuesta ni a la fertilización con N ni a la inoculación, en comparación con el control no inoculado y no fertilizado, lo que se atribuye a la presencia en el suelo de rizobios infectivos y efectivos en la fijación de N.



### 7.3.3. Segundo ensayo de campo (Araujo et al., 2020a)

El resultado obtenido en el trabajo de Araujo et al. (2015) demostró que la inoculación con cepas autóctonas es efectiva en términos de rendimiento del cultivo, excepto cuando existe presencia en el suelo de rizobios infectivos y efectivos, lo que fue poco frecuente en los agrosistemas analizados (solamente un 25% de los mismos). Partiendo de esta base, el segundo ensayo de campo (Araujo et al., 2020a) tuvo como objetivo avanzar en el diseño y evaluación de los inoculantes para guandul en la República Dominicana. Se evaluó, en ocho ambientes diferentes (fincas ubicadas en diferentes localidades), el efecto simultáneo de tres variables: i) el cultivar de guandul; ii) el soporte para la formulación del inoculante: biochar de corteza de pino o perlita (ver apartado 6.2.1 de esta memoria, y artículo de Araujo et al., 2020a, apartados 3.2 y 3.3 para detalles sobre la preselección de estos dos soportes, Págs. 41 y 42 de esta memoria resumen); iii) el tratamiento de inoculación con cepas autóctonas, frente a dos controles sin inocular, el primero de ellos sin fertilizar con N y el segundo fertilizado con N. En total los tratamientos de inoculación fueron tres, correspondientes a tres cepas diferentes (Tabla 7.1); de las tres cepas una procede del trabajo de Araujo et al. (2015), en concreto ALSPC3051, y fue seleccionada por ser la que mejor resultado produjo en los ensayos de campo de ese artículo científico. Las otras dos cepas autóctonas fueron AMBPC1010 (Araujo et al. 2017) y AMBPC1040 citada por primera vez en el trabajo de Araujo et al. (2020), elegidas por ser cepas de élite en base a su eficiencia de fijación de nitrógeno en condiciones axénicas e hidropónicas (Tabla 5.2).

El ambiente se consideró un factor aleatorio porque las parcelas no se eligieron con la finalidad de representar ningún tipo de condiciones edafoclimáticas ni agronómicas concretas, sino que la selección fue completamente al azar, con la única condición de que estuvieran ubicadas en la provincia de San Juan de la Maguana (Figura 7.1), que es una región especializada en la producción de legumbres para consumo humano en la República Dominicana.

En cuanto a las variables dependientes analizadas, se evaluaron dos tipos de variables: i) parámetros de nodulación cinco semanas después de la emergencia de las plántulas, y ii) parámetros de rendimiento del cultivo. Los parámetros de nodulación se analizaron en tres localidades con niveles diferentes de rizobios nativos con capacidad de nodular al guandul, mientras que los parámetros de rendimiento se analizaron en los ocho ambientes. En la Tabla 7.3 se presenta el tipo de variables dependientes analizadas en cada una de las parcelas. También en dicha Tabla se indican las cepas seleccionadas para cada tipo de análisis. Como puede observarse en el análisis de nodulación solamente se analizaron dos de las tres cepas por razones logísticas y de optimización de los recursos económicos y humanos disponibles; el criterio para la selección de ALSPC3051 y AMBPC1040 es que pertenecen a diferentes ramas en el árbol filogenético construido a partir de la secuencia del gen 16S rRNA (Araujo et al. 2020a apartado 3.1, Pág. 41 de esta memoria).

#### Resultados obtenidos para los parámetros de nodulación

En el análisis de los parámetros de nodulación, las variables independientes fueron el soporte o *carrier* utilizado en la formulación y la cepa bacteriana, mientras que los rizobios presentes en el suelo con capacidad de nodular el cultivo fueron considerados una covariable. Las variables dependientes analizadas fueron: i) el número de nódulos por planta; ii) la biomasa seca de nódulos por planta y iii) el porcentaje de ocupación del nódulo por la cepa inoculada.

Tabla 7.3. Tipo de variables dependientes que se analizaron en las diferentes parcelas, situadas en la provincia de San Juan de la Maguana, y cepas que empleadas en cada uno de los estudios.

Denominación de la parcela	Rizobios nodulantes (UFC g suelo <sup>-1</sup> )*	Interpretación del nivel de rizobios nodulantes	Cepas utilizadas	
			Análisis nodulación	Análisis rendimiento
Arroyo Loro-1	$5.8 \times 10^2$	Intermedio ( $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^3$ )	ALSPC3051 AMBPC1040	Las 3 cepas
Arroyo Loro-2	$1 \times 10^3$	Intermedio ( $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^3$ )	no	Las 3 cepas
Santomé	$3.1 \times 10^4$	Alto ( $>1 \times 10^4$ )	ALSPC3051 AMBPC1040	Las 3 cepas
Aromal	$1.7 \times 10^1$	Bajo ( $<1 \times 10^2$ )	no	Las 3 cepas
Wilson	$5.8 \times 10^1$	Bajo ( $<1 \times 10^2$ )	no	Las 3 cepas
Hato Viejo	$1.7 \times 10^4$	Alto ( $>1 \times 10^4$ )	no	Las 3 cepas
Managuayabo-1	$3.1 \times 10^1$	Bajo ( $<1 \times 10^2$ )	ALSPC3051 AMBPC1040	Las 3 cepas
Managuayabo-2	$1.7 \times 10^1$	Bajo ( $<1 \times 10^2$ )	no	Las 3 cepas

\*Determinados mediante la técnica de número más probable. UFC significa Unidades Formadoras de Colonias

La estadística realizada fue un análisis de la covarianza (ANCOVA) (Tabla 4 del trabajo Araujo et al. 2020a, Pág. 43 de esta memoria). El ANCOVA permite conocer el efecto de las variables independientes, controlando el efecto de la covariable, es decir el número de rizobios nodulantes en el suelo. Los valores obtenidos para el estadístico denominado “*partial ETA squared*” pusieron de manifiesto que la covariable tuvo un efecto moderado pero significativo en las tres variables dependientes. Por tanto, el siguiente paso fue comparar los valores medios obtenidos por dichas variables dependientes para los tres niveles de la covariable (menos de  $1 \times 10^2$  ufc x g de suelo<sup>-1</sup>; entre  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^3$  ufc x g de suelo<sup>-1</sup>; más de  $1 \times 10^4$  ufc x g de suelo<sup>-1</sup>). La comparación se realizó mediante un ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey (Fig. 3 del trabajo Araujo et al. 2020a, Pág. 44 de esta memoria). El número de nódulos y la biomasa seca de nódulos fue significativamente más bajo en el suelo con menos de  $1 \times 10^2$  ufc de rizobios nodulantes por g de suelo, y significativamente más elevado en el suelo con más de  $1 \times 10^4$  ufc x g de suelo<sup>-1</sup>; justamente lo contrario sucedió con la ocupación por parte de la cepa inoculada, que alcanzó el 88,7% en el suelo con menor concentración de rizobios con capacidad de nodular y 27,0% en el que tiene mayor concentración. Los resultados obtenidos sobre la ocupación de los nódulos mediante análisis RAPD se presenta en (Araujo et al. 2020a, Supplementary Material 3, Figure S.M.3, que figura en el anejo de esta memoria)

Por el contrario, las variables independientes tuvieron un efecto muy pequeño (menor al 1.5%) sobre las variables dependientes, y no fue significativo. En consecuencia, se puede afirmar que ni el *carrier* ni la cepa utilizada tuvieron efectos significativos en el número de nódulos, la masa seca de nódulos o la ocupación del nódulo por parte de la cepa inoculada, lo que se comprobó mediante una prueba de Bonferroni sobre las medias marginales estimadas para estos parámetros (Tabla 5 del trabajo Araujo et al. 2020a, Pág. 43 de esta memoria).

#### Resultados obtenidos para los parámetros de rendimiento al final del ciclo de cultivo

Los resultados obtenidos al final del ciclo del cultivo, relativos al rendimiento y sus componentes, se analizaron mediante ANOVA (Araujo et al. 2020a, Tabla 6, Pág. 44 de esta memoria).

El cultivar produjo diferencias altamente significativas en tres componentes del rendimiento (vainas por planta, semillas por vaina y peso de 1000 semillas) y significativas en el índice de cosecha, pero el rendimiento final no difirió significativamente entre cultivares (Araujo et al. 2020a, Tablas 6 y 7, Págs. 44 y 45 de esta memoria).

La estrategia de fertilización produjo diferencias altamente significativas en el rendimiento y en dos de los componentes del rendimiento, el número de vainas por planta y el número de semillas por vaina; también en el índice de cosecha (Araujo et al. 2020a, Tabla 6, Pág. 44 de esta memoria). El resultado más relevante en términos agronómicos fue que el rendimiento de los tratamientos inoculados superó entre un 39% y un 46% al del control sin inocular y sin fertilizar con N. Las diferencias fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, el rendimiento de los tratamientos inoculados no difirió del rendimiento del control fertilizado con N y sin inocular (Araujo et al. 2020a, Tabla 7, Pág. 45 de esta memoria).

El *carrier* empleado no afectó significativamente al rendimiento, ni a ninguno de sus componentes, ni al índice de cosecha; tan solo afectó de manera débilmente significativa al contenido de N en las semillas, que fue ligeramente superior cuando se utilizó biochar de corteza de pino (Araujo et al. 2020a, Tablas 6 y 7, Págs. 44 y 45 de esta memoria).

Por otra parte, no existieron interacciones entre las variables independientes, para ninguna de las combinaciones posibles, en ninguno de los parámetros analizados (Araujo et al. 2020a, Tabla 6, Pág. 44 de esta memoria).

A pesar de que el ambiente es un factor aleatorio, las diferentes parcelas presentan diferentes niveles de rizobios nativos nodulantes. Por tanto, es relevante analizar el rendimiento obtenido en los diferentes suelos para las diferentes estrategias de fertilización, ya que proporciona una información valiosa sobre la efectividad de la inoculación en función del nivel de rizobios con capacidad de nodular que residen en el suelo (Araujo et al. 2020a, Fig. 4, Pág. 44 de esta memoria). Los resultados indican que la fertilización con N mineral y la inoculación, tienen un efecto significativo sobre el rendimiento, originando un aumento del mismo, en los seis suelos con menos de  $1 \times 10^3$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>, pero no en los dos con más de  $1 \times 10^4$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo de campo indican que, en términos de rendimiento del cultivo, existe respuesta a la inoculación siempre que la densidad de rizobios nativos en el suelo con capacidad de formar nódulos en guandul sea igual o inferior a  $1 \times 10^3$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>. En suelos con bajo contenido de rizobios con capacidad de nodular al guandul, las cepas autóctonas utilizadas no producen diferencias significativas en el rendimiento, y tampoco las origina el soporte utilizado en la formulación del inoculante.

#### 7.3.4. Tercer ensayo de campo (Araujo et al., 2020b)

El tercer ensayo de campo sirvió para comprobar la efectividad de la tecnología de la inoculación, aunque la finalidad del trabajo de Araujo et al. (2020b) fue analizar el impacto ambiental de la inoculación como práctica agrícola en el guandul. La principal diferencia en la concepción conceptual entre el segundo y el tercer ensayo fue que el último se realizó después de haber escalado la tecnología para la producción del inoculante. Por esta razón, en el tercer ensayo las decisiones se tomaron con criterios productivos, a la luz de los resultados obtenidos en el segundo. Las principales decisiones tomadas fueron, por una parte, elegir como cepa para

---

el inoculante AMBPC1010, la cepa tipo de *Bradyrhizobium cajani*, y por otra elegir como soporte la perlita por la mejor disponibilidad logística. Además, el rendimiento obtenido con la tecnología de la inoculación no se comparó contra controles sin inocular, sino que se comparó con la tecnología convencional, entendiéndose como tal la mejor tecnología disponible (MTD) para la producción de guandul en la República Dominicana en el momento actual. La MTD consiste en resumen en realizar una fertilización mineral deficitaria, utilizar riego y aplicar intensivamente tratamientos fitosanitarios. Los ensayos se realizaron en la provincia de Azua (Figura 5.1)

Los resultados obtenidos (Araujo et al. 2020b, Tabla 6, Pág. 56 de esta memoria) indican que la tecnología de la inoculación produce un aumento estadísticamente significativo del rendimiento, con un incremento del 31% con respecto a la tecnología convencional. Este incremento en el rendimiento es consecuencia del aumento del número de vainas por planta, y en menor medida del tamaño medio del grano. También se proporcionan los datos desagregados del rendimiento y los componentes del mismo en cada una de las nueve parcelas en las que se realizó el ensayo (Araujo et al., 2020b, Supplementary Material, Table S.M.7 que figura en el anejo de esta memoria).

## 8. Capítulo IV. Análisis medioambiental de la utilización de inoculantes basados en rizobios para la producción de guandul en la República Dominicana basado en el ciclo de vida

### 8.1. Objetivos específicos cubiertos por el capítulo

- O.E.7. Analizar el impacto ambiental de la sustitución de la tecnología convencional para la producción de guandul en la República Dominicana, por la inoculación con bacterias específicas fijadoras de nitrógeno, comparando el impacto con el de otro cultivo leguminoso, *Phaseolus vulgaris* L., que tiene un nivel tecnológico más elevado y que a diferencia del guandul se considera “cash crop”.

### 8.2. Artículos de contribuyen a este capítulo

Artículo 4: Araujo et al. 2020b

### 8.3. Resumen de los resultados obtenidos

La repercusión ambiental de la utilización de tecnología de la inoculación en el cultivo de guandul en la República Dominicana se abordó desde dos puntos de vista: i) el proceso industrial de fabricación del inoculante; ii) la utilización del mismo a nivel agronómico, integrando la práctica de la inoculación con el resto de prácticas agronómicas. La metodología utilizada fue la del Análisis del Ciclo de Vida (ACV). Para enriquecer el análisis ambiental se ha comparado el guandul, segunda legumbre de consumo humano en el país, con la habichuela, que ocupa el primer puesto en el ranking.

#### 8.3.1. ACV del proceso industrial de producción del inoculante

El diagrama de flujo correspondiente al proceso industrial de producción del inoculante se presenta en la Fig. 1 del trabajo Araujo et al. (2020b) (Pág. 52 de la presente memoria). Los componentes del inoculante se resumieron en el apartado 6.2.2, y aparecen *in extenso* en la Tabla 1 del trabajo de Araujo et al. (2020b) (Pág. 51 de la presente memoria).

El inventario de inputs para la fabricación del inoculante, que recibe el nombre de LCI (acrónimo del inglés *Life Cycle Inventory*), aparece desglosado en la Tabla 2 del trabajo de Araujo et al. (2020b) (Pág. 53 de la presente memoria). La unidad a la que se refiere dicho inventario es una unidad de inoculante, que se define como la dosis del mismo necesario para inocular la semilla requerida para sembrar 1 ha del cultivo. Dicho inventario se elaboró para el cultivo del guandul y para el cultivo de habichuela, que como se indicó anteriormente se utiliza como referencia. Los datos necesarios para el inventario se obtuvieron de la base de datos ecoinvent v. 3.2<sup>5</sup> empleando el modelo APOS (acrónimo de *Allocation at the Point of Substitution*). Las distancias utilizadas para calcular las emisiones del transporte se presentan en Supplementary Material 1 Table S1 de Araujo et al. (2020b), que figura en el anejo de la presente memoria. Los límites del

<sup>5</sup> Wernet, G., Bauer, C., Steubing, B., Reinhard, J., Moreno-Ruiz, E., Weidema, B., 2016. The ecoinvent database version 3 (Part I): overview and methodology. *Int. J. Life Cycle Assess.* 21, 1218-1230.

sistema se presentan en el apartado 2.6 del trabajo de Araujo et al. (2020b) y en la Fig. 2 (Págs. 53 y 55 respectivamente de la presente memoria).

El resultado del impacto ambiental de la producción del inoculante se presenta en la Tabla 4 (Araujo et al., 2020b, Pág. 55 de la presente memoria), para dos categorías de impacto: i) el potencial de calentamiento global (GWP acrónimo de *Global Warming Potential*) y ii) la demanda de energía acumulada (CED acrónimo de *Cumulative Energy Demand*). Los valores presentados corresponden a la fabricación de una unidad de inoculante para guandul y habichuela. Además, se calculó el impacto de la producción de la dosis de fertilizante mineral a la que reemplaza la tecnología de la inoculación.

En resumen, para el cultivo del guandul, el GWP correspondiente a la producción del inoculante se estima en 0,27 kg CO<sub>2</sub>eq unidad<sup>-1</sup> y la CED en 3.8 MJ unidad<sup>-1</sup>. En ambos casos el valor obtenido es un 0,36% del correspondiente al fertilizante nitrogenado empleado para la producción de guandul utilizando la tecnología convencional (Araujo et al. 2020b, Tabla 4, Pág. 55 de la presente memoria). Además, en la misma Tabla 4 se desglosan los impactos ambientales producidos por los diferentes componentes del inoculante: i) el componente pulverulento que es que lleva el inóculo; ii) el componente adhesivo; iii) la caja para entregar conjuntamente los dos componentes anteriores. Algo más del 60% del impacto se atribuye al componente pulverulento, y en torno al 5% se atribuye a la caja de empaquetado de los dos componentes.

Además, en el trabajo de Araujo et al. (2020b), concretamente en el material suplementario (Supplementary Material 1 Tablas S4 y S5, que figuran en el anejo de esta memoria), se desglosa la contribución al impacto ambiental, de cada uno de los sub-componentes que constituyen el componente pulverulento (el que lleva el inóculo) y el adhesivo. El resultado más destacable es que más de la mitad de los impactos ambientales del componente pulverulento se deben al *carrier*, seguido del embalaje con valores en el entorno del 20%, mientras que el caldo inoculante, el verdadero ingrediente activo, solamente supone en torno al 10% de los impactos ambientales del componente. La estrategia de utilizar residuos para la elaboración del caldo inoculante permite alcanzar estos resultados tan sorprendentes.

### 8.3.2. ACV del proceso agrícola de producción del guandul utilizando la tecnología de la inoculación

Se han comparado, mediante el ACV, el proceso de producción de guandul y habichuela en la República Dominicana, en los escenarios que se presentan a continuación:

- Producción de guandul con: i) la tecnología convencional, consistente en un abonado N-P-K deficitarios y ii) con la tecnología de inoculación
- Producción de habichuela con: i) la tecnología convencional, consistente en un abonado N-P-K intensivo; ii) eliminando el abonado N y manteniendo el abonado P-K y iii) con la tecnología de inoculación

El rendimiento del cultivo en cada uno de los cinco escenarios se ha determinado mediante ensayos de campo, en las localizaciones indicadas en la Figura 8.1. Los resultados del ensayo de campo del guandul han sido analizados en el apartado 7.3.4 de la presente memoria y aparecen en la Tabla 6 del trabajo de Araujo et al. (2020b) (Pág. 56 de la presente memoria). Los resultados

obtenidos para la habichuela pueden consultarse en el trabajo de Araujo et al. (2020b) (Tabla 5 y apartado 3.2, Págs. 56 y 55 respectivamente de la presente memoria).

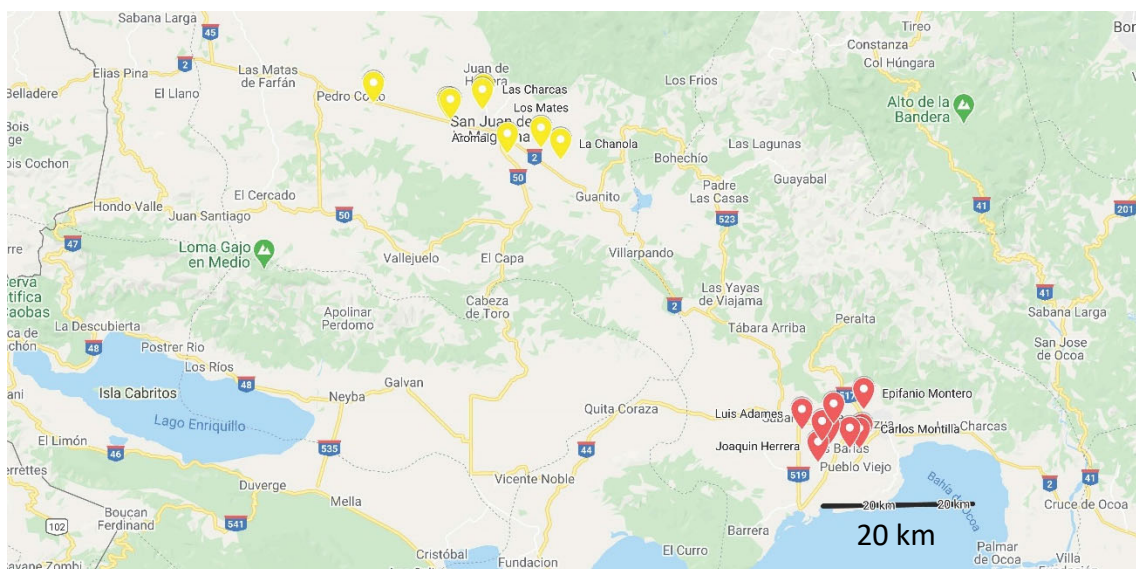


Figura 8.1. Ubicación de los lugares donde se realizaron los ensayos campo correspondientes al Análisis del Ciclo de Vida de la utilización de la tecnología de inoculación. En color rojo se representan los ensayos con guandul, y en color amarillo los que se realizaron con habichuela.

El LCI correspondiente a los inputs y prácticas agronómicas para el proceso de producción del guandul y el cultivo de referencia, la habichuela, aparece desglosado en la Tabla 3 del trabajo de Araujo et al. (2020b) (Pág. 54 de la presente memoria). El LCI está referido a una ha para cada uno de los cinco escenarios indicados anteriormente. Los cálculos del LCIA se han referido no solamente a 1 ha sino también a una tonelada de grano producido. Los datos necesarios para el inventario se obtuvieron de la base de datos ecoinvent v. 3.2 empleando el modelo APOS tal como se indicó para la fabricación del inoculante. Sin embargo, los productos fitosanitarios se tomaron de la base de datos Agri-footprint<sup>6</sup>. Las distancias utilizadas para calcular las emisiones del transporte se presentan en Supplementary Material 1 Table S3 de Araujo et al. (2020b), que figuran en el anejo de esta memoria. Los límites del sistema se presentan en el apartado 2.6 del trabajo de Araujo et al. (2020b) (Pág. 53 de la presente memoria).

El LCIA del proceso productivo de los cultivos se realizó aplicando la metodología CML-IA. En concreto se han elegido diez categorías de referencia (Araujo et al., 2020b, Tabla 7 y Fig. 3, Págs. 57 y 58 de esta memoria). De las diez categorías que contiene la metodología CML-IA, se analizaron las cinco que resultaron más impactadas: i) agotamiento abiótico de combustibles fósiles; ii) calentamiento global; iii) toxicidad humana; iv) ecotoxicidad en recursos hídricos de agua dulce; v) acidificación.

En resumen, existen diferencias importantes entre referenciar los impactos a una ha de superficie cultivada o a una t de producto. Para el cultivo del guandul, el cambio de la tecnología

<sup>6</sup> Durlinger, B., Tyszler, M., Scholten, J., Broekema, R., Blonk, H., 2014. Agri-Footprint; a Life Cycle Inventory database covering food and feed production and processing. LCA Food database. 9th International Conference LCA of Food San Francisco, USA.

convencional por la tecnología de inoculación produjo una reducción de impacto en las cinco categorías consideradas. Cuando los impactos se asignan a una ha de cultivo, la reducción varía entre un 4% y un 14% según la categoría, con una media de 12%. Sin embargo, cuando se asignan a una t de producto, la reducción es mucho mayor, oscilando entre un 26% y un 34% con una media de 32%. La razón de la mayor reducción refiriendo el impacto a 1 t de producto es que el cambio de tecnología no solamente produce una disminución de los impactos debidos a la supresión del abono mineral nitrogenado, sino que se produce un incremento de rendimiento por ha del 30%.

#### Comparación de los impactos ambientales de guandul y habichuela

Comparando ambos cultivos en el escenario de uso de la tecnología convencional, los impactos originados por 1 ha de habichuela superan a los originados por 1 ha de guandul en cuatro de las cinco categorías. La excepción correspondió al impacto sobre los recursos hídricos de agua dulce, que fue superior en el cultivo del guandul debido al elevado consumo de agua de riego ( $2409 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  en guandul frente a  $1460 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  en habichuela), por lo prolongado de su ciclo, estimado en 114 días, frente a los 80 días del ciclo de la habichuela (Araujo et al. 2020b, Tabla 3, Pág. 54 de la presente memoria).

Sin embargo, utilizando la tecnología de la inoculación en ambos cultivos, curiosamente 1 ha de cultivo de guandul produce impactos ambientales mayores que 1 ha de cultivo de habichuela en cuatro de las cinco categorías, siendo la excepción la acidificación. La razón hay que encontrarla en que el guandul recibe una fertilización deficitaria N-P-K, mientras que la habichuela, que es un cultivo comercial (denominado internacionalmente "*cash crop*"), recibe un abonado mucho más elevado, el suficiente para cubrir las extracciones esperadas para una producción de  $2.500 \text{ kg ha}^{-1}$  (Araujo et al. 2020b Tabla 3, Pág. 54 de la presente memoria). Al eliminar el abonado nitrogenado, los impactos ambientales descienden levemente en el caso del guandul, y drásticamente en el caso de la habichuela. Además, hay que tener en cuenta que el guandul consume más agua de riego que la habichuela, y que el riego origina, junto con los tratamientos fitosanitarios, importantes impactos ambientales, más elevados incluso que el abonado mineral (Araujo et al. 2020b Supplementary Material 3 Fig. S1 y apartado 3.3 de dicho artículo, Pág 56 de la presente memoria). Estas razones justifican el peor comportamiento ambiental del guandul comparado con la habichuela cuando se cambia a la tecnología de la inoculación.

Si los impactos se asignan a una tonelada de grano de guandul o habichuela, el comportamiento ambiental del guandul empeora con respecto a la habichuela, ya que las cargas ambientales del guandul superan a los de la habichuela en todas las categorías y para los dos escenarios, el de tecnología convencional y el de inoculación. Además, las diferencias entre la magnitud del impacto del guandul y de la habichuela se hacen aún mayores que cuando los impactos se asignan a la unidad de superficie (Araujo et al. 2020b Fig. 3 y apartado 3.3 de dicho artículo, Págs. 58 y 53 respectivamente de la presente memoria), lo que se debe a que el rendimiento del guandul es en torno a un 50% menor que el de la habichuela. Sin embargo, la reducción de los impactos ambientales como consecuencia del cambio tecnológico es mayor en el guandul (32 % de media) que en la habichuela (22% de media), porque en el caso del guandul el paso a la tecnología de la inoculación lleva implícito un incremento del rendimiento, que no se produce



en el cultivo de la habichuela (Araujo et al. 2020b Fig. 3 y apartado 3.3 de dicho artículo (Págs. 58 y 53 respectivamente de la presente memoria).

## 9. Discusión general. La cadena de valor de los inoculantes de rizobios para guandul en la República Dominicana

El presente trabajo desarrolla la cadena de valor completa de los inoculantes de guandul para la República Dominicana. Este hecho le convierte en una obra única en el mundo académico, en el que suelen predominar los trabajos centrados en el aislamiento de cepas, su identificación y el estudio a nivel molecular de los mecanismos de interacción entre planta y microorganismo. Solamente en ocasiones muy limitadas los trabajos académicos llegan a analizar el comportamiento en campo de inoculantes debidamente formulados (Bashan *et al.*, 2014; Barquero *et al.*, 2019), y en ningún caso integran criterios ambientales basados en una metodología sistematizada como el ACV, para analizar el proceso de fabricación, distribución y utilización en los inoculantes.

La multiplicación de los trabajos de aislamiento e identificación de las cepas que ejercen relaciones simbióticas con las plantas, implica que la lista de bacterias potencialmente beneficiosas para la agricultura no deja de crecer (Keswani *et al.*, 2019). En el caso de los rizobios (en el sentido utilizado por Poole *et al.*, 2018 que se refiere a alfaproteobacterias o betaproteobacterias que forman nódulos en las raíces de las leguminosas y fijan nitrógeno atmosférico, independientemente del género al que pertenecen), en la última revisión bibliográfica se reconocen 247 especies pertenecientes a 18 géneros (Lajudie y Young, 2020). Los avances de las ciencias ómicas permiten desentrañar los mecanismos de interacción entre plantas y bacterias, lo que explica el incremento experimentado en el número de trabajos que analizan estas interacciones (Qin *et al.*, 2016).

En consecuencia, se acumula información científica de los primeros eslabones de la cadena de valor, pero falta una investigación holística para optimizar el funcionamiento de los inoculantes en el campo, dicho de otra manera todavía escasea el conocimiento necesario para conectar el laboratorio con el campo (Barquero *et al.*, 2019; Menéndez y Paço, 2020). El presente trabajo rompe la barrera de cristal que genera una desconexión entre el laboratorio y el campo y desplaza el centro de gravedad hacia los eslabones más avanzados de la cadena de valor. Para conseguir el objetivo se emplea un planteamiento revolucionario en el mundo académico, que consiste en partir de una colección de cepas, preseleccionar las más efectivas en fijación de nitrógeno en condiciones axénicas e hidropónicas, y pasar inmediatamente a realizar ensayos en campo a gran escala, optimizando la formulación y analizando el efecto en diferentes agrosistemas con condiciones edafológicas (químicas y biológicas) dispares. El número de ensayos de campo asciende a 21, un valor suficientemente elevado para poder transferir conocimiento útil para el sector empresarial, los agricultores y asociaciones agrarias, y los responsables de políticas a nivel gubernamental, relacionados directa o indirectamente con la toma de decisiones sobre la adopción de la tecnología de la inoculación en la producción de guandul en la República Dominicana. Una vez que se han obtenido productos eficaces a nivel de campo, sería el momento adecuado para retroceder en la cadena de valor y estudiar desde el punto de vista ómico, los fundamentos metabólicos o moleculares que justifican un buen funcionamiento en campo. El planteamiento realizado consiste por tanto en realizar una preselección de cepas y avanzar rápidamente en la cadena de valor hasta el nivel agronómico. El presente trabajo responde desde el punto de vista agronómico a preguntas como la influencia

de la cepa de rizobio, la formulación y las características del suelo (físicoquímicas y biológicas) en la efectividad de los inoculantes de rizobios para el cultivo de guandul en la República Dominicana. También aborda un aspecto crucial como la influencia de la concentración de rizobios nativos con capacidad de nodular, en la colonización del nódulo por la cepa inoculada, y su relación con la efectividad de la inoculación. El análisis de los fundamentos metabólicos de los resultados obtenidos en campo, queda fuera de los objetivos del presente trabajo.

El comportamiento de los microorganismos en campo está regulado por sus capacidades metabólicas, las cuales, a su vez dependen de su constitución genética. Por tanto, el conocimiento de la constitución genética de las bacterias utilizando técnicas genómicas permite preseleccionar bacterias por sus capacidades putativas en campo (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2018; Pastor-Bueis *et al.*, 2019), pero la importancia y complejidad de las interacciones microorganismo-planta-ambiente implica que no siempre las capacidades metabólicas de las bacterias se expresen en campo. Por esta razón, en el momento actual todavía no puede considerarse plenamente satisfactoria la correlación existente entre los efectos en campo de una cepa inoculante frente a los resultados obtenidos en un análisis genómico del simbiote o en un trabajo de expresión de determinados genes en condiciones controladas de laboratorio. Por todo ello, teniendo en cuenta que el presente trabajo pertenece a un programa de Cooperación al Desarrollo, financiado por acciones de índole científica y de innovación industrial, se ha considerado que lo más adecuado es desplazar el centro de gravedad del estudio hacia los aspectos más avanzados de la cadena de valor de los inoculantes, convirtiéndose en un referente por el elevado número de ensayos de campo realizados y las respuestas encontradas a interrogantes de tipo agronómico.

### 9.1. Análisis del eslabón correspondiente a la selección de cepas autóctonas

El presente trabajo ha demostrado por primera vez para el cultivo de guandul, que los inoculantes basados en cepas que han evolucionado localmente y que presentan una elevada capacidad de fijación de N, suelen ser productos efectivos a nivel agronómico. La utilidad de esta estrategia para alcanzar el éxito agronómico de los inoculantes ha sido ampliamente demostrada para otros cultivos (Koskey *et al.*, 2017b; Pastor-Bueis *et al.*, 2019), pero nunca antes para guandul.

En algunos países existen recomendaciones de inoculantes para guandul, como por ejemplo en India (Sharma *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2018) o en Brasil (Menna *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2016), pero no existe ninguna para la zona de El Caribe. Sin embargo, estas recomendaciones se basan en cepas alóctonas, en la mayoría de los casos aisladas en otra especie diferente a *Cajanus cajan*, como por ejemplo el caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Guimarães *et al.*, 2016; Rufini *et al.*, 2016) o *Crotalaria* (Menna *et al.*, 2006). Según los autores de las mencionadas publicaciones, el comportamiento en campo de los inoculantes que ellos mismos recomiendan ha sido errático.

Sorprende la escasez de trabajos dedicados al desarrollo de inoculantes optimizados para el cultivo del guandul, puesto que desde los años 80 del siglo XX se conocía que la nodulación espontánea del cultivo es muy escasa, incluso en los centros de origen y distribución (Khurana y Dudeja, 1981; Sanginga *et al.*, 1996). En el presente trabajo se ha demostrado que también en los suelos de la República Dominicana, la presencia de simbioses de guandul es escasa. En el

trabajo de Araujo et al. (2015), tan solo en uno de los cuatro suelos analizados, la presencia de rizobios infectivos era lo suficientemente elevada para producir un rendimiento adecuado del cultivo. En el trabajo de Araujo et al. (2020a), tan solo en dos de los ocho suelos analizados, el rendimiento del cultivo podía garantizarse con los rizobios residentes. En los dos trabajos mencionados (Araujo et al. 2015, 2020a), el porcentaje de suelos con una cantidad suficiente de rizobios efectivos fue el mismo, un 25%, mientras que en el 75% restante fue necesaria o bien la inoculación, o bien la fertilización con N mineral para obtener un rendimiento adecuado. Sin embargo, cabría esperar que la nodulación espontánea del guandul fuese más alta de lo observado, ya que se ha demostrado que *Cajanus cajan* nodula con una amplia gama de rizobios, tanto de crecimiento lento, es decir del género *Bradyrhizobium* [*B. japonicum*, *B. liaoningense* (Appunu et al., 2009), *B. elkanii* (Ramsubhag et al., 2002), *B. ivorense* (Fossou et al., 2020), *Bradyrhizobium* sp. (Rufini et al., 2016)], como de crecimiento rápido, entre los que se encuentran en género *Rhizobium* sp. (Tilak et al., 2006; Bhattacharjee and Dutta Sharma, 2012; Dutta et al., 2014) y *Ensifer* sp. (Dubey et al., 2010).

Desde el punto de vista biogeográfico, las aportaciones del presente trabajo son muy relevantes, ya que hasta el momento solamente existía un trabajo de aislamiento e identificación de los simbiontes que nodulan guandul en el Caribe, a pesar de la importancia del cultivo en dicha región. El trabajo de Ramsubhag et al. (2002) identificó que en Trinidad y Tobago (región de El Caribe), todas las cepas aisladas menos una pertenecen al género *Bradyrhizobium*, aunque la identificación taxonómica se realizó con una secuencia parcial del gen 16S rRNA de tan solo 268 pb; sin embargo no se comprobó la efectividad de estos aislados en ensayos de reinfección sobre el cultivo. Desde entonces no hubo más estudios sobre la microbiota del interior de los nódulos de guandul en El Caribe, hasta la ejecución de los trabajos que constituyen esta Tesis Doctoral. En ella hemos demostrado mediante la secuenciación completa del gen 16S rRNA, que todos los aislados procedentes de la República Dominicana pertenecen al género *Bradyrhizobium*. El grupo de cepas aisladas en el paraje denominado “La Siembra” en el municipio de Padre Las Casas (Azuá), presentan idéntica secuencia del gen 16S rRNA, y son filogenéticamente próximas a una sola cepa tipo, que corresponde a *B. yuanmingense*. Además, en el grupo de cepas aisladas en Monte Bonito (Azuá), la cepa AMBPC1010 fue descrita como una nueva especie *Bradyrhizobium cajani* sp. nov.

Otro resultado importante se refiere al descubrimiento de la elevada biodiversidad existente entre los simbiontes del guandul en la República Dominicana. En el trabajo de Araujo et al. (2015) el índice de diversidad de Shannon para la colección de 9 cepas alcanzó el valor de 0,59, que está considerado como indicador de elevada biodiversidad (de acuerdo por ejemplo a Oliveira et al. 2011). Por otra parte, la elevada biodiversidad de los simbiontes nodulares de guandul en la República Dominicana también queda evidenciada por el hecho de que se han aislado representantes de los dos grupos en los que se divide el género *Bradyrhizobium* en base a la secuencia del gen 16S rRNA. En concreto ALSPC3051 y AMBPC1010 pertenecen al grupo I, y AMBPC1040 al grupo II (Araujo et al. 2020a). Además, de las 12 cepas incluidas en el presente trabajo, una de ellas constituye una nueva especie (la ya mencionada *B. cajani*), y la cepa AMBPC1040 podría llegar a definirse también como otra nueva especie, ya que la secuencia del gen 16S rRNA la relaciona con la cepa tipo de varias especies, sin que sea posible asignarla a ninguna en concreto. No obstante, para confirmar o rechazar que se trata de una nueva especie

es necesario realizar el correspondiente MLSA, que cae fuera de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

En resumen, el eslabón de la cadena de valor consistente en la selección de simbioses nodulares autóctonas ha permitido establecer y caracterizar una colección de cepas del género *Bradyrhizobium*. Las más efectivas en condiciones hidropónicas se han utilizado para avanzar en los eslabones de la cadena de valor, ya que han sido sometidas a los ensayos de optimización de la formulación, a los ensayos de campo, y al proceso de escalado de la producción del inoculante, última fase antes de la puesta en el mercado. Por otra parte, también se ha contribuido a objetivos científicos relacionados con la generación de ciencia básica. En este sentido se ha descubierto la identidad y biodiversidad de los simbioses nodulares de guandul en la República Dominicana, y se ha descrito una nueva especie.

## 9.2. Análisis del eslabón diseño de formulaciones

Existen numerosos modelos de inoculante: en estado sólido, líquido, para recubrir semilla, para aplicar directamente al suelo, etc. (Bashan *et al.*, 2014). El modelo de inoculante que mejor se adapta al cultivo de guandul en la República Dominicana debe seleccionarse con el criterio de alterar lo menos posible los hábitos de los agricultores en las operaciones agronómicas, y teniendo en cuenta cuestiones logísticas, sin olvidar el grado de desarrollo económico del país. Hay que tener en cuenta que, debido al carácter neofóbico de los agricultores, el éxito en la adopción de la tecnología de la inoculación depende en gran medida de que no suponga cambios revolucionarios en sus prácticas agronómicas habituales, y que no requiera inversiones en maquinaria o equipamiento. Teniendo en cuenta todo lo anterior, el modelo de inoculante es un producto en estado sólido para recubrir la semilla en el momento de la siembra. El producto final consta de dos componentes: i) uno en estado pulverulento que constituye el inoculante propiamente dicho y ii) el pegamento, en estado líquido. En el momento de la inoculación se mezcla la semilla con los dos componentes del inoculante, el sólido en una proporción del 2% peso:peso de semilla y el líquido en una proporción del 1% volumen:peso de semilla.

### Soporte o *carrier*

La optimización de la formulación consistió en primer lugar en la elección del soporte o *carrier*, teniendo en cuenta que es necesario encontrar una alternativa a la turba. Pese a ser la turba el *carrier* universal, por ser un recurso no renovable y por las características heterogéneas de la misma según su procedencia, desde hace más de 10 años se busca un remplazo a la misma (Ben Rebah *et al.*, 2007; Albareda *et al.*, 2008) y las iniciativas no paran de crecer. En el presente trabajo se utilizó como control perlita, que en el trabajo de Albareda *et al.* (2008) produjo resultados similares a la turba.

De los soportes analizados en el presente trabajo, el estiércol de aves esterilizado y pulverizado había sido utilizado previamente por Rivera-Cruz *et al.* (2008) como soporte para PGPR con buenos resultados, aunque aplicaron el inoculante inmediatamente después de la mezcla entre el caldo inoculante y el soporte, sin período de *shelf-life*. En nuestro caso se observó una pérdida de viabilidad inaceptable durante el *shelf-life*. Existen dos hipótesis para explicar las diferencias: la primera es que durante el *shelf-life* se pudieran liberar a partir del estiércol de ave esterilizado ciertas sustancias tóxicas para las bacterias del inoculante, mientras que esa toxicidad no se

produjo en el trabajo de Rivera-Cruz et al. (2008), al no permanecer en contacto ambos componentes durante el período del *shelf-life*. La segunda hipótesis sería la diferente sensibilidad de los dos taxa bacterianos a las sustancias procedentes del estiércol, *Bradyrhizobium* en el presente trabajo y *Enterobacter* en el de Rivera-Cruz et al. (2008).

El grupo de investigación IQUIMAB-ULE, en el que se realizó la presente Tesis Doctoral, fue pionero en la utilización de biochar como soporte o *carrier* de los microorganismos en inoculantes para agricultura (Serrano y González-Andrés, 2012). Posteriormente, otros autores publicaron trabajos que indicaban la viabilidad del biochar como *carrier*, aunque ningún autor llegó a probarlo en un ensayo de campo. Hale et al. (2015) probó en condiciones de microcosmos varios tipos de biochar obtenidos a partir de diferentes materias primas y diferentes condiciones de producción, y llegó a la conclusión que el biochar de madera de pino producido a 600 °C es el que mejores resultados produjo en el mantenimiento de la población de la bacteria inoculada (*Enterobacter cloacae*) en el suelo, siendo comparables a la turba. Egamberdieva et al. (2017) probaron, también en microcosmos, el efecto sobre las primeras etapas de crecimiento de las plantas, de un inoculante de *Bradyrhizobium* para *Lupinus* formulado con biochar, comparando los resultados con un control con el caldo inoculante sin formular. Llegaron a la conclusión de que la formulación mejora el crecimiento de las plantas.

El presente trabajo es el primero en validar la viabilidad biochar como *carrier* en condiciones de campo, llegando hasta el final del ciclo del cultivo. La perlita y el biochar de corteza de pino tuvieron el mismo comportamiento en los ensayos de campo, tanto en los parámetros de nodulación (número de nódulos, biomasa de nódulos y ocupación por la cepa inoculada), como en los parámetros de rendimiento. Además, tampoco se observaron interacciones estadísticamente significativas entre el *carrier*, el cultivar de guandul y las cepas de inoculante. La posibilidad de remplazo de la turba por la perlita fue demostrada por (Albareda *et al.*, 2008), y ahora nuestro trabajo ha permitido demostrar la posibilidad de remplazar la perlita por biochar de corteza de pino. Este reemplazo presenta ventajas ambientales claras, ya que la corteza de pino es un residuo de la industria maderera (Miranda *et al.*, 2012). Además, el consumo energético de la producción de biochar es menor que el de producción de perlita. Para producir biochar se utilizaron temperaturas de 550 °C durante 15 minutos (Rosas *et al.*, 2015), y se obtienen además subproductos utilizables como biocidas o bioasfaltos (F. González-Andrés comunicación personal a partir de los resultados del proyecto LignoxBio del Plan Nacional de I+D+i, Gobierno de España subprograma Retos-Colaboración); sin embargo, para la producción de perlita a partir de rocas silíceas se requieren temperaturas de 1000 °C o incluso superiores (Angelopoulos *et al.*, 2014). Por consiguiente el biochar de corteza de pino encaja mejor en los principios de la economía circular (López-Cano *et al.*, 2018).

#### Otros aditivos en la formulación del inoculante

En la formulación desarrollada se ha utilizado una mezcla de dos polisacáridos, uno de ellos el galactomanano goma garrofín (Mulas et al. 2018) y otro disacárido que se encuentra bajo secreto industrial. La adición de estos compuestos en la última fase de la fermentación incrementa la supervivencia del rizobio en el inoculante, lo que se atribuye a que se han observado cambios en la composición y características de los EPS y al aumento de la producción de éstos (F. González-Andrés comunicación personal, no publicado). Por otra parte se ha

demostrado en la India, que la inoculación de guandul con cepas del género *Rhizobium* aditivadas con EPS de origen bacteriano mejora la nodulación y el crecimiento del guandul ante situaciones de estrés, aunque el inoculante no estaba completamente formulado (Tewari and Sharma, 2020). Por tanto, la utilización de los protectores celulares podría tener, además del efecto de mejora de la supervivencia de la bacteria durante el *shelf-life*, un efecto en la mejora de su comportamiento en campo, aunque este extremo no ha sido objeto de investigación en el presente trabajo. Las investigaciones futuras acerca de la formulación deben abordar la incorporación de metabolitos, en especial EPS y LCOs entre los que destacan los factores de nodulación (*Nod Factors* NFs) (Chaudhary *et al.*, 2020). Uno de los aspectos más importantes, para que sea viable la incorporación de los metabolitos de origen bacteriano a los inoculantes a escala industrial es que los procesos de fabricación de estos productos permitan obtenerlos a un precio adecuado y a un coste ambiental aceptable. En la actualidad existe trabajos de investigación que tratan de optimizar el proceso industrial de producción de los metabolitos bacterianos (Ates, 2015). Sin embargo, nuestro trabajo abre la puerta a investigar la posibilidad de que no solamente sustancias procedentes del propio metabolismo bacteriano, sino también otras que no son de origen bacteriano, pero que actúan sobre la producción de metabolitos por la propia bacteria, pueden contribuir a mejorar el comportamiento en campo de los inoculantes.

### 9.3. Análisis del eslabón fabricación del inoculante

En el artículo Araujo *et al.* (2020b) ha abordado el escalamiento de los aspectos técnicos del proceso de fabricación del inoculante para guandul en la República Dominicana, hasta llegar a la escala de planta piloto, un aspecto que por regla general no forma parte de los trabajos académicos. La hipótesis de trabajo ha consistido en el establecimiento de una futura planta de fabricación del inoculante a nivel local, concretamente en el polígono industrial de San Cristobal, que es el lugar elegido para el cálculo de las distancias de transporte de las materias primas y también para las distancias de transporte del producto terminado hasta la zona de utilización en las provincias de Azua y San Juan de la Maguana, donde se sitúa la mayor producción de guandul del país.

En el trabajo se han considerado, además de cuestiones técnicas del eslabón de fabricación del inoculante, aspectos ambientales, mediante el ACV de la fabricación del producto. El presente trabajo no ha abordado el plan de negocio para la explotación de la planta de fabricación de inoculantes, ya que queda fuera de los objetivos de la Tesis Doctoral, y sería el siguiente paso a abordar para la incorporación definitiva del inoculante al sistema de producción del guandul en la República Dominicana.

El primer aspecto clave para conseguir la viabilidad económica y ambiental consiste en la utilización de residuos para formular el caldo de cultivo en el que se realiza el proceso fermentativo para producir un caldo inoculante con al menos  $5 \times 10^9$  ufc ml<sup>-1</sup>. En concreto se han seleccionado dos residuos de fácil acceso local, como son la melaza procedente de los ingenios azucareros locales, que previamente había sido propuesto por Pastor-Bueis *et al.* (2017) para otros PGPR, y vinazas procedentes de la producción de cerveza en sustitución del digerido anaerobio propuesto en el trabajo de Pastor-Bueis *et al.* (2017) antes mencionado. El mayor inconveniente que presenta la utilización de residuos en general es la heterogeneidad de su composición. Para evitarlo se han elegido dos residuos como la melaza y la vinaza de cervecería

que presentan una composición bastante homogénea siempre que procedan de la misma fábrica. Por el contrario, la principal ventaja de la utilización de residuos es que contribuye a que los inoculantes sean una alternativa de bajo coste (Flores-Félix *et al.*, 2013). Por esta razón, aparte del presente trabajo y del trabajo de Pastor-Bueis *et al.* (2017), existen otros que proponen la utilización de una amplia variedad de residuos como medio de cultivo, por ejemplo desechos agroindustriales, lodos filtrantes de aguas residuales, cenizas volantes, etc. (Ben Rebah *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011, 2013). Gracias a la utilización de residuos para el medio de cultivo, los impactos ambientales derivados de la producción del caldo inoculante, que es el verdadero principio activo, se mantuvieron en torno al 10% de las cargas ambientales del componente pulverulento del inoculante (Araujo *et al.* 2020b), a pesar del consumo energético del reactor. Los aditivos utilizados para la protección celular se incluyen en porcentajes muy bajos, y por tanto su contribución a los impactos ambientales es también muy escasa, en torno al 1%, a pesar de deben ser importadas de terceros países, concretamente de los Estados Unidos.

Desafortunadamente, a pesar de las ventajas ambientales del biochar de corteza de pino como *carrier*, en el escalado de la producción fue necesario descartarlo y sustituirlo por perlita, debido a problemas logísticos y de disponibilidad de biochar. A causa del alto consumo energético asociado a la producción de la perlita, que además debe ser importada de los Estados Unidos, el soporte supone más de un 50% de las cargas ambientales del componente pulverulento, concretamente un 67% en términos de potencial de calentamiento global (GWP) y casi un 54% en demanda energética.

En cuanto al pegamento, para el escalado de la producción se ha seleccionado goma arábiga en vez de sacarosa o melaza, porque la goma arábiga permite una buena adherencia y estabilidad una vez realizado el recubrimiento. Sin embargo, también debe ser importada de los Estados Unidos.

#### 9.4. Análisis del eslabón utilización en campo

El eslabón de la utilización de los inoculantes en campo se ha abordado desde los puntos de vista agronómico y ambiental. Esta combinación es lo que hace único al presente trabajo.

La inoculación con las cepas autóctonas seleccionadas y debidamente formuladas produce, en términos globales, una respuesta positiva y estadísticamente significativa en el rendimiento del guandul, en comparación con el control sin inocular y sin fertilizar con N. Sin embargo, si se desagregan los resultados por parcelas de cultivo, se observa que la respuesta positiva se restringe a las parcelas en las que el número de rizobios residentes en el suelo con capacidad de nodular al cultivo sea menor o igual a  $1 \times 10^3$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>, que suponen en torno al 75% de las parcelas analizadas, lo que explica que los datos agregados produzcan resultados estadísticamente significativos.

Puede afirmarse que la inoculación con las cepas autóctonas seleccionadas y debidamente formuladas permite replazar la fertilización mineral nitrogenada, ya que las diferencias de rendimiento entre el tratamiento sin inocular-fertilizado con N y los tratamientos inoculados-sin fertilizar con N fueron muy pequeñas; incluso en algunas parcelas el rendimiento de alguno de los tratamientos inoculados superó al fertilizado, si bien las diferencias no fueron significativas desde el punto de vista estadístico (Araujo *et al.*, 2015). Esta es la primera vez que se demuestra



la efectividad agronómica de los inoculantes basados en rizobios autóctonos para el cultivo del guandul, aunque existen precedentes para otros cultivos, entre los que destaca la habichuela por su importancia en la alimentación humana (Mulas *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2016; Koskey *et al.*, 2017a).

El presente trabajo analiza la colonización de los nódulos por parte de las cepas del inoculante, en función tamaño de la población bacteriana residente con capacidad de nodular al cultivo. Con menos de  $10^2$  ufc g de suelo<sup>-1</sup> ( $\log_{10} = 1.49$ ), la ocupación por la cepa inoculada alcanzó casi el 90%; para un incremento de 1.27 unidades logarítmicas en la población del suelo, la ocupación bajó un 18%, datos que son similares a los obtenidos para el garbanzo por (Elias and Herridge, 2015). Además, con esta bajada de la ocupación, la inoculación continuó siendo efectiva en términos de rendimiento del cultivo, comparado con el tratamiento no inoculado y sin fertilizar. Sin embargo, con el siguiente escalón de incremento en la población del suelo, de 1.73 unidades logarítmicas, la ocupación de nódulo por parte de la cepa inoculada bajó otro 45%, una bajada mucho más elevada que la reportada por Elias and Herridge (2015), y en este caso la inoculación ya no produjo ningún efecto agronómico sobre el rendimiento. En resumen, el tamaño de la población residente tuvo un efecto muy importante en la colonización del nódulo, tal como ha sido reconocido por otros autores (Laguerre *et al.*, 2003; Howieson and Ballard, 2004; Elias and Herridge, 2015).

Sin embargo, hay otro factor clave para determinar el éxito o el fracaso de la colonización, que es la capacidad competitiva de la cepa inoculada frente a las bacterias del suelo (Grange *et al.*, 2007; Irisarri *et al.*, 2019). La competitividad es un carácter intrínseco a la propia bacteria, regulado por los genes nod (Liu *et al.*, 2017) y por otros genes que controlan la manera en que las bacterias se relacionan con otras del suelo (Irisarri *et al.*, 2019; Pastor-Bueis *et al.*, 2019). Por esta razón resulta curioso que no hayamos encontrado un efecto de la cepa en la capacidad de colonización, puesto que no hubo diferencias significativas en cuanto a la ocupación del nódulo, entre las dos cepas analizadas (ALSPC3051 y AMBPC1040). Esto quiere decir que, en nuestro caso, las cepas con mejor capacidad de fijación de N en condiciones hidropónicas presentan también una buena capacidad de ocupar los nódulos, siempre que la población nativa del suelo se mantenga en una concentración igual o menor a  $1 \times 10^3$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>. Sin embargo, para futuros trabajos, sería necesario analizar si entre otras cepas autóctonas con buena capacidad de fijación de N, existe alguna con mejor capacidad de colonización, pues es preciso recordar que la competitividad de las cepas está desacoplado de la capacidad de fijación de N (Westhoek *et al.*, 2017). En el caso de hallar alguna cepa más competitiva y con mayor capacidad de fijar N que las bacterias residentes, podría ser posible encontrar respuesta a la inoculación incluso en los suelos con más de  $1 \times 10^4$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>, e incluso podría llegar a superarse el rendimiento obtenido con el abonado nitrogenado, tal como demostraron Mulas *et al.* (2011) y Pastor-Bueis *et al.* (2019) con la cepa LCS0306 de *Rhizobium leguminosarum* para el cultivo de habichuela en España.

Al hilo de la capacidad de fijación de N, otra cuestión singular es que, mientras normalmente los rizobios residentes suelen ser muy competitivos pero pobres fijadores de N (Checcucci *et al.*, 2017), en todos los agrosistemas dominicanos analizados en este trabajo, los rizobios residentes son eficientes en la fijación de N. Esto se ha podido demostrar porque siempre que los rizobios nodulantes nativos superan la concentración de  $1 \times 10^4$  ufc g de suelo<sup>-1</sup>, la fertilización con N

mineral no mejora el rendimiento del cultivo frente al control sin inocular y sin fertilizar. Aunque no se ha determinado de manera directa la fijación de N, la estimación indirecta mediante el rendimiento, permite realizar esa afirmación. En futuros estudios deberá determinarse también la fijación de N por técnicas como la de la dilución natural del N<sup>15</sup> (Pacheco *et al.*, 2017).

En conclusión, para el cultivo del guandul en la República Dominicana se puede recomendar, con carácter general, la inoculación con alguna de las cepas autóctonas seleccionadas y formuladas como se indica en este trabajo, si bien en un 25% de los casos no tendrá efecto sobre el rendimiento. El valor medio del incremento del rendimiento en el conjunto de las parcelas inoculadas comparado con los controles sin inocular-sin fertilizar con N es de un 33%. Si se compara la tecnología de la inoculación con la tecnología convencional consistente en realizar una fertilización deficitaria N-P-K con la intención de mejorar el establecimiento del cultivo, el incremento del rendimiento es prácticamente el mismo, lo que demuestra la poca efectividad del abonado que se realiza en la actualidad.

### Análisis ambiental

Desde el punto de vista ambiental se han analizado, mediante el ACV, dos escenarios para la producción de guandul: i) el primero con la tecnología convencional y ii) el segundo la tecnología de la inoculación. Además, se han comparado los mismos dos escenarios en el cultivo de habichuela, ya que ambos cultivos son sustitutos en la gastronomía dominicana (JAD 2009).

La reducción de impactos ambientales derivada de la sustitución tecnológica en el guandul viene fundamentalmente determinada por la mejora del rendimiento del cultivo, y no tanto por la eliminación del abonado mineral nitrogenado y los impactos asociados a su fabricación, ya que la dosis de abono nitrogenado es muy reducida debido a que la fertilización N-P-K es deficitaria. Por esta razón, cuando los impactos se asignan a una ha de cultivo la reducción media de los impactos para las cinco categorías más importantes del CML-IA es un 12%, y cuando se asignan a una tonelada de producto es un 32%. En general, los impactos ambientales de la producción agrícola por tonelada de producto se reducen cuando se incrementa el rendimiento del cultivo, aunque este incremento sea a costa de incrementar la utilización de inputs, de manera que los cultivos más favorables desde el punto de vista medioambiental son los denominados “*high input-high output*” (Cerutti *et al.*, 2011; Abeliotis *et al.*, 2013). Por tanto, la mejor tecnología agraria desde el punto de vista ambiental será la que optimice la combinación de los siguientes factores: i) tecnología de bajo impacto y ii) que maximice el rendimiento del cultivo.

El presente trabajo es el primero que analiza, mediante un ACV, el efecto medioambiental de la sustitución de la tecnología convencional por la tecnología de la inoculación en los cultivos de leguminosas. Además, es el único trabajo a nivel mundial que analiza la producción del guandul con el enfoque del ACV. Por el contrario, existen unos pocos trabajos que utilizan la metodología del ACV para analizar las cargas ambientales derivadas de la producción de habichuela para diversos sistemas productivos, como el ecológico, el integrado, etc., aunque nunca contemplan la inoculación con microorganismos. La producción de habichuela en la República Dominicana, provoca mayores impactos ambientales que en el resto del mundo, incluso si se emplea la tecnología de la inoculación. Tomando como referencia el potencial de calentamiento global (GWP) de la producción de 1 t de grano con la tecnología de inoculación en la República Dominicana, la producción en el estado de Washington (USA) produjo un GWP un 35% más bajo,

eso sí, utilizando régimen ecológico (Adewale *et al.*, 2016). Sin embargo, en sistemas de cultivo no ecológicos, Do Carmo *et al.* (2016) en Brasil, obtuvo valores de GWP en torno al 8% menores que en nuestro estudio, aunque con variaciones según el sistema de explotación. Por último Abeliotis *et al.* (2013) en Europa también obtuvo un GWP más bajo. En el caso del guandul, los impactos ambientales de la producción del cultivo son mayores que los de la habichuela, debido a que el rendimiento es aún menor y el consumo de agua de riego mayor.

En las condiciones de la agricultura dominicana, los factores que más impacto generan (Araujo *et al.*, 2020b) son, en primer lugar, los tratamientos fitosanitarios, en segundo lugar, el riego y seguidamente la fertilización nitrogenada y el laboreo. Ante esta situación, la razón de los malos resultados ambientales obtenidos en la República Dominicana es doble, por una parte, el elevado número de tratamientos fitosanitarios necesarios para mantener el cultivo en condiciones sanitarias adecuadas, y por otra parte los escasos rendimientos obtenidos.

El remplazo de la fertilización mineral nitrogenada por la inoculación reduciría significativamente los impactos ambientales de la producción de legumbres de consumo humano en la República Dominicana, pero la contribución a la mejora ambiental de la actividad agraria en el país quedaría ensombrecida por la ineficiencia del sistema productivo.

La mejora ambiental de un cultivo etnobotánica y gastronómicamente tan importante para la República Dominicana como el guandul, pasa por la mejora de las tecnologías agronómicas para mejorar el rendimiento del cultivo, entre las que se encuentra el reemplazo de la fertilización nitrogenada que se realiza con la tecnología convencional por la inoculación. Otra práctica agronómica que parece inapropiada y debe ser evitada es la fertilización deficitaria, ya que en los ensayos de campo del trabajo de Araujo *et al.* (2020a) en los que la fertilización P-K fue el 100% de las extracciones esperadas del cultivo, los rendimientos medios de los tratamientos inoculados fueron un 30% superiores que en los ensayos del trabajo de Araujo *et al.* (2020b), que se fertilizaron con un déficit de P y K siguiendo la tecnología convencional de los agricultores. Teniendo en cuenta que la proporción de parcelas en secano y en regadío en los dos ensayos fue la misma, atribuimos el menor rendimiento al efecto negativo de la fertilización deficitaria, que incluso puede estar limitando la FSN, por el papel que juega en la misma la correcta nutrición fosfórica de la planta (Drevon *et al.*, 2015).

No obstante, la mejora ambiental del cultivo también requiere de programas de mejora genética. A tenor de los resultados obtenidos, sería necesario reducir el consumo de agua en los sistemas de regadío. Aunque el guandul es un cultivo muy resistente a la sequía (Valenzuela y Smith, 2002; Semwal *et al.*, 2018), en la República Dominicana se tiende a cultivar en tierras de regadío porque el incremento de rendimiento debido al riego es muy importante, pero el consumo de agua es elevado, concretamente un 65% más que la habichuela. Para alcanzar este objetivo posibles estrategias de mejora vegetal serían la obtención de plantas aún de menor porte, que tengan una entrada en floración más temprana y de esta manera acortar el ciclo.

## 10. Conclusiones

El trabajo ha puesto a disposición de los grupos de interés (agricultores, empresas de insumos, legisladores), la tecnología necesaria para la producción de los inoculantes, llegando hasta la producción a escala piloto. El trabajo ha abordado la transferencia de tecnología desde el laboratorio hasta el campo. Para realizar esta transferencia se ha generado conocimiento en varias vertientes: i) el aislamiento de cepas autóctonas efectivas en la fijación de nitrógeno; ii) el diseño de una formulación que permita que las bacterias alcancen las raíces de las plantas y formen con ellas una simbiosis nodular en las mejores condiciones, para que se produzca una adecuada formación y colonización de nódulos; iii) la realización de ensayos de campo para comprobar el efecto de la inoculación en el rendimiento, en comparación con la tecnología convencional de la zona y la fertilización con N mineral; iv) el análisis del ciclo de vida para evaluar el efecto ambiental de la adopción de la tecnología de la inoculación en el cultivo del guandul en la República Dominicana.

Las principales conclusiones son las siguientes:

1. Se han aislado un total de 12 cepas bacterianas del interior de los nódulos de guandul en las localidades de Monte Bonito y Padre las Casas, situadas en la provincia de Azua (República Dominicana) que corresponde a una de las zonas de mayor importancia en la producción de legumbres de consumo humano en el país. Las 12 cepas tienen capacidad para reinfectar al guandul, con diferentes efectividades en la fijación de nitrógeno.
2. Teniendo en cuenta la efectividad de la fijación de nitrógeno en condiciones axénicas e hidropónicas, se han seleccionado cuatro cepas de élite, denominadas ALSPC3050, ALSPC3051, AMBPC1040 y AMBPC1010
3. Las bacterias de élite seleccionadas han sido identificadas como pertenecientes en su totalidad al género *Bradyrhizobium*, de las cuales AMBPC1010 ha sido descrita como una nueva especie *B. cajani* sp. nov.; ALSPC3050 y ALSPC3051 han sido identificadas como filogenéticamente muy próximas a la cepa tipo de *B. yuanmingense*, y AMBPC1040 pertenece al grupo II de *Bradyrhizobium* pero no ha podido ser identificada a nivel de especie por su elevada similitud con varias de las especies conocidas en base a la secuencia del gen 16S rRNA.
4. De los cuatro soportes o *carriers* estériles analizados para la formulación del inoculante que fueron dos tipos de biochar, estiércol de ave y perlita, la perlita y el biochar de corteza de pino tuvieron un comportamiento óptimo y muy similar en campo, si bien el biochar presenta unos resultados de *shelf life* ligeramente superiores, por lo que es la mejor opción, ya que además alinea con los principios de la economía circular.
5. La experimentación en campo realizada en 21 parcelas que se agruparon en 3 ensayos diferentes, analizó diferentes variables independientes como el cultivar, la cepa de élite y la formulación, actuando como covariable el nivel de rizobios nativos con capacidad de nodular el guandul. Se llegó a la conclusión de que el único factor que influye significativamente en la efectividad del inoculante fue el nivel de rizobios nativos con capacidad de formar nódulos con el guandul.
6. Tan solo en el 25% de los 21 suelos incorporados al ensayo de campo existió una población de rizobios nativos con capacidad de nodular guandul y asegurar el rendimiento en las

circunstancias agroclimáticas concurrentes, de manera que en esos casos ni la inoculación ni la fertilización con N mineral tuvieron efecto alguno en el rendimiento, mientras que en el 75% restante de los suelos, el incremento medio de rendimiento en el conjunto de las parcelas inoculadas comparado con los controles sin inocular-sin fertilizar con N fue de un 33%.

7. Se ha desarrollado la producción de inoculante para guandul a nivel de planta piloto, cuyas principales características son las siguientes: utilización de residuos como medio de cultivo (melaza de caña y vinazas de cervecería); aportación de dos protectores celulares de naturaleza glucídica en post-fermentación; y empleo de perlita como soporte, debido a los problemas de suministro de biochar de corteza de pino.
8. El impacto ambiental de la producción del inoculante para guandul se estima, en términos de potencial de calentamiento global y consumo energético, en un 0,36% del correspondiente al fertilizante nitrogenado que se utiliza para el cultivo de guandul utilizando la tecnología convencional, basada en aporte deficitario de N.
9. De total de cargas ambientales atribuidas a la producción del inoculante, el caldo inoculante representa solo un 10% gracias a la utilización de residuos en el medio de cultivo, mientras que el soporte o *carrier* supone más del 50%, por el elevado consumo energético necesario para fabricar la perlita.
10. Los impactos ambientales derivados de la producción de guandul se reducirían de media un 12% referido a una ha de cultivo y a un 32% referido a una tonelada de grano, si se remplazara la tecnología convencional por la de inoculación, ya que la última supone un incremento del rendimiento frente a la primera.
11. La tecnología convencional actual de fertilización deficitaria en el cultivo de guandul produce un bajo rendimiento y elevados impactos ambientales relacionados con la producción de 1 tonelada de grano, siendo superiores a los producidos por el cultivo de habichuela que por utilizar tecnología más intensiva presenta rendimientos más elevados.
12. Los impactos ambientales de la producción de legumbres de consumo humano en la República Dominicana son elevados comparativamente con otros países, debido fundamentalmente a los impactos generados por el riego y los tratamientos fitosanitarios, de manera que para hacer más competitiva la producción en el país, además del remplazo de la fertilización mineral nitrogenada por la inoculación, es necesario también optimizar riego y control fitosanitario.

## Conclusions

The work has made available to farmers, stakeholders and policymaker, the technology for inoculants production up to pilot scale. The work has tackled the technology transfer from the lab to the field. To accomplish this transfer the knowledge generated has encompassed different aspects: i) the isolation of autochthonous strains which are effective in N fixation; ii) the design of a formulation that protects the bacteria for them to attain the plant roots in the best conditions to produce and effectively colonize the root nodules; iii) field trials to appraise the effect of the inoculation in the crop yield, compared with the conventional technology based on the fertilization with mineral nitrogen; iv) the life cycle assessment to appraise the environmental effect of the inoculant technology in the Pigeon pea crop in the Dominican Republic.

The main conclusions are the following:

1. Twelve bacteria strains have been isolated inside Pigeon pea root nodules in Monte Bonito and Padre las Casas (Azua, Dominican Republic), located in one of the most important regions for pulses production in the country. The 12 strains were tested for Pigeon pea reinfection with a positive result and showed a range of nitrogen fixation effectiveness.
2. Four elite strains have been selected by their nitrogen fixation effectiveness, in axenic and hydroponic conditions, namely ALSPC3050, ALSPC3051, AMBPC1040 y AMBPC1010
3. The elite strains have been identified as belonging to the genus *Bradyrhizobium*, from which AMBPC1010 has been described as a new species *B. cajani* sp. nov.; ALSPC3050 and ALSPC3051 have been identified as phylogenetically close to the type strain of *B. yuanmingense*, and AMBPC1040 belongs to the group II of *Bradyrhizobium* but it has not been identified at the species level due to the high similarity of the 16S gene sequence to several different known species.
4. Out of the tested carriers (two different kinds of biochar, poultry litter, and perlite), pine bark biochar and perlite showed an optimal and similar performance in field conditions; however, biochar showed a slightly better performance during the shelf life, and thus it is a better option which is also well aligned with the circular economy principles.
5. The field experiment encompassed 21 plots grouped in three different trials; the cultivar, the elite strain and the formulation were considered as independent variables, and the level of native nodulating rhizobia was the covariable. Out of all the analyzed factors, only the level of native rhizobia able to nodulate Pigeon pea had a significant effect in the effectiveness of the inoculant.
6. Only 25% of the 21 soils included in the field trial showed native rhizobia populations able to provide effective nitrogen fixation to the crop, and in such a cases neither the inoculation nor the fertilization with mineral nitrogen had effect in the yield; however, in the other 75% soils, the yield increase observed in the inoculated treatments was on average 33% compared to the un-inoculated and non-N-fertilized plots.
7. The inoculant production process has been developed up to pilot scale, with the main characteristics being the following: use of residues as growth medium (molasses from sugar extraction and vinasses from beer production); use of two glucidic cells protectors in post-fermentation; and use of perlite as carrier, due to the logistic problems related to pine bark biochar production

8. The environmental impact of the inoculant manufacturing for Pigeon pea has been estimated in 0.36% of that of the manufacturing of the nitrogen mineral fertilizers used in the conventional technology, in terms of global warming potential and cumulative energy demand.
9. From the total environmental burdens associated with the inoculant production, the inoculant broth accounted for 10% due to the use of a growth medium based on residues, whereas the carrier accounted for more than 50%, due to the high energy consumption of the perlite manufacturing.
10. The replacement of the conventional technology by the inoculation technology in Pigeon pea would involve a reduction of the environmental impacts by 12% in average, allocated to one hectare, and by 32% allocated to one ton of produced grains, due to the yield increase as a consequence of the inoculation technology compared to the conventional one.
11. The conventional technology consisting on deficit fertilization produces low yield in Pigeon pea and high environmental impacts allocated to the production of one t of grains; due to the low yield, such impacts are higher to those produced by the high input-high output crop common bean.
12. The environmental impacts of pulses production in the Dominican Republic are high compared to third countries, due to the high impacts allocated to the irrigation and phytosanitary treatments; thus in order to improve the performance of pulses agriculture in the country, it is necessary to optimize irrigation and phytosanitary treatments, in addition to the replacement of the mineral nitrogen fertilization by inoculation.

## 11. Bibliografía citada

- Abeliotis, K., Detsis, V., and Pappia, C. (2013) "Life cycle assessment of bean production in the Prespa National Park, Greece", *Journal of Cleaner Production* 41, 89-96. doi:10.1016/j.jclepro.2012.09.032.
- Adewale, C., Higgins, S., Granatstein, D., Stöckle, C. O., Carlson, B. R., Zaher, U. E. and Carpenter-Boggs, L. (2016) "Identifying hotspots in the carbon footprint of a small scale organic vegetable farm", *Agricultural Systems* 149, 112-121. doi:10.1016/j.agsy.2016.09.004.
- Aeron, A., Khare, E., Jha, C. K., Meena, V. S., Aziz, S. M. A., Islam, M. T., Kim, K., Meena, S. K., Pattanayak, A., Rajashekara, H., Dubey, R. C., Maurya, B. R., Maheshwari, D. K., Saraf, M., Choudhary, M., Verma, R., Meena, H. N., Subbanna, A. R. N. S., Parihar, M., Shukla, S., Muthusamy, G., Bana, R. S., Bajpai, V. K., Han, Y. K., Rahman, M., Kumar, D., Singh, N. P. and Meena, R. K. (2020) "Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future", *Archives of Microbiology* 202, 665-676. doi:10.1007/s00203-019-01779-w.
- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, Ministerio de Asuntos Exteriores, Unión Europea y Cooperación. (2020) "Dónde cooperamos. República Dominicana". <https://www.aecid.es/ES/Paginas/D%C3%B3nde%20Cooperamos/Am%C3%A9rica%20Latina%20y%20Caribe/Centroamerica-Mexico-Caribe/Republica-Dominicana.aspx> (Visto 26 mayo 2020)
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M. and Temprano, F. J. (2008) "Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations", *Soil Biology and Biochemistry* 40(11), 2771-2779. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.021.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Andrews, M., and Andrews, M. E. (2017) "Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses", *International Journal of Molecular Sciences* 18(4), 705. doi:10.3390/ijms18040705.
- Angelopoulos, P. M., Gerogiorgis, D. I., and Paspaliaris, I. (2014) "Mathematical modeling and process simulation of perlite grain expansion in a vertical electrical furnace", *Applied Mathematical Modelling* 38(5-6), 1799-1822. doi:10.1016/j.apm.2013.09.019.
- Appunu, C., Sasirekha, N., Prabavathy, V. R., and Nair, S. (2009) "A significant proportion of indigenous rhizobia from India associated with soybean (*Glycine max* L.) distinctly belong to Bradyrhizobium and Ensifer genera", *Biology and Fertility of Soils* 46(1), 57-63. doi:10.1007/s00374-009-0405-8.
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C. A., Urbano, B. and González-Andrés, F. (2020) "Inoculation with native Bradyrhizobium strains formulated with biochar as carrier improves the performance of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)", *European Journal of Agronomy* 113, 125985. doi:10.1016/j.eja.2019.125985.
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C.-A., Velázquez, E., Urbano, B. and González-Andrés, F. (2015) "Bradyrhizobium yuanningense related strains form nitrogen-fixing symbiosis with *Cajanus cajan* L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization", *Scientia Horticulturae* 192, 421-428. doi:10.1016/j.scienta.2015.06.009.
- Arora, N. K., Khare, E., Singh, S., and Tewari, S. (2018) "Phenetic, genetic diversity and symbiotic compatibility of rhizobial strains nodulating pigeon pea in Northern India", *3 Biotech* 8(1), 52. doi:10.1007/s13205-017-1074-1.
- Ates, O. (2015) "Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi:10.3389/fbioe.2015.00200.
- Atieno, M., Wilson, N., Casteriano, A., Crossett, B., Lesueur, D., and Deaker, R. (2018) "Aqueous peat extract exposes rhizobia to sub-lethal stress which may prime cells for improved desiccation tolerance", *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(17), 7521-7539. doi:10.1007/s00253-018-9086-2.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. and Smith, D. L. (2018) "Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture", *Frontiers in Plant Science* 9, art. 1473. doi:10.3389/fpls.2018.01473.
- Barquero, M., Pastor-Buies, R., Urbano, B. and González-Andrés, F. (2019) "Challenges, Regulations and Future Actions in Biofertilizers in the European Agriculture: From the Lab to the Field". Pp. 83-107 in Doris Zúñiga-Dávila, Fernando González-Andrés, Ernesto Ormeño-Orrillo (eds.), *Microbial Probiotics for Agricultural Systems*. doi:10.1007/978-3-030-17597-9\_6.
- Bashan, Y., De-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., and Hernandez, J. P. (2014) "Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013)". *Plant and Soil* 378, 1-33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.



- Beekham, A., Umaharan, P., and Lawrence, A. W. (2010) "Comparative evaluation of genetic variation for pod and seed quality in indeterminate and short duration vegetable pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp)", *Tropical Agriculture* 87(1), 11-20.
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A. and Tyagi, R. D. (2007) "Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review", *Bioresource Technology* 98(18), 3535–3546. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.066.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Sayers, E. W. (2013) "GeneBank", *Nucleic Acids Research* 41, 36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., and Bakker, P. A. H. M. (2012) "The rhizosphere microbiome and plant health", *Trends in Plant Science* 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- Besset-Manzoni, Y., Rieusset, L., Joly, P., Comte, G., and Prigent-Combaret, C. (2018) "Exploiting rhizosphere microbial cooperation for developing sustainable agriculture strategies", *Environmental Science and Pollution Research* 25, 29953-29970. doi:10.1007/s11356-017-1152-2.
- Bhattacharjee, S. and Dutta Sharma, G. (2012) "Effect of Dual Inoculation of Arbuscular Mycorrhiza and Rhizobium; on the Chlorophyll, Nitrogen and Phosphorus Contents of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.)", *Advances in Microbiology* 2(4), art. 25945. doi:10.4236/aim.2012.24072.
- Boye, J., Zare, F., and Pletch, A. (2010) "Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed", *Food Research International* 43(2), 414-431. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.003.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. (2003) "Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes", *Plant and Soil* 252(1), 55–128. doi:10.1023/A:1024146710611.
- Cassán, F., and Diaz-Zorita, M. (2016) "Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field", *Soil Biology and Biochemistry* 103: 117-130 doi:10.1016/j.soilbio.2016.08.020.
- Cedano, J. (2006) "Guía técnica cultivo de guandul", Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Santo Domingo, República Dominicana, 86 pp.
- Cerutti, A. K., Bruun, S., Beccaro, G. L. and Bounous, G. (2011) "A review of studies applying environmental impact assessment methods on fruit production systems", *Journal of Environmental Management* 92(10), 2277-86. doi:10.1016/j.jenvman.2011.04.018.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., and Bedmar, E. J. (2011) "Bradyrhizobium cytisi sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(12), 2922–2927. doi:10.1099/ijls.0.027649-0.
- Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A. K., Prakash, A., Gupta, G. and Shukla, P. (2020) "Techniques for improving formulations of bioinoculants", *3 Biotech* 10, art. 199. doi:10.1007/s13205-020-02182-9.
- Checucci, A., DiCenzo, G. C., Bazzicalupo, M. and Mengoni, A. (2017) "Trade, Diplomacy, and Warfare: The Quest for Elite Rhizobia Inoculant Strains", *Frontiers in Microbiology*. 8, art. 2207. doi:10.3389/fmicb.2017.02207.
- Chemining'wa, G. N. and Vessey, J. K. (2006) "The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in cultivated soils of the eastern Canadian prairie", *Soil Biology and Biochemistry* 38 (2), 294–302. doi:10.1016/j.soilbio.2005.05.007.
- Chun, J. and Goodfellow, M. (1995) "A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences", *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(2), 240–245 doi:10.1099/00207713-45-2-240.
- Costa, F. M., Schiavo, J. A., Brasil, M. S., Leite, J., Xavier, G. R. and Fernandes, P. I. (2014) "Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal", *Genetics and Molecular Research* 13(1), 469–482. doi:10.4238/2014.January.21.16.
- Davies-Barnard, T. and Friedlingstein, P. (2020) "The Global Distribution of Biological Nitrogen Fixation in Terrestrial Natural Ecosystems", *Global Biogeochemical Cycles* 34(3) e2019GB006387. doi:10.1029/2019GB006387.
- Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D. ., Camacho, M., Orive, R., and Temprano, F. (2000) "Perlite as a carrier for bacterial inoculants", *Soil Biology and Biochemistry* 32(4), 567–572. doi:10.1016/S0038-0717(99)00185-6.
- Degefu, T., Wolde-meskel, E. and Frostegård, Å. (2013) "Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia", *Systematic and Applied Microbiology* 36(4), 272–280 doi:10.1016/j.syapm.2013.03.004.
- Dekamin, M., Barmaki, M. and kanooni, A. (2018) "Selecting the best environmental friendly oilseed crop by using Life Cycle Assessment, water footprint and analytic hierarchy process methods", *Journal of Cleaner Production* 198, 1239–1250. doi:10.1016/j.jclepro.2018.07.115.
- Dellagi, A., Quillere, I. and Hirel, B. (2020) "Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition", *Journal of Experimental Botany*, eraa112 doi:10.1093/jxb/eraa112.

- Desbrosses, G. J. and Stougaard, J. (2011) "Root nodulation: A paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways", *Cell Host and Microbe* 10(4), 348-358. doi:10.1016/j.chom.2011.09.005.
- Diacono, M., Persiani, A., Testani, E., Montemurro, F. and Ciaccia, C. (2019) "Recycling agricultural wastes and by-products in organic farming: Biofertilizer production, yield performance and carbon footprint analysis", *Sustainability (Switzerland)*. 11(14), 3824. doi:10.3390/su11143824.
- Díaz-Alcántara, C.A; Vicioso-Alcalá, A.F; Urbano López de Meneses, B; Rivas,R; Velázquez, E; Terrón, A; González-Andrés, F. (2014) "Programa de generación de capacidades para el diseño y aplicación de Tecnología Apropriada en la agricultura de República Dominicana": Biofertilizantes y productos de biocontrol basados en microorganismos. Pp. 35-64 en González-Andrés, F. y Urbano, B. (eds.) *Investigación Agraria para el Desarrollo Sostenible: Análisis de casos internacionales*. Universidad de León, España. ISBN 978-84-9773-680-0.
- do Carmo, H. F., Madari, B. E., Wander, A. E., Moreira, F. R. B., Gonzaga, A. C. de O., da Silveira, P. M., Silva, A. G., da Silva, J. G. and de Almeida, P. L. O. M. (2016) "Energy balance and carbon footprint in the conventional and integrated production systems of irrigated common bean", *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51(9), 1069-1077. doi:10.1590/s0100-204x2016000900006.
- Drevon, J. J., Abadie, J., Alkama, N., Andriamananjara, A., Amenc, L., Bargaz, A., Carlsson, G., Jaillard, B., Lazali, M., Ghoulam, C., Ounane, S. M., Catherine Pernot, Bouaziz Sifi., Fatma Tajini and Mainassera Zaman-Allah. (2015) "Phosphorus Use Efficiency for N<sub>2</sub> Fixation in the Rhizobial Symbiosis with Legumes", De Bruijn (ed.) *Biological Nitrogen Fixation* pp. 455–464. doi:10.1002/9781119053095.ch46.
- Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Kumar, H. and Choure, K. (2010) "Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L", *African Journal of Biotechnology* 9(50), 8619–8629. doi:10.5897/AJB10.1127.
- Durlinger, B., Tyszler, M., Scholten, J., Broekema, R. and Blonk, H. (2014) "Agri-Footprint ; a Life Cycle Inventory database covering food and feed production and processing", *Proceedings of the 9th International Conference on Life Cycle Assessment in the Agri-Food Sector*.
- Dutta, S., Morang, P., Kumar S, N. and Dileep Kumar, B. S. (2014) "Two rhizobacterial strains, individually and in interactions with *Rhizobium* sp., enhance fusarial wilt control, growth, and yield in pigeon pea", *Journal of Microbiology* 52(9), 778–784. doi:10.1007/s12275-014-3496-3.
- Dwivedi, S. L., Sahrawat, K. L., Upadhyaya, H. D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E. G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M. W. and Ortiz, R. (2015) "Advances in Host Plant and *Rhizobium* Genomics to Enhance Symbiotic Nitrogen Fixation in Grain Legumes", *Advances in Agronomy* 129, 1–116. doi:10.1016/bs.agron.2014.09.001.
- Egamberdieva, D., Reckling, M. and Wirth, S. (2017) "Biochar-based Bradyrhizobium inoculum improves growth of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) under drought stress", *European Journal of Soil Biology*. Elsevier Masson 78, 38–42. doi:10.1016/j.ejsobi.2016.11.007.
- Elias, N. V. and Herridge, D. F. (2015) "Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea", *Plant and Soil* 387(1–2), 233–249. doi:10.1007/s11104-014-2298-z.
- España, M., Cabrera-Bisbal, E. and Lapez, M. (2006) "Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from venezuelan savannas using 15N", *Interciencia* 31(3), 197-201.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. (1989) "Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains", *International Journal of Systematic Bacteriology* 39(3), 224-229. doi:10.1099/00207713-39-3-224.
- FAOSTAT. (2020) "Food and Agriculture Data". Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (visto 26 mayo 2020).
- Fernandes, M. F., Fernandes, R. P. M. and Hungria, M. (2003) "Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe", *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38(7), 835–842. doi:10.1590/s0100-204x2003000700007.
- Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, M. de la E., García-Fraile, P. and Rivas, R. (2013) "Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops", *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176(6), 876–882. doi:10.1002/jpln.201300116.
- Fossou, R. K., Pothier, J. F., Zézé, A. and Perret, X. (2020) "*Bradyrhizobium ivorense* sp. Nov. as a potential local bioinoculant for *cajanus cajan* cultures in côte d'ivoire", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(2), 1421–1430. doi:10.1099/ijsem.0.003931.

- Fossou, R. K., Ziegler, D., Zézé, A., Barja, F. and Perret, X. (2016) "Two major clades of bradyrhizobia dominate symbiotic interactions with pigeonpea in fields of Côte d'Ivoire", *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2016.01793.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsend, A. R. and Vörösmarty, C. J. (2004) "Nitrogen cycles: Past, present, and future", *Biogeochemistry* 70(2), 153–226. doi:10.1007/s10533-004-0370-0.
- Goglio, P., Smith, W. N., Grant, B. B., Desjardins, R. L., McConkey, B. G., Campbell, C. A. and Nemecek, T. (2015) "Accounting for soil carbon changes in agricultural life cycle assessment (LCA): A review", *Journal of Cleaner Production* 104(1), 23–31. doi:10.1016/j.jclepro.2015.05.040.
- Grange, L., Hungria, M., Graham, P. H. and Martínez-Romero, E. (2007) "New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil", *Soil Biology and Biochemistry* 39(4), 867–876. doi:10.1016/j.soilbio.2006.10.008.
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., El Idrissi, M. M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E. J. and Peix, A. (2013) "Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*", *Systematic and Applied Microbiology* 36(4), 218–223. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.001.
- Guimarães, S. L., Neves, L. C. R. D., Bonfim-Silva, E. M. and Da Silva Campos, D. T. (2016) "Development of pigeon pea inoculated with rhizobium isolated from cowpea trap host plants | Desenvolvimento do feijão guandu inoculado com rizóbio isolado de plantas iscas de feijão caupi", *Revista Caatinga* 29(4), 789–795. doi:10.1590/1983-21252016v29n402rc.
- Hale, L., Luth, M. and Crowley, D. (2015) "Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite", *Soil Biology and Biochemistry*, 81, pp. 228–235. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B. and Boddey, R. M. (2008) "Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems", *Plant and Soil* 311(1–2), pp. 1–18. doi:10.1007/s11104-008-9668-3.
- Herrmann, L. and Lesueur, D. (2013) "Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation", *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(20), 8859–8873. doi:10.1007/s00253-013-5228-8.
- Howieson, J. and Ballard, R. (2004) "Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - Some contemporary thoughts", in *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1261–1273. doi:10.1016/j.soilbio.2004.04.008.
- INDRHI.(2018) "Plan Operativo INDRHI Periodo Enero - diciembre 2018". Instituto Nacional de los Recursos Hidráulicos. Santo Domingo, República Dominicana.
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F. A., Rebuffo, M. and Monza, J. (2019) "Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover", *Frontiers in Microbiology*. 10, 768. doi:10.3389/fmicb.2019.00768.
- ISO (2006a) "ISO 14040: Environmental management—life cycle assessment—Principles and framework", International organization for standardization.
- ISO (2006b) "ISO 14044: Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines", International Organization for Standardization.
- JAD (2009) "Estrategia para el desarrollo agropecuario y agroindustrial sostenible de la república dominicana 2010 – 2030", Tomo I: fortalezas, desafíos y oportunidades Junta Agroempresarial Dominicana, Santo Domingo <http://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2009/01/DIAGNOSTICO-SECTOR-AGROPECUARIO.pdf> (visto 29/05/2020)
- Keswani, C., Prakash, O., Bharti, N., Vilchez, J. I., Sansinenea, E., Lally, R. D., Borriss, R., Singh, S. P., Gupta, V. K., Fraceto, L. F., de Lima, R. and Singh, H. B. (2019) "Re-addressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria", *Science of the Total Environment* 690(10), 841–852. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.046.
- Khoury, C. K., Castañeda-Alvarez, N. P., Achicanoy, H. A., Sosa, C. C., Bernau, V., Kassa, M. T., Norton, S. L., van der Maesen, L. J. G., Upadhyaya, H. D., Ramírez-Villegas, J., Jarvis, A. and Struik, P. C. (2015) "Crop wild relatives of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]: Distributions, ex situ conservation status, and potential genetic resources for abiotic stress tolerance", *Biological Conservation* 184, 259–270. doi:10.1016/j.biocon.2015.01.032.
- Khurana, A.L., Dudeja S.S. (1981) "Field populations of rhizobia and response to inoculation, molybdenum and nitrogen fertilizer in pigeonpea". In: *Proceedings of the International Workshop on Pigeonpea* ed. ICRISAT Centre, Patancheru, India, pp. 381–386.

- Kimura, M. (1980) "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *Journal of Molecular Evolution* 16(2), 111–120. doi:10.1007/BF01731581.
- Kloepper, J. W. (1980) "Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield", *Phytopathology* 70(11), 1078. doi:10.1094/phyto-70-1078.
- Koskey, G., Mburu, S. W., Njeru, E. M., Kimiti, J. M., Ombori, O. and Maingi, J. M. (2017a) "Potential of native rhizobia in enhancing nitrogen fixation and yields of climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in contrasting environments of eastern Kenya", *Frontiers in Plant Science* 8, 443. doi:10.3389/fpls.2017.00443.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R. and Amarger, N. (2003) "Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes", *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2276–2283. doi:10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003.
- Lajudie, P., Young, P.W. (2020) "International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria Minutes of the closed meeting by videoconference, 17 July 2019 Meeting Report", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(5): 3563–3571. doi:10.1099/ijsem.0.004157
- Lane, D. J. (1991) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Development and Application of Nucleic Acid Probes*.
- Liu, Y., Jiang, X., Guan, D., Zhou, W., Ma, M., Zhao, B., Cao, F., Li, L. and Li, J. (2017) "Transcriptional analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates", *Scientific Reports* 7, art: 10946. doi:10.1038/s41598-017-11372-0.
- López-Cano, I., Cayuela, M. L., Sánchez-García, M. and Sánchez-Monedero, M. A. (2018) "Suitability of different agricultural and urban organic wastes as feedstocks for the production of biochar-Part 2: Agronomical evaluation as soil amendment", *Sustainability (Switzerland)* 10(6), 2077. doi:10.3390/su10062077.
- Lupwayi, N. Z., Clayton, G. W. and Rice, W. A. (2006) "Rhizobial Inoculants for Legume Crops", *Journal of Crop Improvement* 15(2), 289–321. doi:10.1300/j411v15n02\_09.
- Mahato, A. K., Sharma, A. K., Sharma, T. R. and Singh, N. K. (2018) "An improved draft of the pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) genome", *Data in Brief* 16, 376–380. doi:10.1016/j.dib.2017.11.066.
- Marcano, I.-E., Díaz-Alcántara, C.-A., Urbano, B. and González-Andrés, F. (2016) "Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop", *Soil Biology and Biochemistry* 99, 1–20. doi:10.1016/j.soilbio.2016.04.013.
- Martínez, J., Negrete-Yankelevich, S., Godínez, L. G., Reyes, J., Esposti, M. D. and Martínez Romero, E. (2016) "Short-Term Evolution of Rhizobial Strains Toward Sustainability in Agriculture", in *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*. Singapore: Springer Singapore, pp. 277–292. doi:10.1007/978-981-10-2555-6\_13.
- Martínez, J., Negrete-Yankelevich, S., Godínez, L. G., Reyes, J., Esposti, M. D., and Martínez Romero, E. (2016) Short-Term Evolution of Rhizobial Strains Toward Sustainability in Agriculture, " in *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability* (Singapore: Springer Singapore), 277–292. doi:10.1007/978-981-10-2555-6\_13.
- Meghvansi, M. K., Prasad, K. and Mahna, S. K. (2010) "Symbiotic potential, competitiveness and compatibility of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* isolates to three soybean genotypes of two distinct agro-climatic regions of Rajasthan, India", *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(4), 303–310. doi:10.1016/j.sjbs.2010.06.002.
- Menéndez, E. and Paço, A. (2020) "Is the application of plant probiotic bacterial consortia always beneficial for plants? Exploring synergies between rhizobial and non-rhizobial bacteria and their effects on agro-economically valuable crops", *Life* 10(3), 24. doi:10.3390/life10030024.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N. and Martínez-Romero, E. (2006) "Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants", *Systematic and Applied Microbiology* 29(4), 315–332. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.002.
- Ministerio de Agricultura, República Dominicana. (2020) "Estadísticas Agropecuarias". <http://agricultura.gob.do/category/estadisticas-agropecuarias/> (visto 29/05/2020)
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I. and Pereira, H. (2012) "Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes", *Industrial Crops and Products* 36(1), 395–400. doi:10.1016/j.indcrop.2011.10.035.
- Mula, M.G., Saxena, KB. (2010) "Lifting the Level of Awareness on Pigeonpea – A Global Perspective". *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics* ed. Andhra Pradesh, India.
- Mulas, D., Díaz-Alcántara, C., Mulas, R., Marcano, I., Barquero, M., Serrano, P. and González-Andrés, F. (2013) "Inoculants based in Autochthonous Microorganisms, a Strategy to Optimize Agronomic Performance of

- Biofertilizers", in M. Belén Rodelas González, Jesús Gonzalez-Lopez (eds.) *Beneficial Plant-microbial Interactions*. pp. 301–328. CRC Press. doi:10.1201/b15251-14.
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.-H., Casquero, P., Velázquez, E. and González-Andrés, F. (2011) "Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization", *Soil Biology and Biochemistry* 43(11), 2283-2293. doi:10.1016/j.soilbio.2011.07.018.
- Mulas, D., Seco, V., Casquero, P. A., Velázquez, E. and González-Andrés, F. (2015) "Inoculation with indigenous rhizobium strains increases yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in northern Spain, although its efficiency is affected by the tillage system", *Symbiosis* 67(1–3), 113–124. doi:10.1007/s13199-015-0359-6.
- Mulas, R; González-Andrés, F; Brañas, J; Mulas, D. (2018) "A Complex Mineral Fertilizer Comprising the *Rhizobium leguminosarum* Microorganism, Production Process and Uses Thereof". Patente Europea EP 3 085 679 B1.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y. and Vorholt, J. A. (2016) "The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives", *Annual Review of Genetics* 50(1), 211–234. doi:10.1146/annurev-genet-120215-034952.
- Nedumaran, S., Abinaya, P., Jyosthnaa, P., Shraavya, B., Rao, P., Bantilan, C. (2015) "Grain Legumes Production, Consumption and Trade Trends in Developing Countries". ICRISAT Research Program, Markets, Institutions and Policies Working Paper Series 502(60), 4-7. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.41>.
- Nobbe, F., Hiltner, L. (1896) "Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants". US Patent. 570813.
- Oliveira, J. P., Galli-Terasawa, L. V., Enke, C. G., Cordeiro, V. K., Armstrong, L. C. T. and Hungria, M. (2011) "Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(3), 643–650. doi:10.1007/s11274-010-0501-9.
- ONE (2015) "VIII Censo Nacional Agropecuario". Oficina Nacional de Estadística de la República Dominicana. Santo Domingo, República Dominicana. <https://cenagro.one.gob.do/> (Visto 26/05/2020)
- Ouma, E. W., Asango, A. M., Maingi, J. and Njeru, E. M. (2016) "Elucidating the Potential of Native Rhizobial Isolates to Improve Biological Nitrogen Fixation and Growth of Common Bean and Soybean in Smallholder Farming Systems of Kenya", *International Journal of Agronomy*. 7, art. 4569241. doi:10.1155/2016/4569241.
- Oviedo, F., Cedano, J., Carrasco, A., Godoy de Lutz, G., Arias, J., Segura, Y. (2013) "Arroyo Loro IDIAF: Variedad de guandul de alta productividad". Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales ed. Santo Domingo, República Dominicana.
- Pacheco, R. S., Boddey, R. M., Alves, B. J. R., Stralio, R. and Araújo, A. P. (2017) "Growth patterns of common bean cultivars affect the "B" value required to quantify biological N<sub>2</sub> fixation using the 15N natural abundance technique". *Plant and Soil* 419(1–2), 293–304. doi:10.1007/s11104-017-3331-9.
- Pastor-Bueis, R., Mulas, R., Gómez, X. and González-Andrés, F. (2017) "Innovative liquid formulation of digestates for producing a biofertilizer based on *Bacillus siamensis*: Field testing on sweet pepper", *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 180(6), 748–758. doi:10.1002/jpln.201700200.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E. K. and González-Andrés, F. (2019) "Formulation of a Highly Effective Inoculant for Common Bean Based on an Autochthonous Elite Strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, and Genomic-Based Insights Into Its Agronomic Performance", *Frontiers in Microbiology* 17. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02724.
- Pereg, L. and McMillan, M. (2015) "Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems", *Soil Biology and Biochemistry* 80, 349-358. doi:10.1016/j.soilbio.2014.10.020.
- Poole, P., Ramachandran, V. and Terpolilli, J. (2018) "Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts", *Nature Reviews Microbiology* 16, 291–303. doi:10.1038/nrmicro.2017.171
- PRé Sustainability (2018) About SimaPro, <https://simapro.com/about/> (accessed 22 June 2020).
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X. and Yuan, Z. (2016) "Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture", *Biotechnology Advances* 34(7), 1245-1259. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.005.
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Willems, A. and Velázquez, E. (2009) "*Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(8), 1929–1934. doi:10.1099/ijs.0.006320-0.
- Ramsubhag, A., Umaharan, P. and Donawa, A. (2002) "Partial 16S rRNA gene sequence diversity and numerical taxonomy of slow growing pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) nodulating rhizobia", *FEMS Microbiology Letters* 216(2), 139–144. doi:10.1016/S0378-1097(02)01007-8.
- Rigaud, J. R. and Puppo, A. (1975) "Indole 3 acetic acid catabolism by soybean bacteroids", *Journal of General Microbiology* 88(2), 223–228. doi:10.1099/00221287-88-2-223.

- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E. and Velázquez, E. (2006) "Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils", *Plant and Soil* 287(1–2), 23–33. doi:10.1007/s11104-006-9062-y.
- Rivera-Cruz, M. del C., Trujillo Narcía, A., Córdova Ballona, G., Kohler, J., Caravaca, F. and Roldán, A. (2008) "Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops", *Soil Biology and Biochemistry* 40(12), 3092–3095. doi:10.1016/j.soilbio.2008.09.003.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M. and Santamaria, C. (2000) "Characterization of Rhizobium spp. bean isolates from South-West Spain", *Soil Biology and Biochemistry* 32(11–12), 1601–1613. doi:10.1016/S0038-0717(00)00074-2.
- Rosas, J. G., Gómez, N., Cara, J., Ubalde, J., Sort, X. and Sánchez, M. E. (2015) "Assessment of sustainable biochar production for carbon abatement from vineyard residues", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 113, 239–247. doi:10.1016/j.jaap.2015.01.011.
- Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I. (2016) "Microbes drive evolution of animals and plants: The hologenome concept", *mBio* 7(2) e01395-15. doi:10.1128/mBio.01395-15.
- Rufini, M., Oliveira, D. P., Trochmann, A., Soares, B. L., de Andrade, M. J. B. and Moreira, F. M. de S. (2016) "Bradyrhizobium spp. Strains in symbiosis with pigeon pea cv. Fava-Larga under greenhouse and field conditions", *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 40, e0160156. doi:10.1590/18069657rbcs20160156.
- Saad, M. M., Eida, A. A. and Hirt, H. (2020) "Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application", *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/eraa111.
- Saikia, J., Saikia, L., Phookan, D. B., and Nath, D. J. (2018) "Effect of biofertilizer consortium on yield, quality and soil health of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Legume Research* 41(5) 755–758. doi.org/10.18805/LR-4460
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.", *Molecular Biology and Evolution* 4(4), 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Durán, D., Nadendla, S., Albareda, M., Rubio-Sanz, L., Lanza, M., González-Guerrero, M., Prieto, R. I., Brito, B., Giglio, M. G., Rey, L., Ruiz-Argüeso, T., Palacios, J. M. and Imperial, J. (2018) "Genomic Diversity in the Endosymbiotic Bacterium *Rhizobium leguminosarum*.", *Genes* 9(2), 60. doi:10.3390/genes9020060.
- Sanginga, N., Wirkom, L. E., Okogun, A., Akobundu, I. O., Carsky, R. J. and Tian, G. (1996) "Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savanna in Nigeria", *Biology and Fertility of Soils* 23(4), 441–448. doi:10.1007/BF00335920.
- Sasser, M. (2001) "Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids", Technical Note 101.
- Saxena, K. B. and Sawargaonkar, S. L. (2014) "First information on heterotic groups in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]", *Euphytica* 200(2), 187–196. doi:10.1007/s10681-014-1142-0.
- Schütz, L., Gattinger, A., Meier, M., Müller, A., Boller, T., Mäder, P. and Mathimaran, N. (2018) "Improving crop yield and nutrient use efficiency via biofertilization—A global meta-analysis", *Frontiers in Plant Science* 9, 1473. doi:10.3389/fpls.2017.02204.
- Semwal, D. P., Ahlawat, S. P. and Pradheep, K. (2018) "Pigeonpea [*cajanus cajan* (L.) millsp.] and its wild spp. germplasm collection status, diversity distribution and trait-specific germplasm mapping using GIS tools in India", *Legume Research* 41(5), 656–662. doi:10.18805/LR-3778.
- Semwal, DP., Ahlawat, SP. and Pradheep, K. (2018) "Pigeonpea (*Cajanuscajan* (L.) Millsp.) and its wild spp. Germplasm Collection Status, Diversity Distribution and Trait-Specific Germplasm Mapping using GIS Tools in India". *Legume Res* 41(5), 656-662.
- Serrano, P., González-Andrés., F. (2012) "Evaluación de diferentes soportes y adhesivos para la formulación de inoculantes a base de rizobios". Trabajo Fin de Máster – Máster de Investigación en Ingeniería de Biosistemas. Promoción 2011/12. Universidad de León.
- Sessitsch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H. and Martínez-Romero, E. (2002) "Advances in Rhizobium research", *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(4), 323–378. doi:10.1080/0735-260291044278.
- Sharma, R., Paliwal, J. S., Chopra, P., Dogra, D., Pooniya, V., Bisaria, V. S., Swarnalakshmi, K. and Sharma, S. (2017) "Survival, efficacy and rhizospheric effects of bacterial inoculants on *Cajanus cajan*", *Agriculture, Ecosystems and Environment* 240, 244–252. doi:10.1016/j.agee.2017.02.018.
- Silva Guzmán, H., González-Andrés, F., Urbano López de Meneses, B. (2009) "Optimización de la fertilización mineral en cultivos de regadío de República Dominicana". AECID – Publicaciones INEA, Spain.
- Singh, A. K., Singh, G., Gautam, D. and Bedi, M. K. (2013) "Optimization of dairy sludge for growth of *Rhizobium* cells", *BioMed Research International* 2013(5), 845264. doi:10.1155/2013/845264.

- Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R. (2016) "Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity": Vol. 2: Functional applications, *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. Springer, India. 1-308. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>.
- Singh, K., Gera, R., Parshad, J. (2018) "An Overview on the Potential of Pigeon pea Rhizobia". LAP Lambert Academic Publishing.
- Singh, S. P., Gutiérrez, J. A., Molina, A., Urrea, C. and Gepts, P. (1991) "Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: II. Marker-Based Analysis of Morphological and Agronomic Traits", *Crop Science* 31(1), 23–29. doi:10.2135/cropsci1991.0011183x003100010005x.
- Singh, Satnam., Rekha, P. D., Arun, A. B., Hameed, A., Singh, Sonu., Shen, F. T. and Young, C. C. (2011) "Glutamate wastewater as a culture medium for *Azospirillum rugosum* production and its impact on plant growth", *Biology and Fertility of Soils* 47(4), 419–426. doi:10.1007/s00374-011-0547-3.
- Songok, S., Ferguson, M., Muigai, A.W; Silim, S. (2010) "Genetic diversity in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Landraces as revealed by simple sequence repeat markers". *African Journal of Biotechnology* 9(22), 3231-3241.
- Stamenković, S., Bešković, V., Karabegović, I., Lazić, M. and Nikolić, N. (2018) "Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives", *Spanish Journal of Agricultural Research* 16(1), p. e09R01. doi:10.5424/sjar/2018161-12117.
- Sutton, J. C. (1973) "Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in crop plants", *Canadian Journal of Botany* 51(12), 2487–2493. doi:10.1139/b73-319.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. and Kumar, S. (2013) "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution* 30(12), 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tena, W., Wolde-Meskel, E. and Walley, F. (2016) "Symbiotic Efficiency of Native and Exotic Rhizobium Strains Nodulating Lentil (*Lens culinaris* Medik.) in Soils of Southern Ethiopia", *Agronomy* 6(1), 11. doi:10.3390/agronomy6010011.
- Tewari, S. and Sharma, S. (2020) "Rhizobial exopolysaccharides as supplement for enhancing nodulation and growth attributes of *Cajanus cajan* under multi-stress conditions: A study from lab to field", *Soil and Tillage Research* 198, art. 104545. doi:10.1016/j.still.2019.104545.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) "The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Research* 25(24), 4876–4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876.
- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N. and Manoharachari, C. (2006) "Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and Rhizobium on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*)", in *European Journal of Soil Science* 57, 67–71. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00771.x.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. and Aronsson, A. C. (2017) "Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement", *Frontiers in Plant Science*. 8, 49. doi:10.3389/fpls.2017.00049.
- Tsachidou, B., Scheuren, M., Gennen, J., Debbaut, V., Toussaint, B., Hissler, C., George, I. and Delfosse, P. (2019) "Biogas residues in substitution for chemical fertilizers: A comparative study on a grassland in the Walloon Region", *Science of the Total Environment* 666, 212–225. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.238.
- United Nations. (2019) "World Economic Situation and Prospects". [https://www.un.org/development/desa/dpad/wp-content/uploads/sites/45/WESP2019\\_BOOK-ANNEX-en.pdf](https://www.un.org/development/desa/dpad/wp-content/uploads/sites/45/WESP2019_BOOK-ANNEX-en.pdf) (accessed 05 february 2020).
- Upadhyaya, H. D., Reddy, K. N., Ramachandran, S., Kumar, V., Singh, S., Reddy, M. T. and Irshad Ahmed, M. (2015) "Status and genetic diversity in pigeonpea germplasm from Caribbean and Central American regions at ICRISAT genebank", *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation* 13(3), 247–255. doi:10.1017/S1479262114000987.
- Valenzuela, H., Smith, J. (2002) "Pigeonpea". University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Van der Maesen, L.J.G.(2006) " *Cajanus cajan* (L.) Mill sp." in Brink, M., Belay, G. (eds.), *Plant Resources of Africa 1. Cereals and Pulses*. Backhuys Publishers, Wageningen, pp. 35-47.
- Vanlauwe, B., Hungria, M., Kanampiu, F. and Giller, K. E. (2019) "The role of legumes in the sustainable intensification of African smallholder agriculture: Lessons learnt and challenges for the future", *Agriculture, Ecosystems and Environment* 284, art. 106583. doi:10.1016/j.agee.2019.106583.
- Varshney, R. K., Chen, W., Li, Y., Bharti, A. K., Saxena, R. K., Schlueter, J. A., Donoghue, M. T. A., Azam, S., Fan, G., Whaley, A. M., Farmer, A. D., Sheridan, J., Iwata, A., Tuteja, R., Penmetsa, R. V., Wu, W., Upadhyaya, H. D., Yang, S. P., Shah, T., Saxena, K. B., Michael, T., McCombie, W. R., Yang, B., Zhang, G., Yang, H., Wang, J., Spillane, C., Cook, D. R., May, G. D., Xu, X. and Jackson, S. A. (2012) "Draft genome sequence of pigeonpea

- (*Cajanus cajan*), an orphan legume crop of resource-poor farmers", *Nature Biotechnology* 30(1), 83–89. doi:10.1038/nbt.2022.
- Varshney, R. K., Penmetsa, R. V., Dutta, S., Kulwal, P. L., Saxena, R. K., Datta, S., Sharma, T. R., Rosen, B., Carrasquilla-García, N., Farmer, A. D., Dubey, A., Saxena, K. B., Gao, J., Fakrudin, B., Singh, M. N., Singh, B. P., Wanjari, K. B., Yuan, M., Srivastava, R. K., Kilian, A., Upadhyaya, H. D., Mallikarjuna, N., Town, C. D., Bruening, G. E., He, G., May, G. D., McCombie, R., Jackson, S. A., Singh, N. K. and Cook, D. R. (2010) "Pigeonpea genomics initiative (PGI): An international effort to improve crop productivity of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)", *Molecular Breeding* 26(3), 393–408. doi:10.1007/s11032-009-9327-2.
- Velázquez, E., Valverde, A., Rivas, R., Gomis, V., Peix, Á., Gantois, I., Igual, J. M., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F. and Martínez-Molina, E. (2010) "Strains nodulating *lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *bradyrhizobium*", *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 97(4), 363–376. doi:10.1007/s10482-010-9415-7.
- Vincent, J.M.J. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook 15, 164.
- Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S. K., Prasad, B. N., Moe, H., Selvaraju, S. B., Thierfelder, H. and Werner, D. (2008) "Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent", *Applied and Environmental Microbiology* 74(22), 6987–6996. doi:10.1128/AEM.00875-08.
- Wang, J. Y., Wang, R., Zhang, Y. M., Liu, H. C., Chen, W. F., Wang, E. T., Sui, X. H. and Chen, W. X. (2013) "*Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(PART2), 616–624. doi:10.1099/ij.s.0.034280-0.
- Wang, Y., Ren, W., Li, Y., Xu, Y., Teng, Y., Christie, P. and Luo, Y. (2019) "Nontargeted metabolomic analysis to unravel the impact of di (2-ethylhexyl) phthalate stress on root exudates of alfalfa (*Medicago sativa*)", *Science of the Total Environment* 646, 212–219. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.247.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991) "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology* 173(2), 697–703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Wernet, G., Bauer, C., Steubing, B., Reinhard, J., Moreno-Ruiz, E. and Weidema, B. (2016) "The ecoinvent database version 3 (part I): overview and methodology", *International Journal of Life Cycle Assessment* 21(9), 1218–1230. doi:10.1007/s11367-016-1087-8.
- Westhoek, A., Field, E., Rehling, F., Mulley, G., Webb, I., Poole, P. S. and Turnbull, L. A. (2017) "Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice", *Scientific Reports. Nature Publishing Group* 7(1), art. 1419. doi:10.1038/s41598-017-01634-2.
- White, P. J. and Broadley, M. R. (2009) "Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine", *New Phytologist* 182(1), 9–84. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x.
- Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P. and Gillis, M. (2001) "DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(4), 1315–1322. doi:10.1099/00207713-51-4-1315.
- Wolde-Meskel, E., Terefeework, Z., Frostegård, Å. and Lindström, K. (2005) "Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (4), 1439-1452. doi:10.1099/ij.s.0.63534-0.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017) "Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(5), 1613–1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755.





---

## 12. Anejos. Material suplementario de los artículos.

El material suplementario corresponde a los siguientes artículos:

	Pág.
Artículo 2. Araujo et al. 2017 .....	117
Artículo 3. Araujo et al. 2020a.....	123
Artículo 4. Araujo et al. 2020b .....	139



***Bradyrhizobium cajani* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan***

Juan Araújo<sup>1†</sup>, José David Flores-Félix<sup>2†</sup>, José M. Igual<sup>3,4</sup>, Alvaro Peix<sup>3,4</sup>, Fernando González-Andrés<sup>5</sup>, César Antonio Díaz-Alcántara<sup>1</sup>, Encarna Velázquez<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo, Dominican Republic

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Genética and Instituto Hispanoluso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Universidad de Salamanca. Salamanca, Spain

<sup>3</sup>Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (IRNASA-CSIC), Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA-CSIC, Spain

<sup>5</sup>Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad, Universidad de León, León, Spain

† These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Encarna Velázquez. Departamento de Microbiología y Genética. Lab 209. Edificio Departamental de Biología. Universidad de Salamanca. 37007 Spain. Phone: +34 923 294532. Fax number: +34 923 224876. E-mail: [evp@usal.es](mailto:evp@usal.es)

**Short title:** *Bradyrhizobium cajani* sp. nov.

**Category:** New Taxa- Probacteria

Accession numbers for type strain: 16S rRNA gene: KY349447, *recA* gene: KY349440, *glnII* gene: KY349442

**Table S1.** Results obtained with the API 20NE and API 32GN systems for *Bradyrhizobium cajani* and related type strains.

Strains: 1, *Bradyrhizobium cajani* AMBPC1010<sup>T</sup>; 2, *Bradyrhizobium cajani* AMBPC1011; 3, *B. ottawaense* HAMBI 3284<sup>T</sup>; 4, *B. americanum* CCMVU44<sup>T</sup>; 5, *B. daqingense* LMG 26137<sup>T</sup>. +, positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive reaction. Data are from this study.

<b>Characteristics</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
API 20NE results					
Nitrate reduction	+	+	-	-	+
Indole production	-	-	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+
Gelatinase	-	-	-	+	-
β-galactosidase	w	w	w	+	w
Assimilation of:					
D-glucose	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	+	+
D-mannose	+	+	-	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	-	-
D-maltose	w	w	w	-	-
Gluconate	-	-	+	+	+
Caprate	-	-	+	-	-
Adipate	+	+	-	w	+
Malate	+	+	+	-	+
Citrate	+	+	w	-	-
Phenyacetate	+	+	w	-	-
API 32GN results					
Assimilation of:					
L-Rhamnose	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	+	+	+	-	-
D-Ribose	+	+	-	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
D-Sucrose	-	-	w	-	-
D-Maltose	w	w	-	-	-
Itaconate	-	-	w	w	-
Suberate	+	+	w	-	+
Malonate	-	-	-	-	-
Acetate	-	-	-	-	-
D,L-lactate	w	w	+	+	+
L-alanine	-	-	-	-	-
5-ketogluconate	+	+	+	+	+
Glycogen	+	+	w	-	-
3-hydroxybenzoate	-	-	-	-	-
L-serine	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+

Salicin	-	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	-	-
L-fucose	+	+	-	+	+
D-sorbitol	-	-	-	W	-
L-arabinose	-	-	-	+	+
Propionate	-	-	-	-	-
Caprate	-	-	-	W	W
Valerate	W	W	W	W	W
Citrate	+	+	W	-	-
L-histidine	W	W	-	-	-
2-ketogluconate	+	+	-	-	W
3-hydroxybutyrate	-	-	-	+	W
4-hydroxybenzoate	+	-	W	+	-
L-proline	+	+	+	W	-

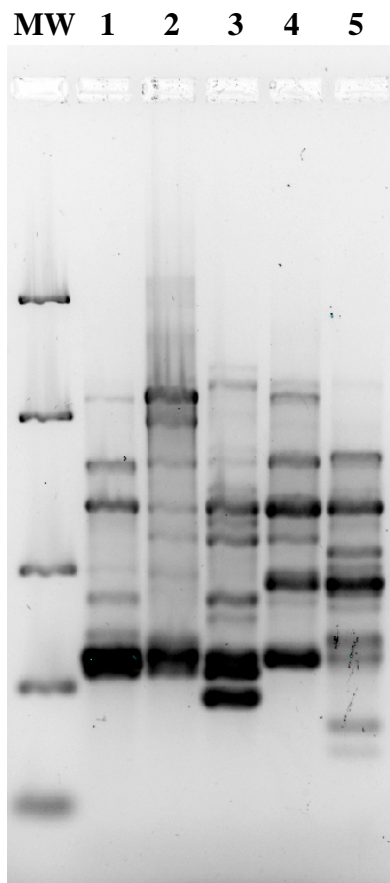


Figure S1. RAPD patterns obtained in this study: *Bradyrhizobium cajanii* AMBPC1010<sup>T</sup> (lane 1), *Bradyrhizobium cajanii* AMBPC1011 (lane 2), *Bradyrhizobium americanum* CMVU44<sup>T</sup> (lane 3) *Bradyrhizobium daqingense* LMG 26137<sup>T</sup> (lane 4), *Bradyrhizobium ottawaense* HAMBI 3284<sup>T</sup> (lane 5). MW: FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (ThermoFisher Scientific)

Supplementary material Araujo et al. (2017)

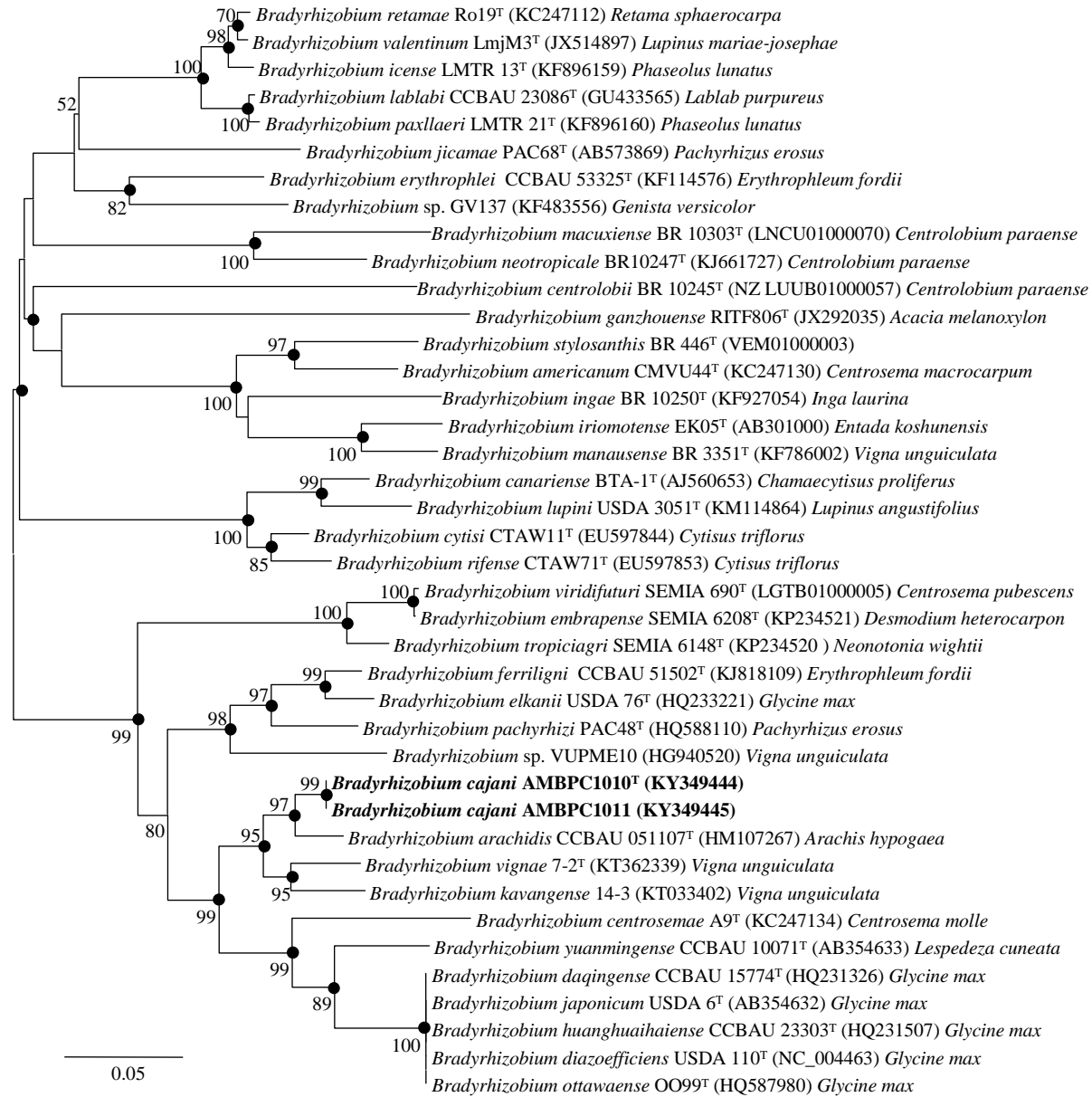


Figure S2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on *nodC* gene sequences showing the position of the *B. cajani* strains within *Bradyrhizobium* genus. Bootstrap values calculated for 1000 replications are indicated. Bar, 5 nt substitution per 100 nt. The nodes marked with filled circles were also obtained with the maximum likelihood algorithm





Table S.M.1. Edapho-climatic conditions of soils from the sites in which the field experiment was established. Underlined locations correspond to the fields sampled five weeks after emergence, to assess nodulation.

A. Edaphic characteristics																				
Location	Latitude	Longitude	Irrigated (I)/ non irrigated (NI)	Texture (%)				pH 1:2 (soil:water)	Electric conductivity (dS/m)	Organic matter (%)	Total nitrogen <sup>1</sup> (%)	Ratio C/N	Lime (%)	Phosphorus (Olsen) (mg kg <sup>-1</sup> )	Potassium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Calcium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Magnesium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Sodium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Soil Taxonomy <sup>2</sup>	Landscape topography <sup>3</sup>
				Sand	Silt	Clay	USDA													
<u>Arroyo Loro-1</u>	18° 48' 55,23"	-71° 16' 41,96"	I	23	30	47	clay	7.6	0.29	2.79	0.30	9.1	negligible	24	1.19	23.95	5.18	0.54	Typic Haplustolls	Flat
Arroyo Loro-2	18° 48' 42,50"	-71° 16' 35,82"	NI	11	26	63	clay	8.1	0.31	2.23	0.25	8.7	negligible	10	1.12	32.56	10.91	1.26	Typic Haplustolls	Almost flat
<u>Santomé</u>	18° 48' 59,82"	-71° 16' 18,12"	I	27	28	45	clay	7.2	0.14	2.37	0.23	9.3	negligible	18	0.80	26.82	5.96	0.18	Typic Haplustolls	Flat
Aromal	18° 48' 43,97"	-71° 16' 30,00"	I	36	29	36	clay loam	8.0	0.24	3.48	0.35	10.1	negligible	35	1.00	21.21	9.82	1.01	Typic Haplustolls	Flat
Wilson	18° 48' 43,20"	-71° 16' 42,00"	I	33	29	38	clay loam	7.8	0.21	2.79	0.28	8.9	negligible	17	0.78	24.45	5.32	0.93	Typic Haplustolls	Flat
Hato Viejo	18° 47' 50,78"	71° 15' 32,64"	NI	23	37	40	clay	8.4	0.22	0.84	0.11	8.2	2.3	5	0.36	21.58	3.62	0.29	Fluventic Haplustolls	Almost flat
<u>Managuayabo-1</u>	18° 46' 49,10"	-71° 13' 44,24"	I	23	41	36	clay loam	7.1	0.28	2.51	0.26	9.2	negligible	23	0.75	24.20	2.88	0.22	Fluventic Haplustolls	Flat
Managuayabo-2	18° 46' 51,00"	-71° 13' 50,21"	NI	41	33	26	loam	7.5	0.17	2.68	0.29	9.5	negligible	21	0.31	17.34	2.32	0.24	Fluventic Haplustolls	Flat
C. Growing season									D. Climatic characteristics of the growing season (year 2016) <sup>4</sup>											
									Temperatures (°C)									R (mm)		PET (mm)
Planting date			Last harvest date (IDIAF Primor – Arroyo Loro repectively)						Month		Hmax	Havg	Tavg	Lavg	Lmin					
<u>Arroyo Loro-1</u>			March 20th – July 18 th – August 12 th						March		34.2	32.3	24.8	17.2	15.4	9.6		246		
Arroyo Loro-2			March 23th – July 21 th – August 15 th						April		35.1	33.2	26.5	19.8	16.2	19.0		276		
<u>Santomé</u>			April 10th – August 7 th – August 30 th						May		35.4	33.4	26.8	20.2	15.9	66.3		273		
Aromal			March 21th – July 20 th – August 12 th						June		36.0	34.1	27.6	21.0	16.2	45.2		276		
Wilson			March 21th – July 21 th – August 15 th						July		36.9	34.6	27.6	20.6	16.9	14.4		297		
Hato Viejo			April 9th – August 6th – August 25 th						August		36.8	34.6	27.8	21.0	17.1	140.6		261		
<u>Managuayabo-1</u>			March 27th – July 24 th – August 18 th																	
Managuayabo-2			March 27th – July 25 th – August 20 th																	

<sup>1</sup> Total N: organic + nitric + ammonia nitrogen

<sup>2</sup> Soil Survey Staff. 2015. Illustrated guide to soil taxonomy. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, National Soil Survey Center, Lincoln, Nebraska.

<sup>3</sup> According to FAO–ISRIC. 1990. Guidelines for profile description. 3rd Edition. Rome. This refers to the profile in elevation of the land surface on a broad scale: Flat 0 – 0.5%; Almost flat 0,6 - 2,9%

<sup>4</sup> Hmax: maximum high temperature (°C); Havg: average high temperature (°C); Tavg: average mean temperature (°C); Lavg: average low temperature (°C); Lmin: minimum low temperature (°C); R: monthly precipitation (mm); PET: potential evapotranspiration (mm). The climatic data were recorded at the San Juan de la Maguana provincial meteo station.

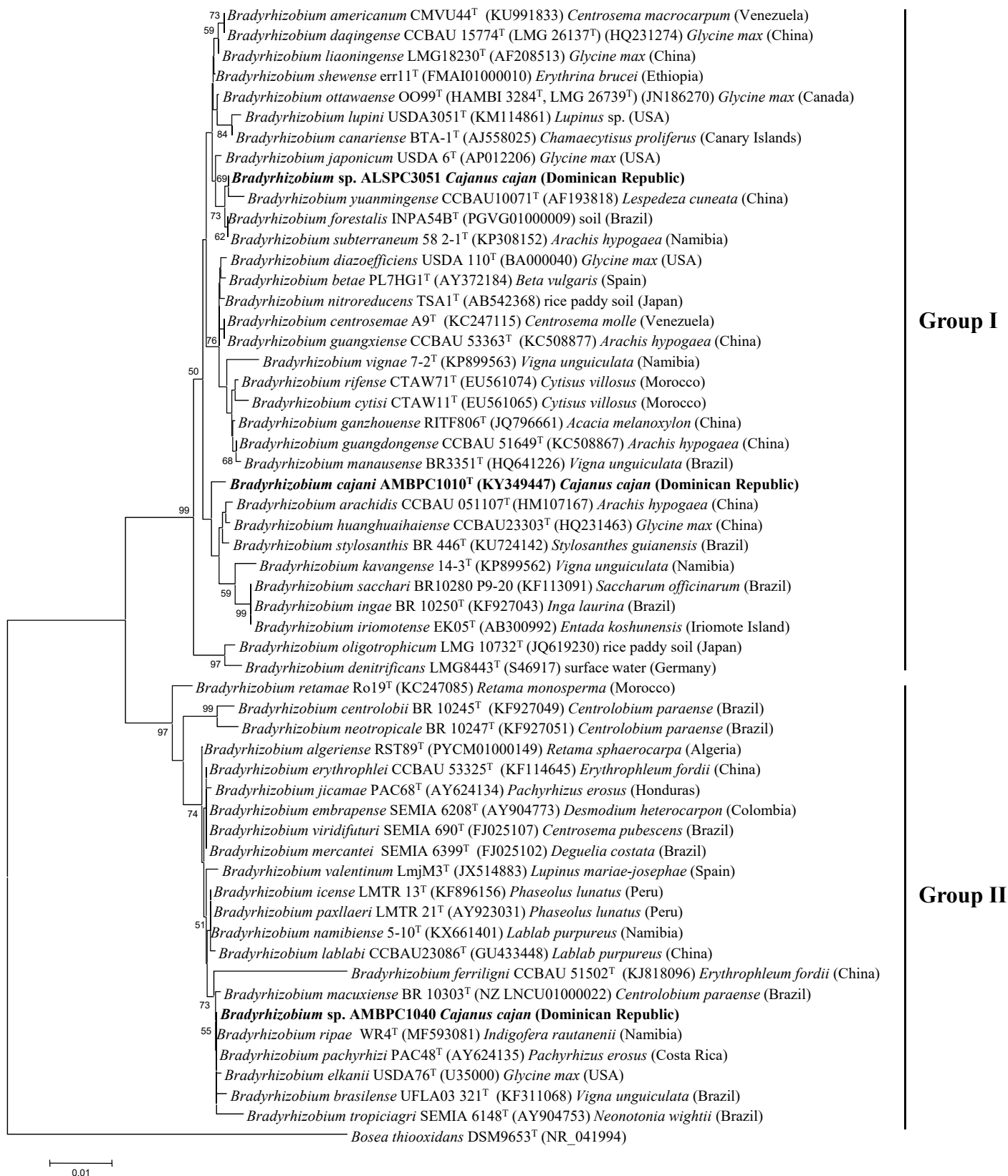
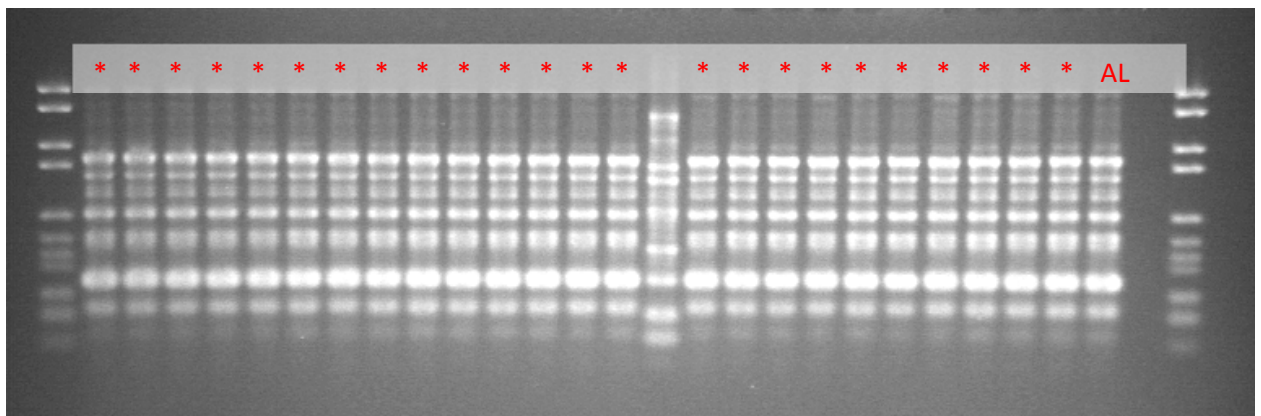
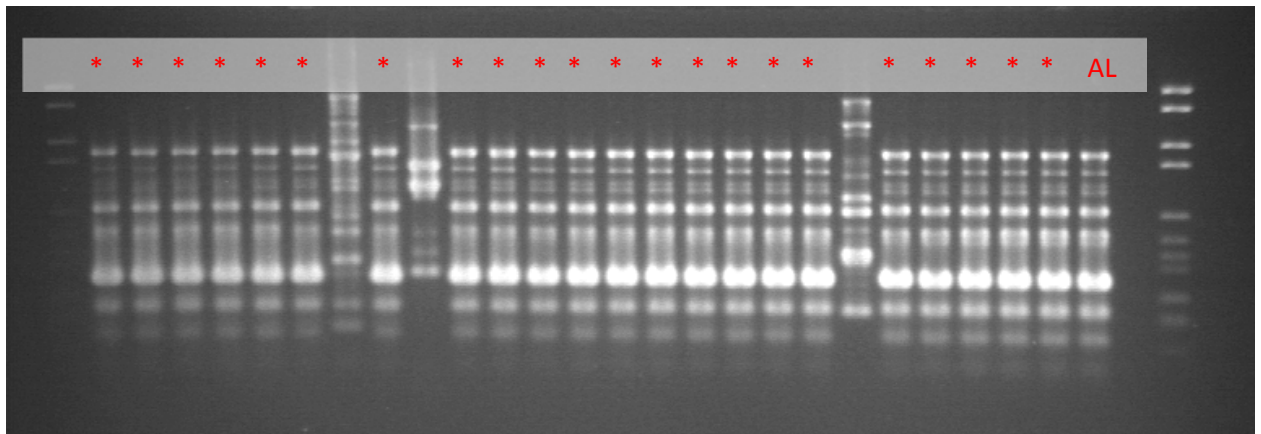
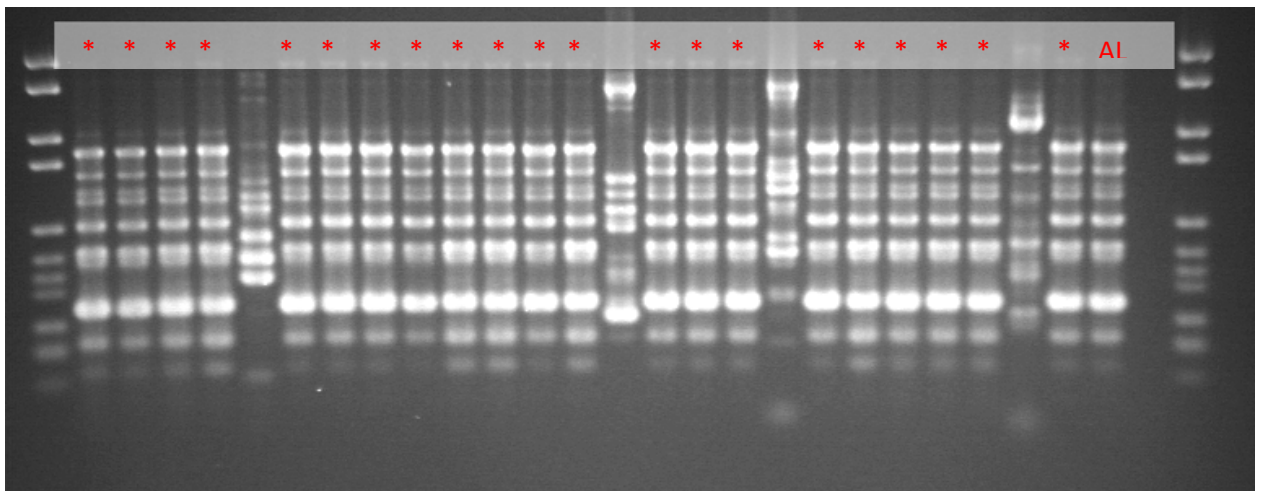


Figure S.M. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the position of the *Bradyrhizobium* strains included in this study which were isolated from *Cajanus cajan* nodules. Bootstrap values calculated for 1000 replications are indicated. Bar, 1 nt substitution per 100 nt.

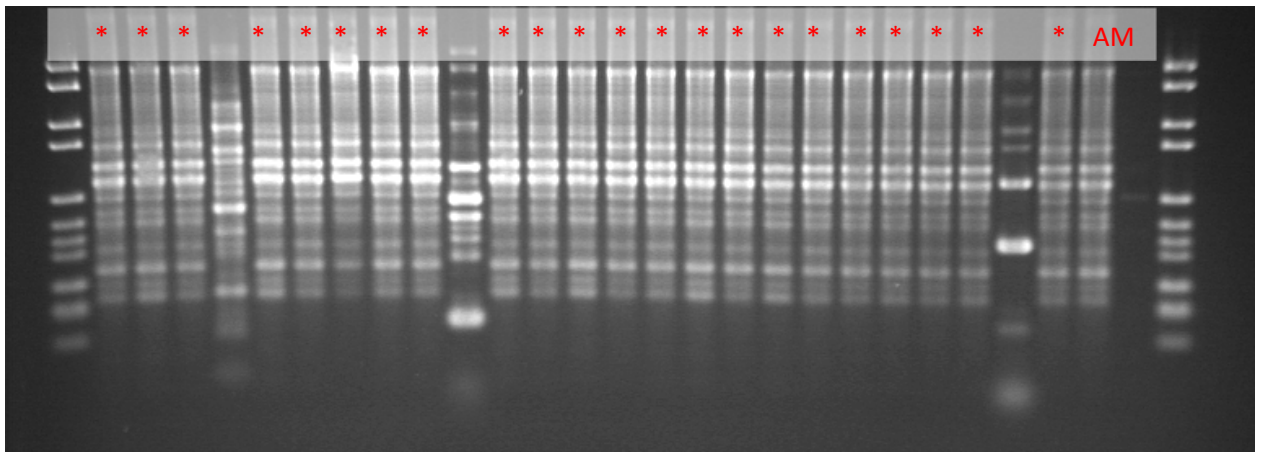
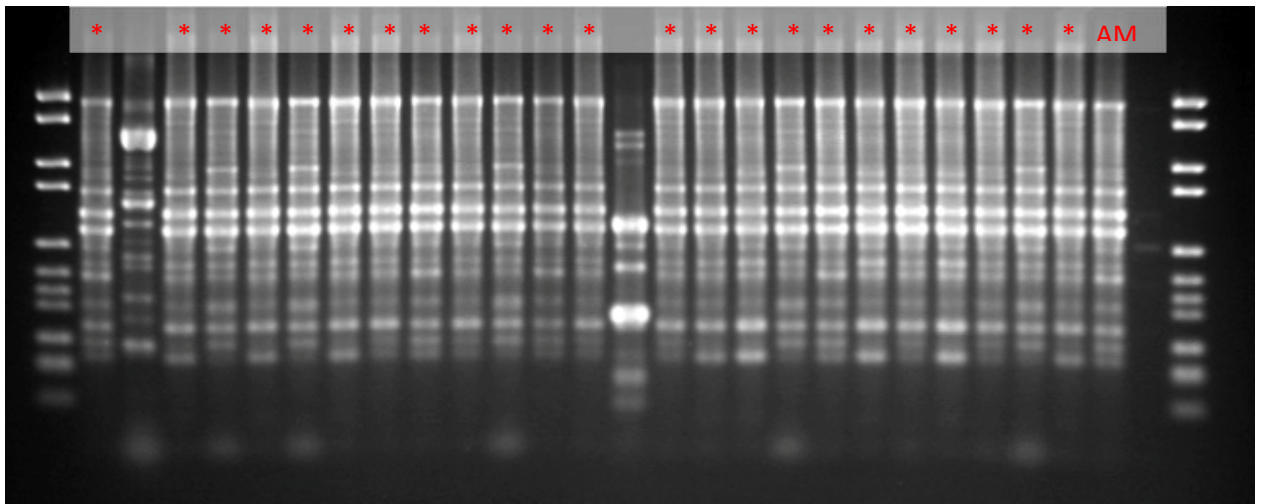
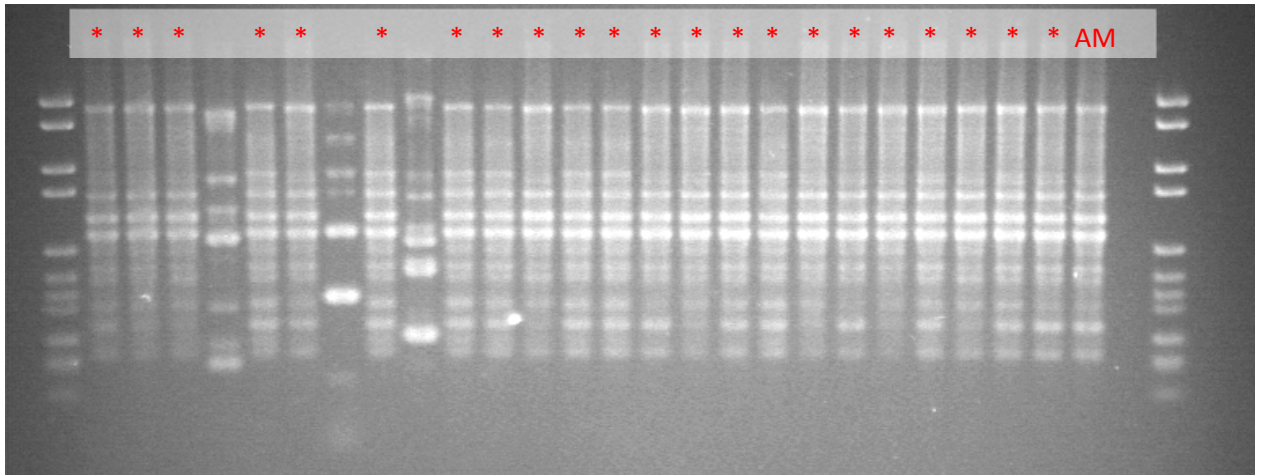
Figure S.M.3. RAPD patterns obtained in the nodulation assessment five weeks after the emergence of the plants in the field trial. The three photographs for each field, carrier and strain corresponds to each of the three blocks in the experimental design. For each block, the number of nodules was 25 corresponding to five plants and five nodules per plant. The primer used was M13 according to Rivas et al. (2006). AL means the pattern corresponding to the inoculated strain ALSPC3051 and AM means the pattern corresponding to the inoculated strain AMBPC1040. The red asterisk indicates the lanes with the same pattern than the inoculated strain. The last lane was the blank.

**Field: MANOGUAYABO-1 ( $3.1 \times 10^1$  nodulating bacteria per g of soil)**

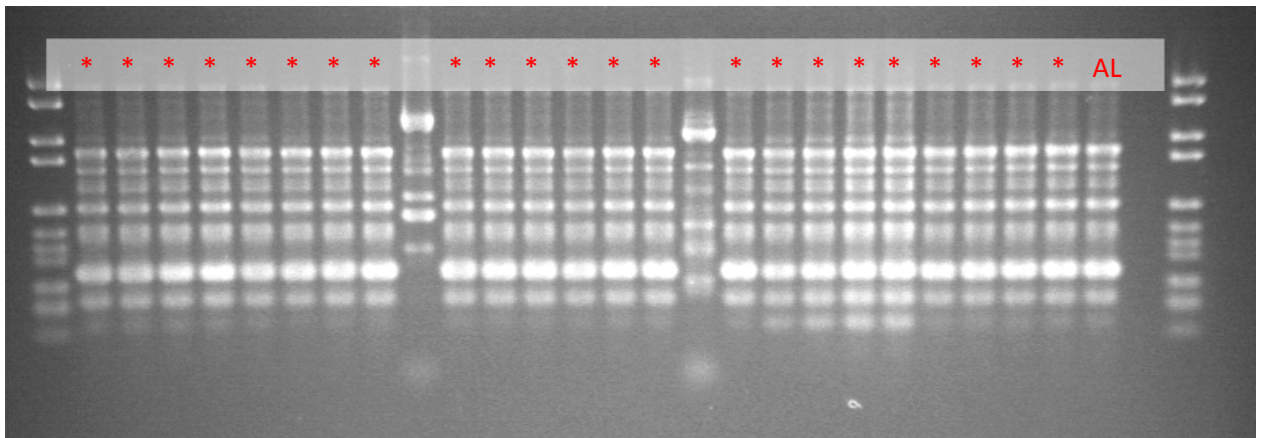
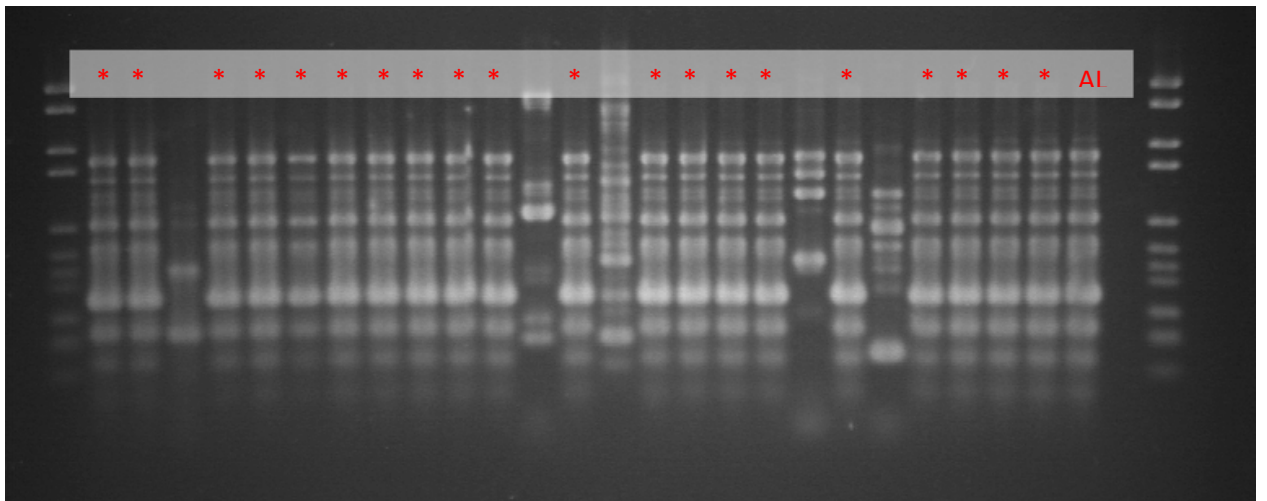
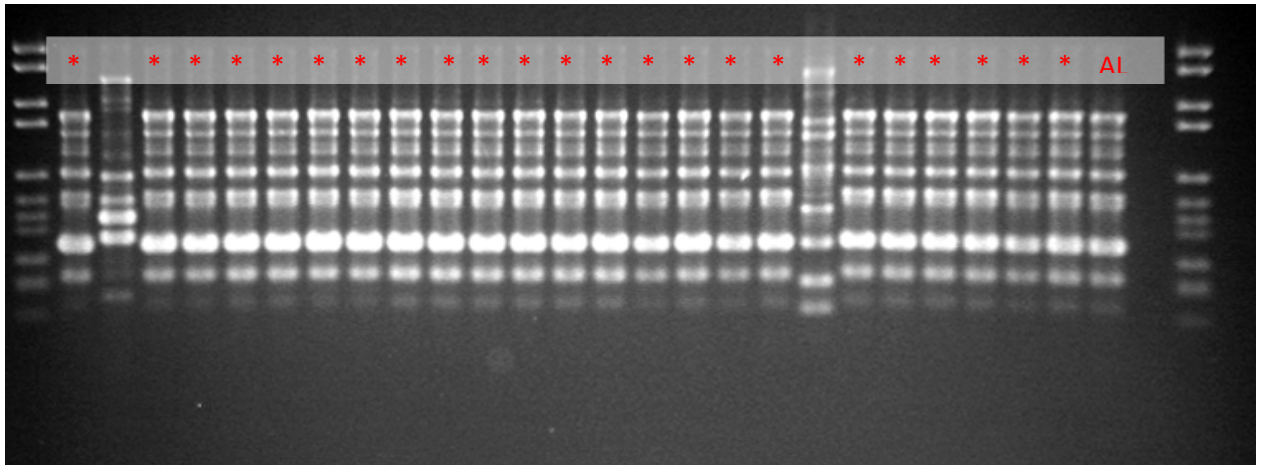
**Carrier pine bark biochar/Strain ALSPC 3051**



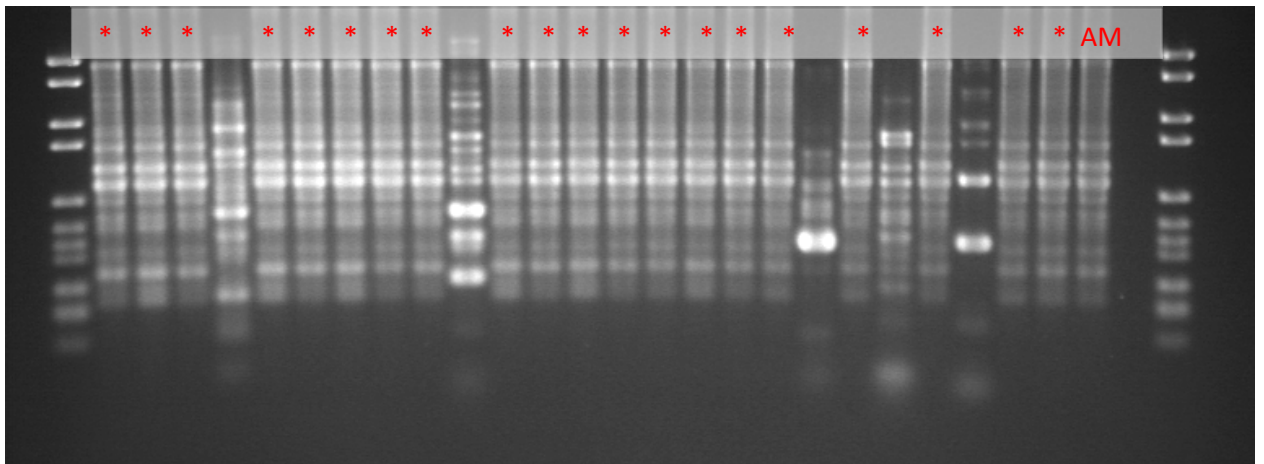
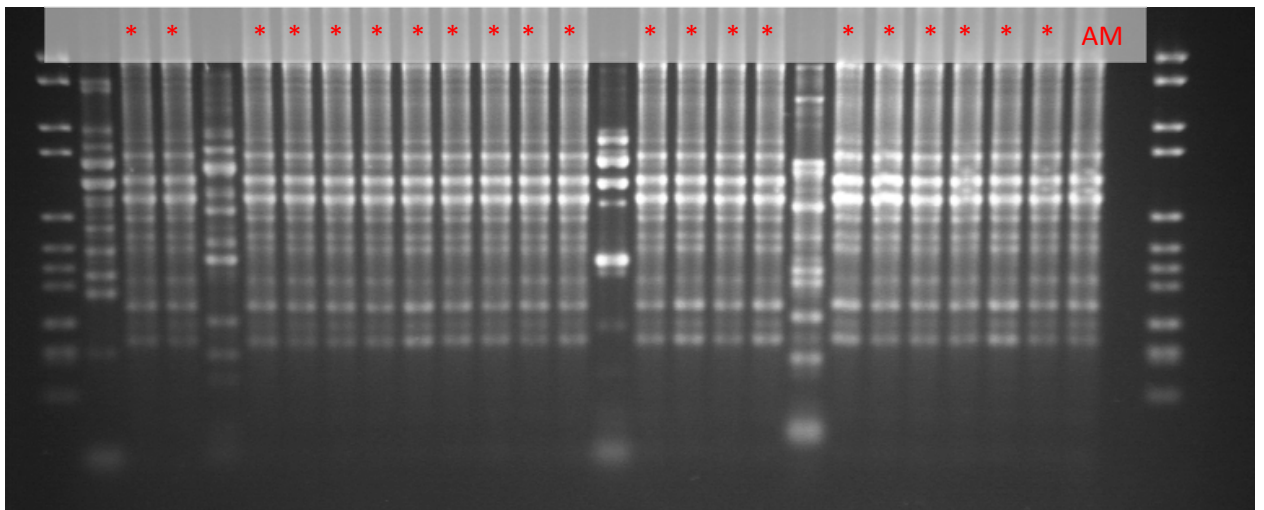
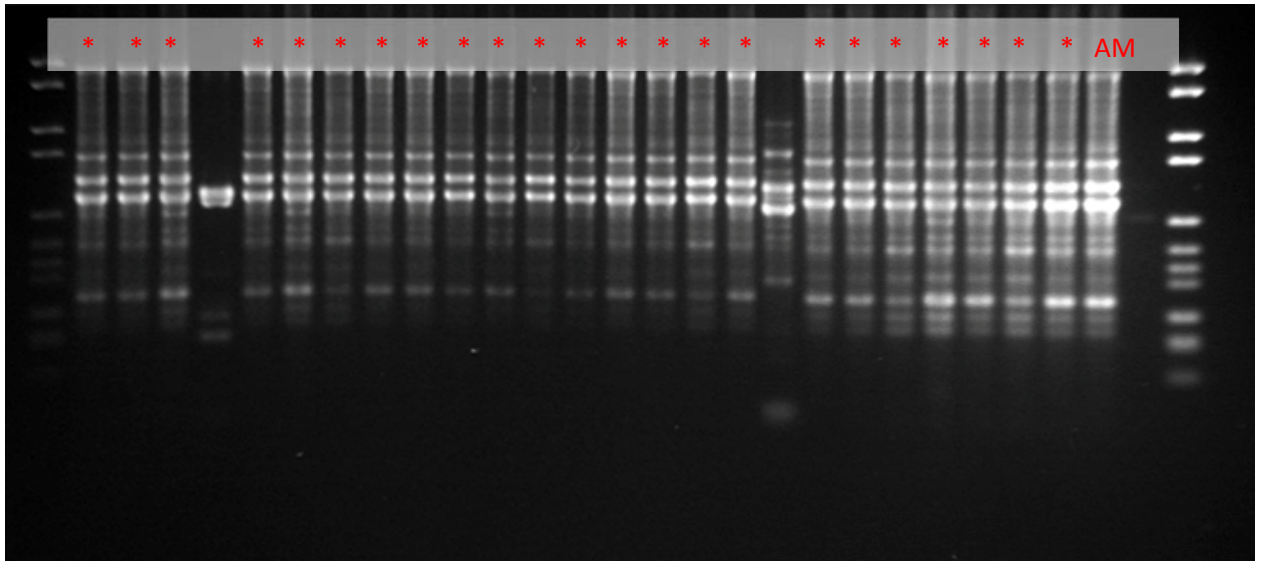
Carrier pine bark biochar/Strain AMBPC 1040



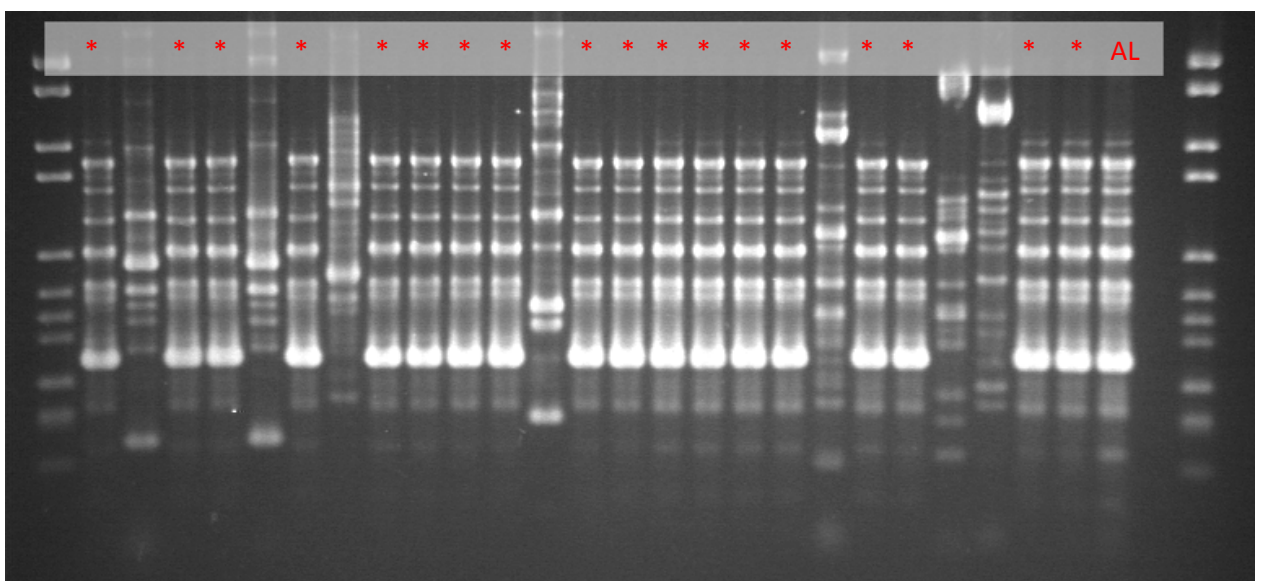
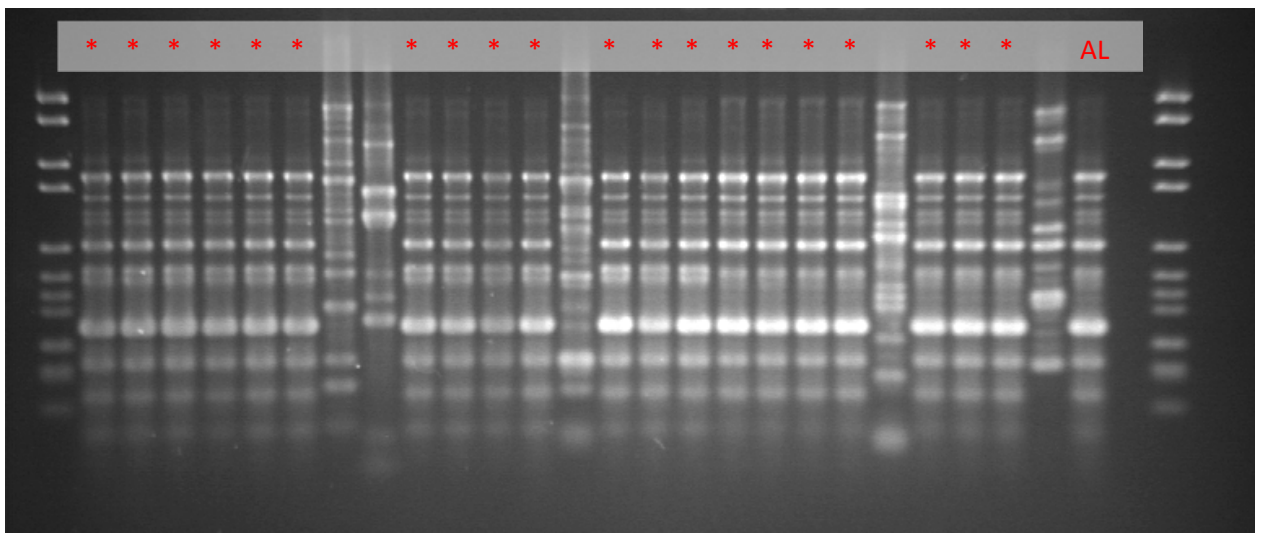
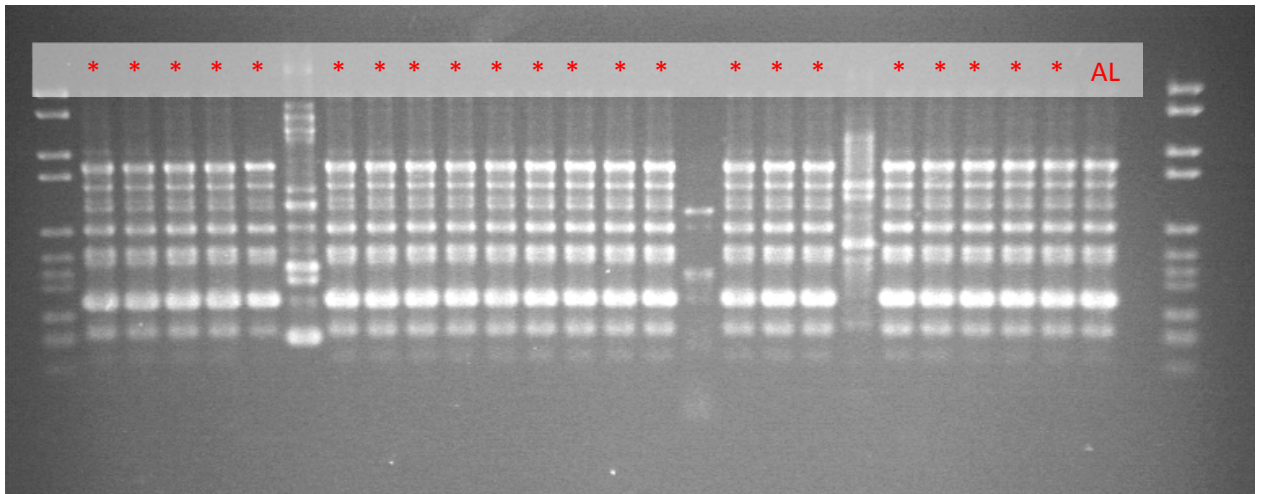
Carrier Perlite/Strain ALSPC 3051



Carrier Perlite/Strain AMBPC 1040

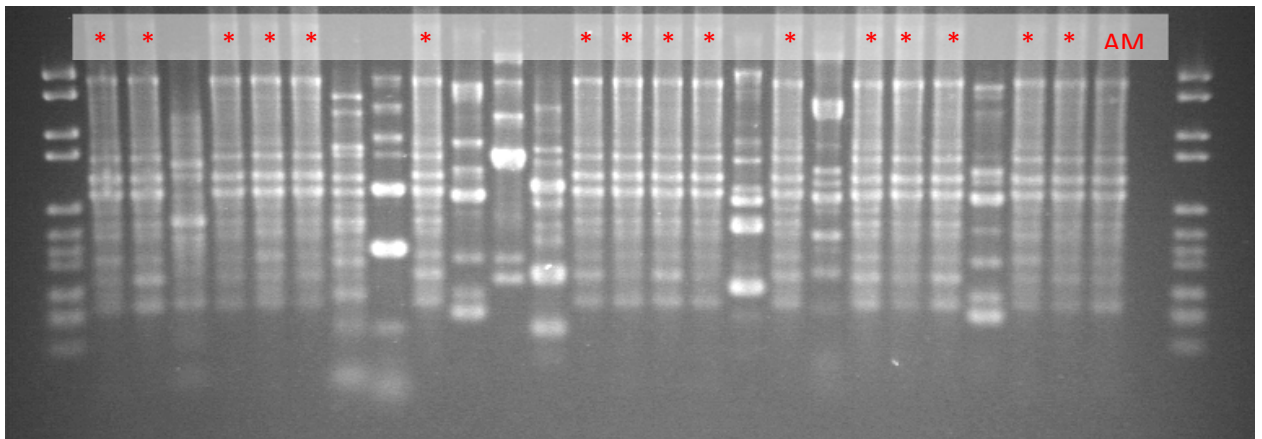
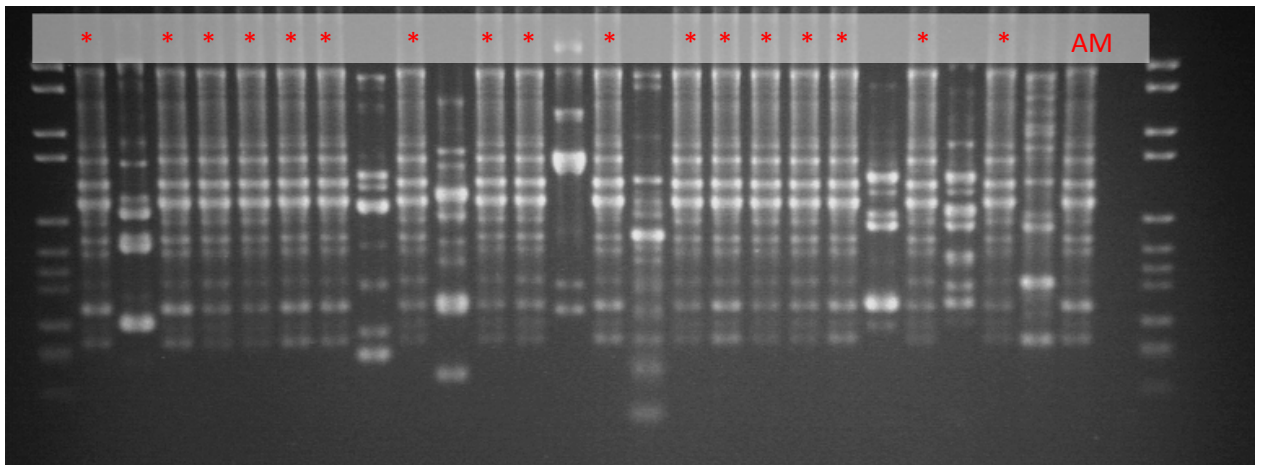
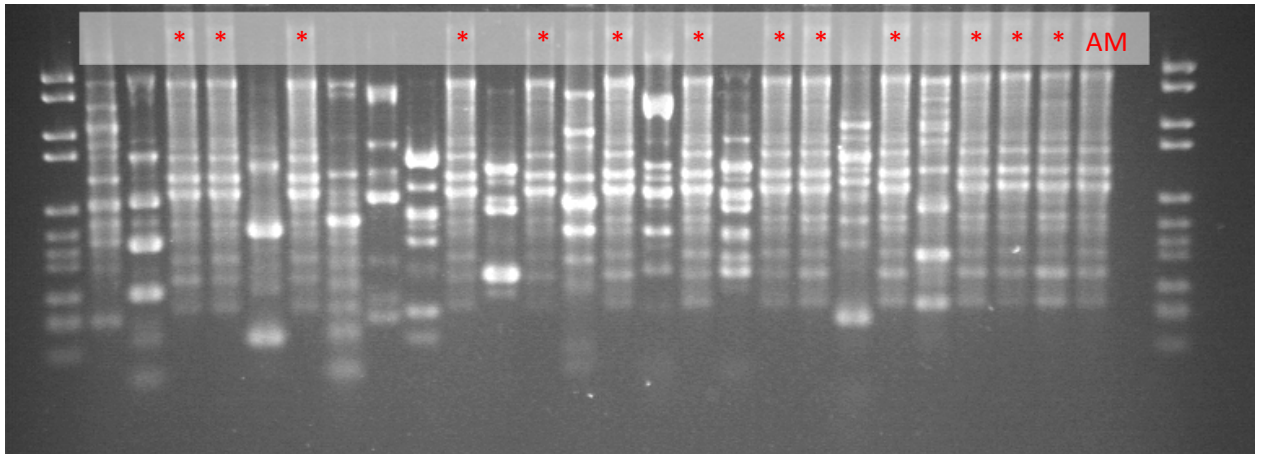


Carrier pine bark biochar/Strain ALSPC 3051

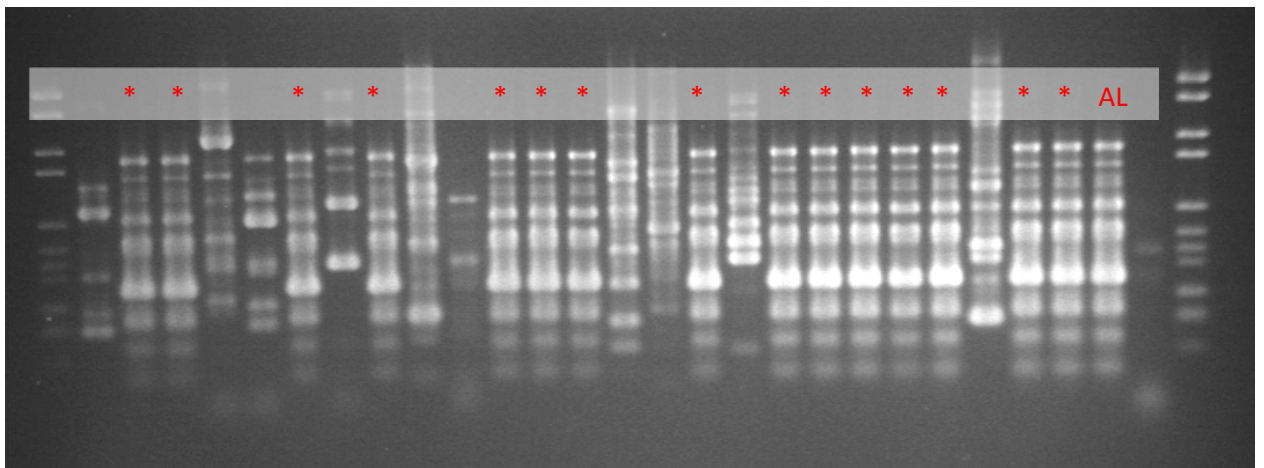
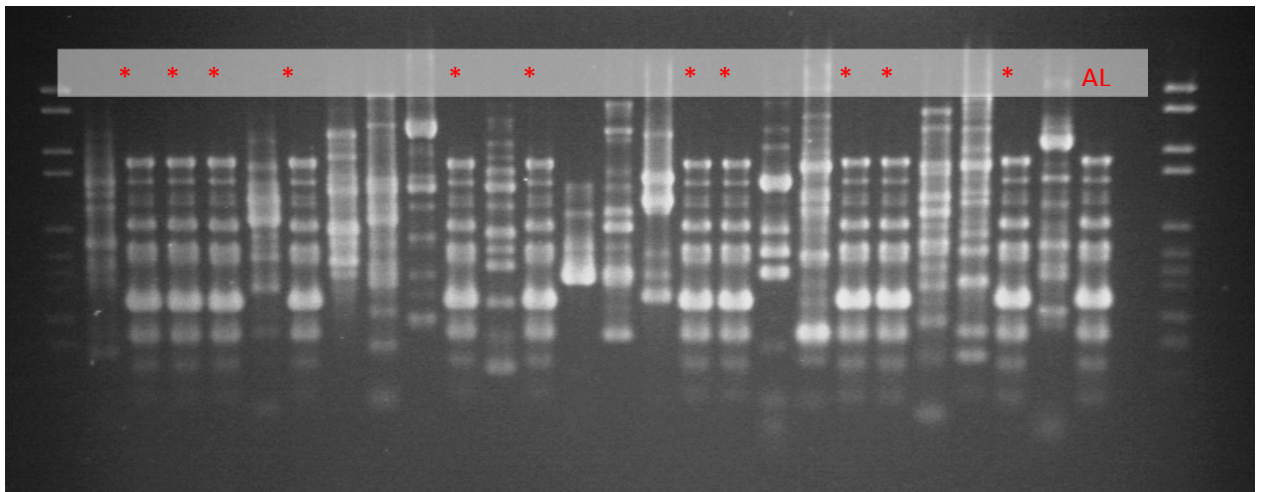
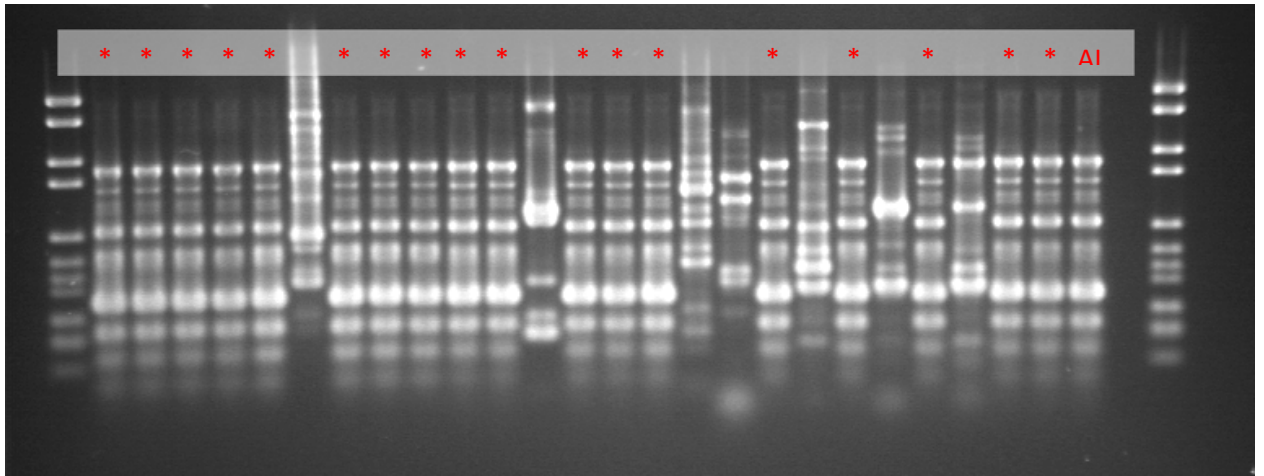




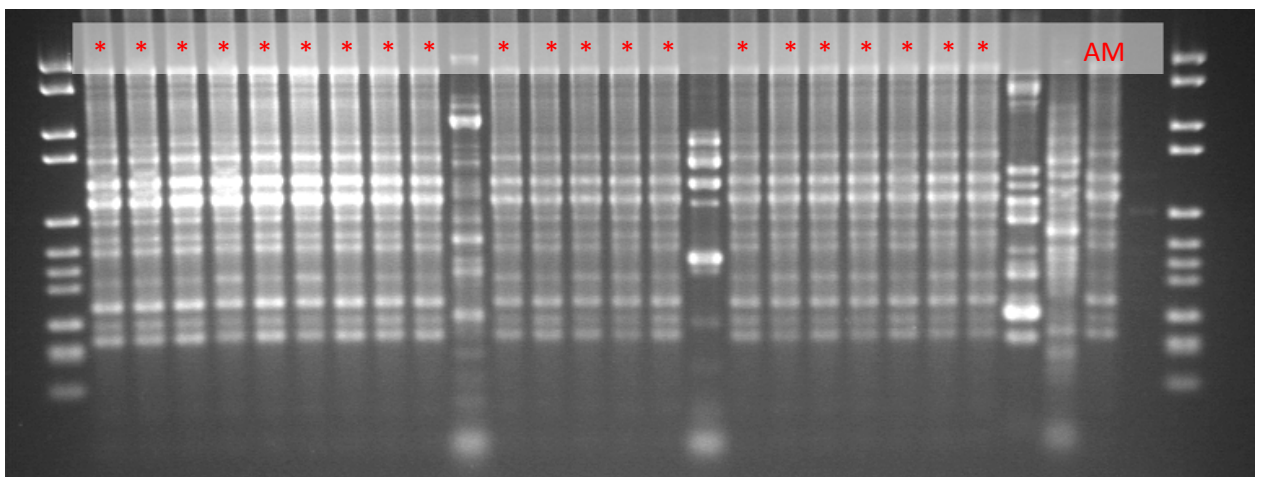
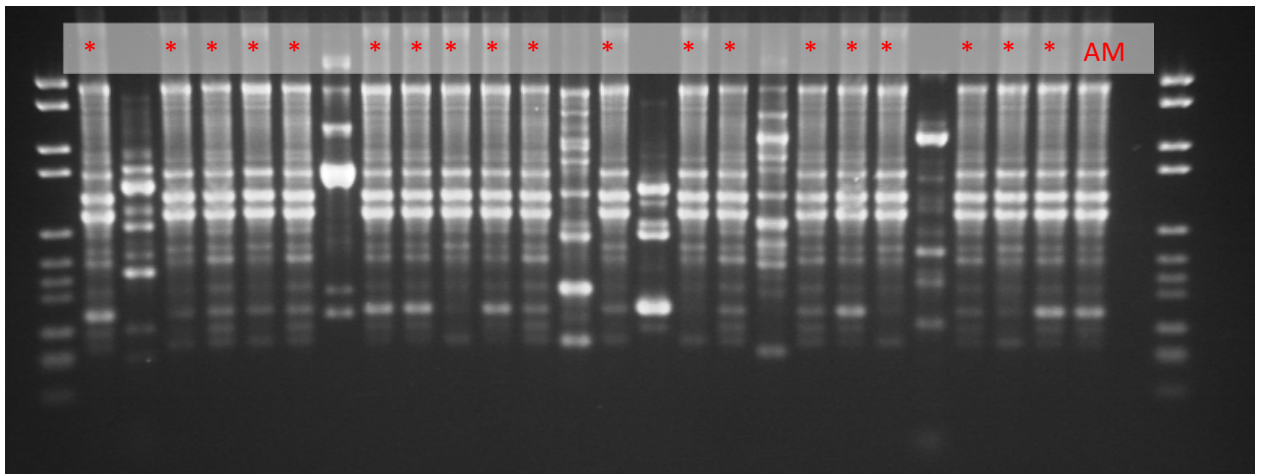
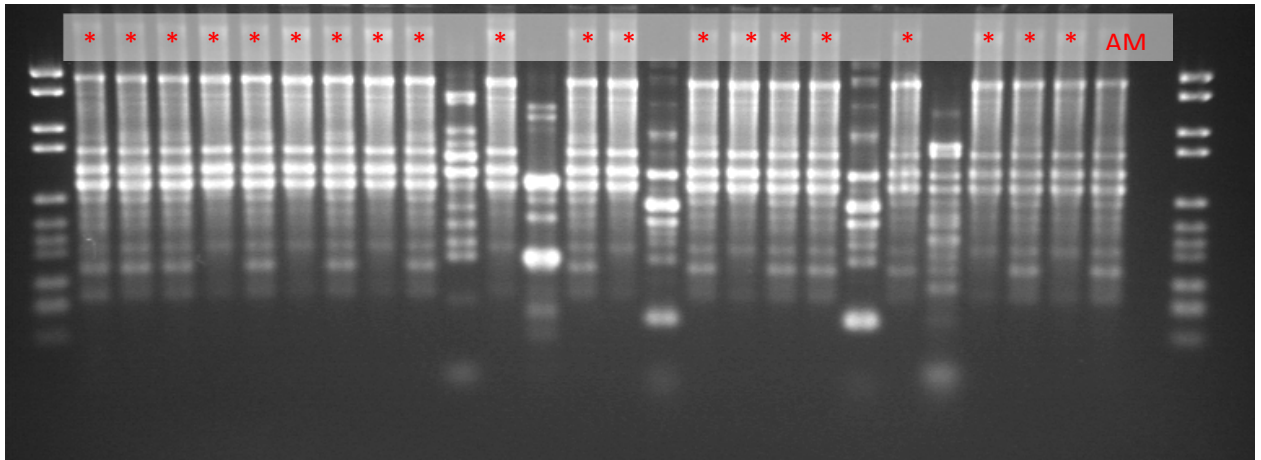
Carrier pine bark biochar/Strain AMBPC 1040



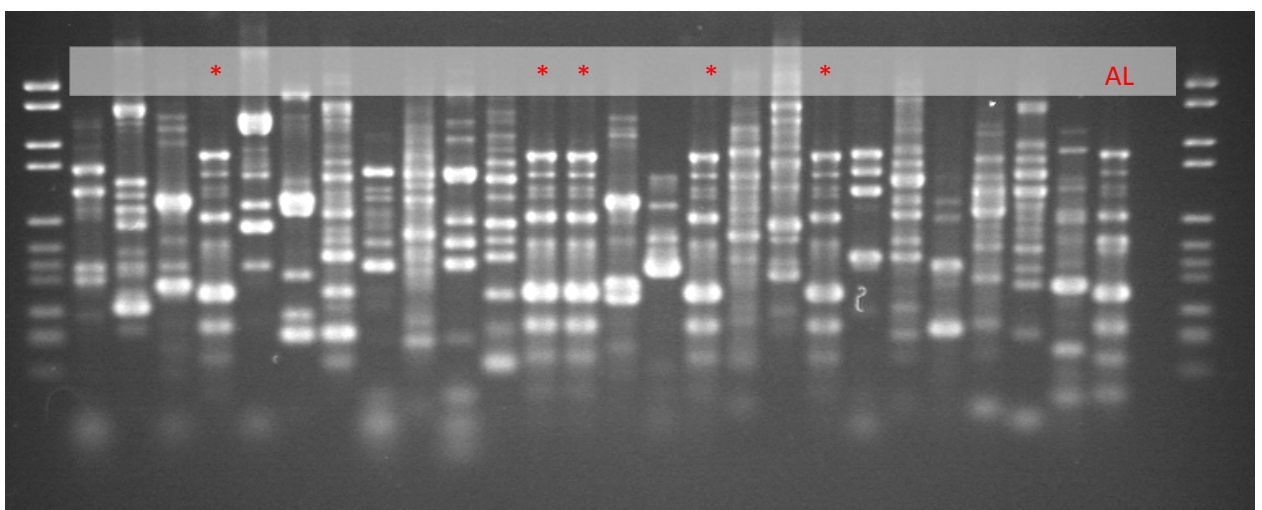
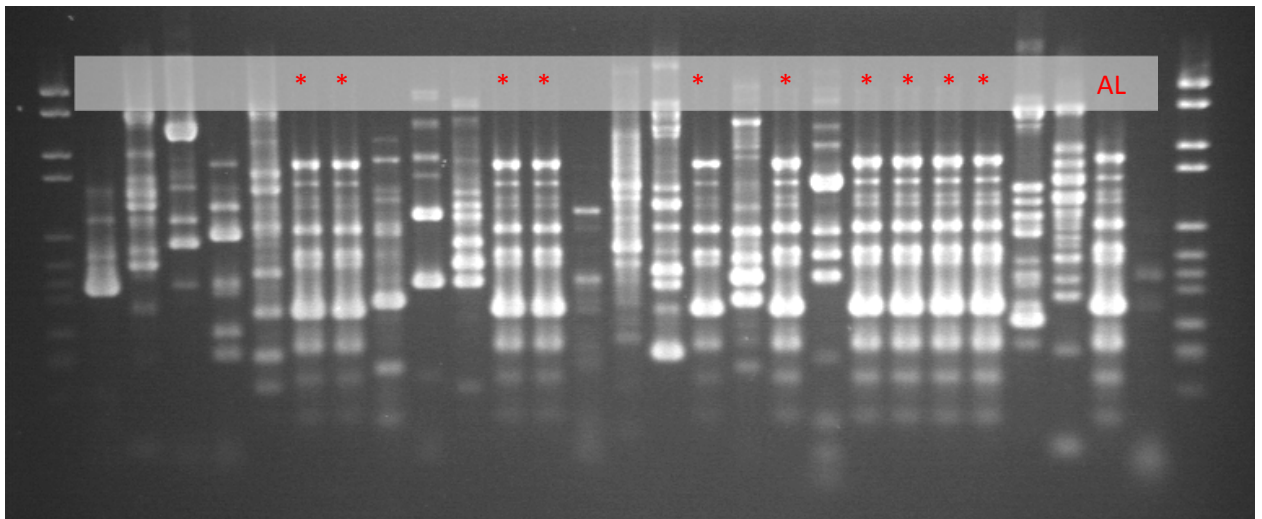
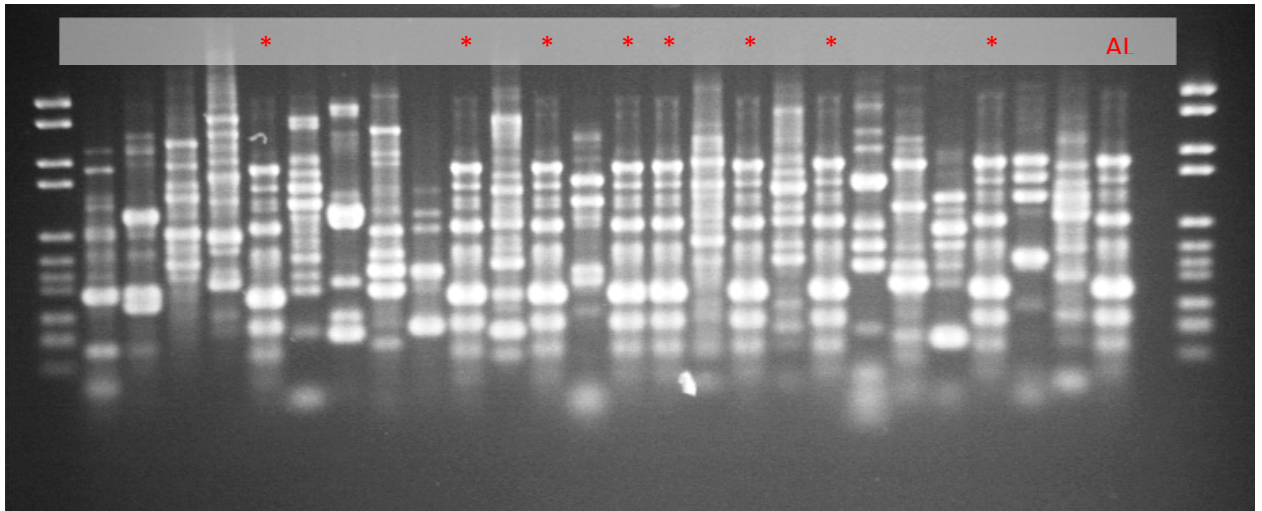
Carrier Perlite / Strain ALSPC 3051



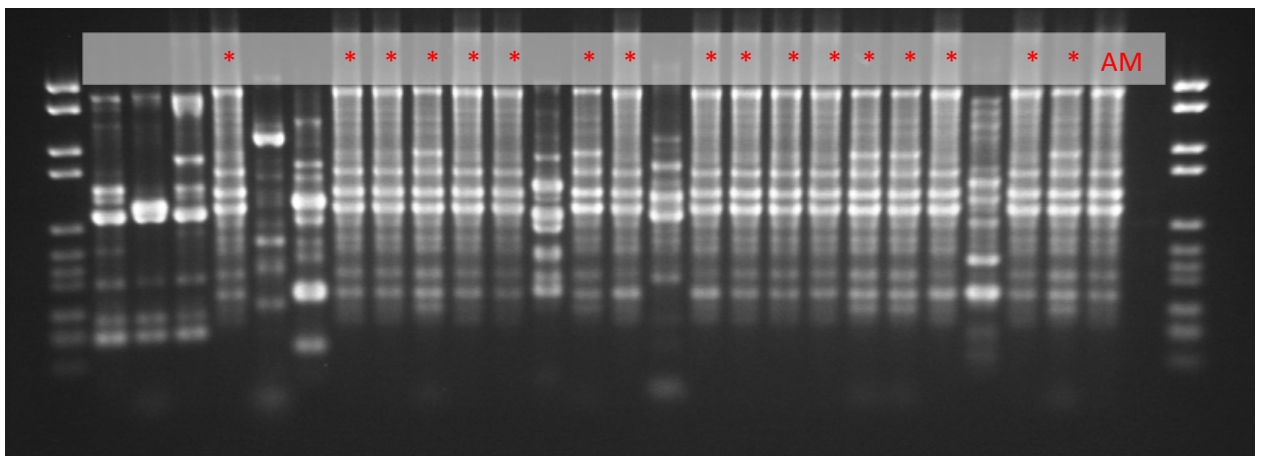
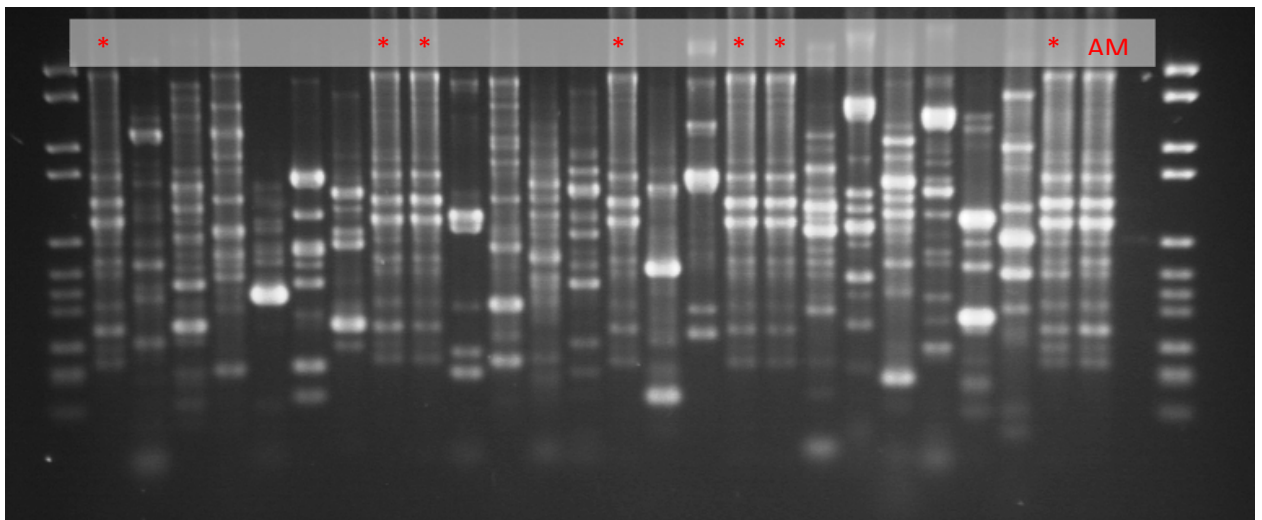
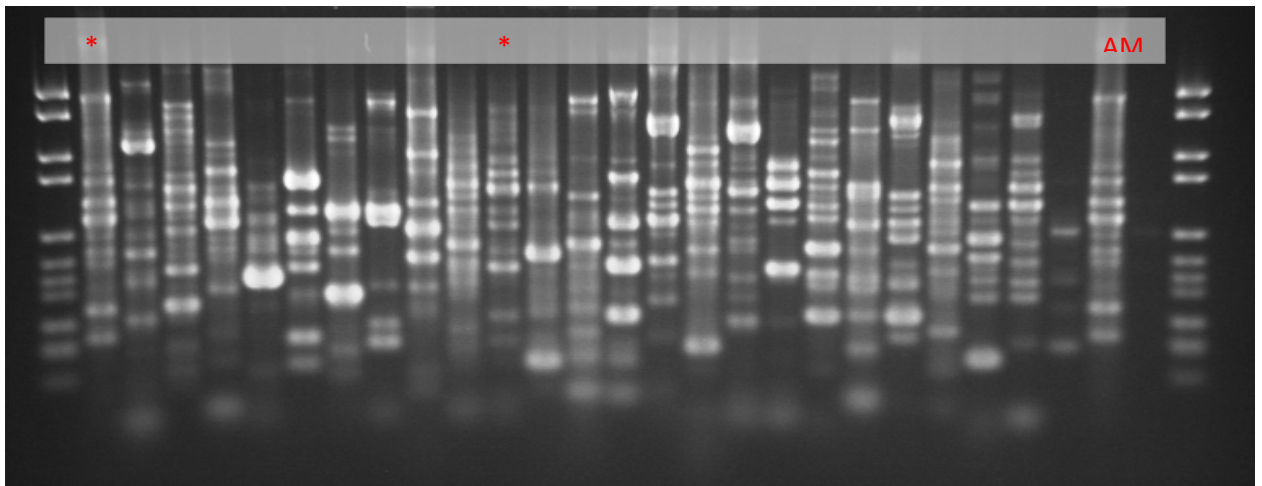
Carrier Perlite/Strain AMBPC 1040



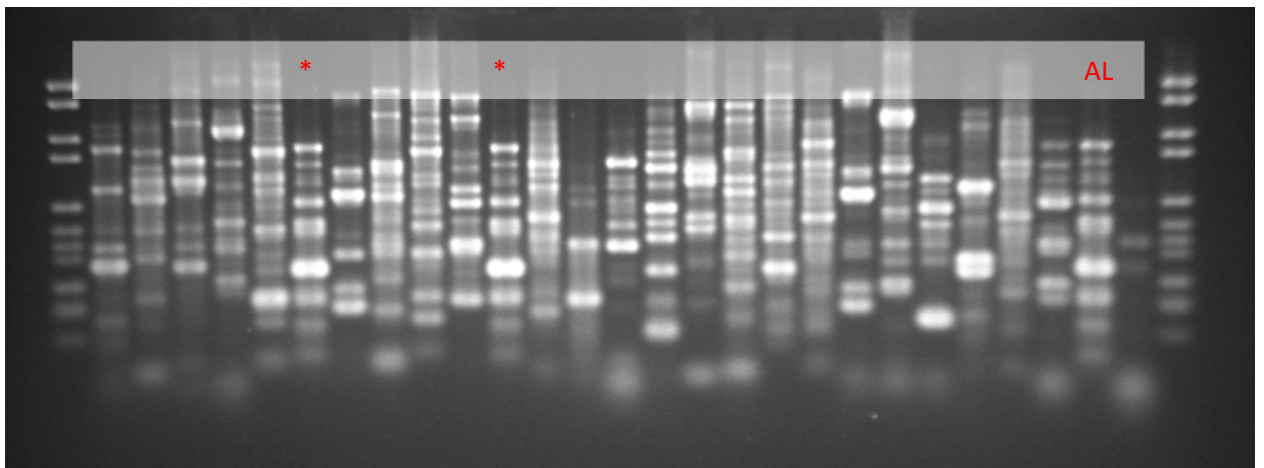
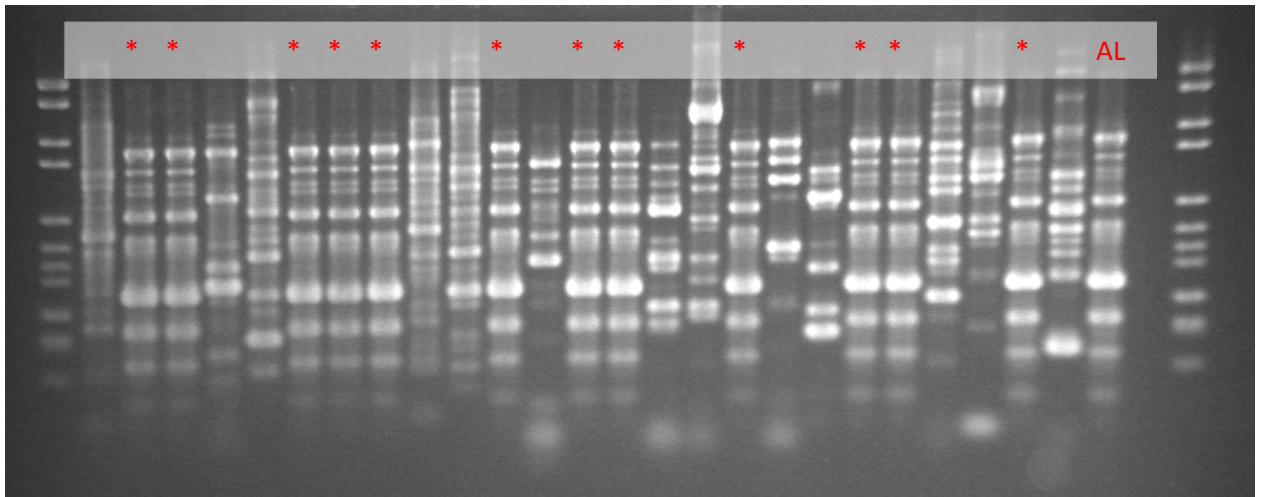
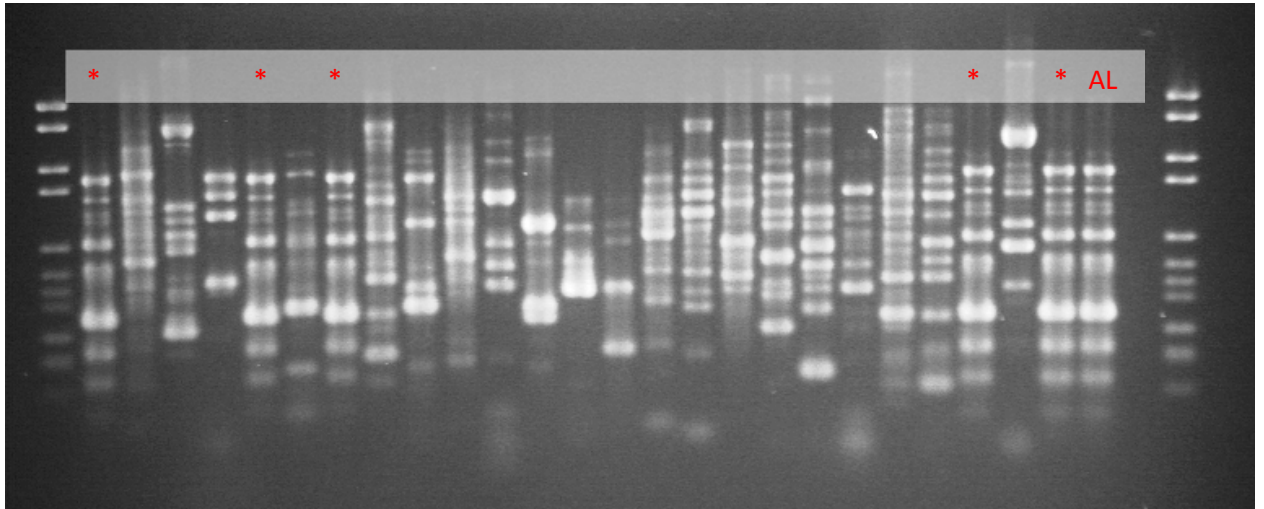
Carrier pine bark biochar/Strain ALSPC3051



Carrier pine bark biochar/Strain AMBPC1040



Carrier Perlite/Strain ALSPC3051



Carrier Perlite/Strain: AMBPC 1040

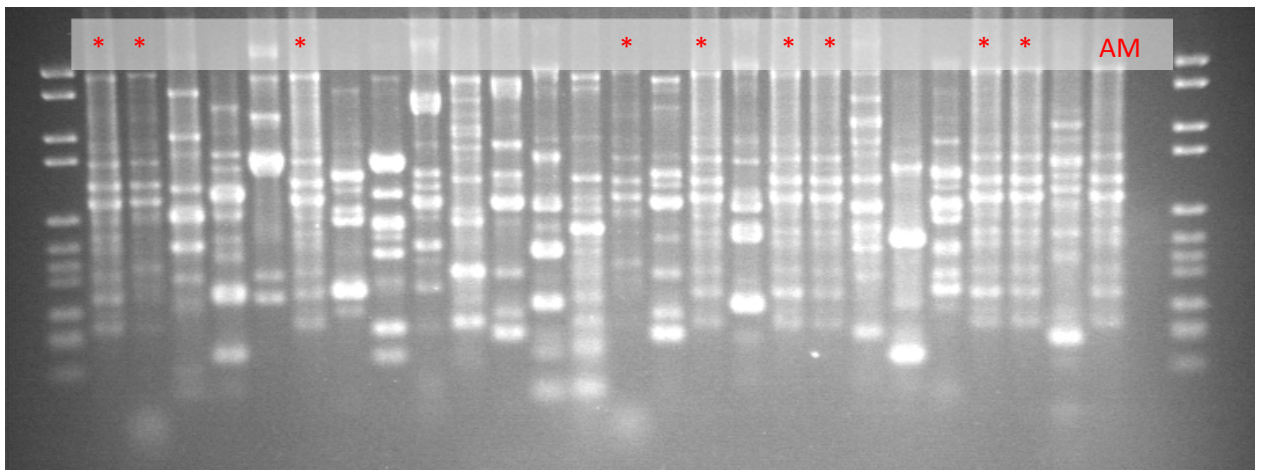
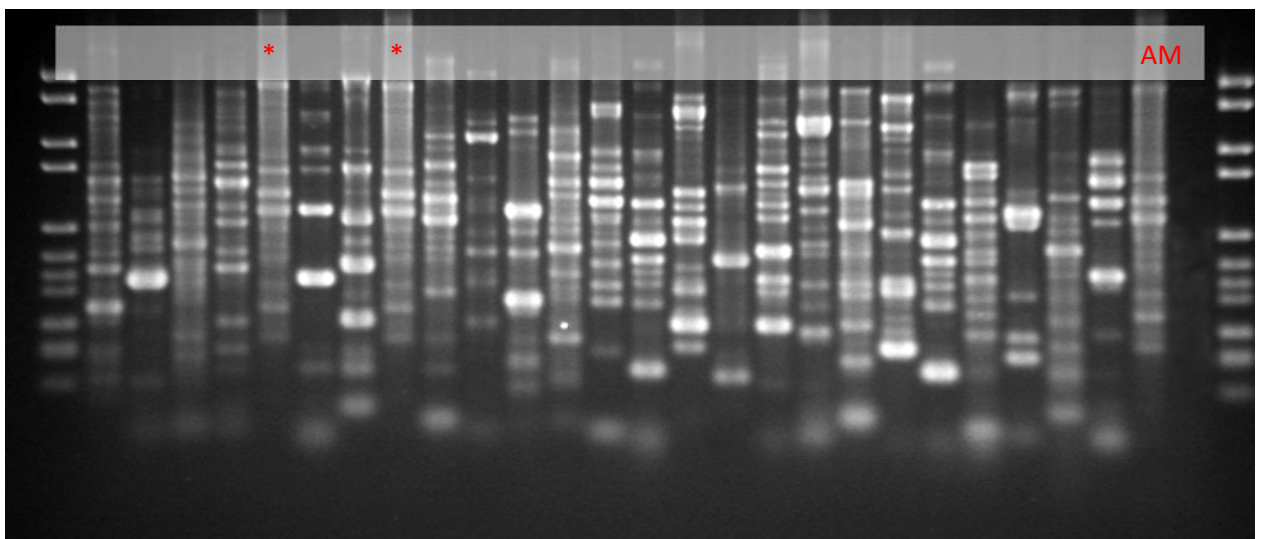
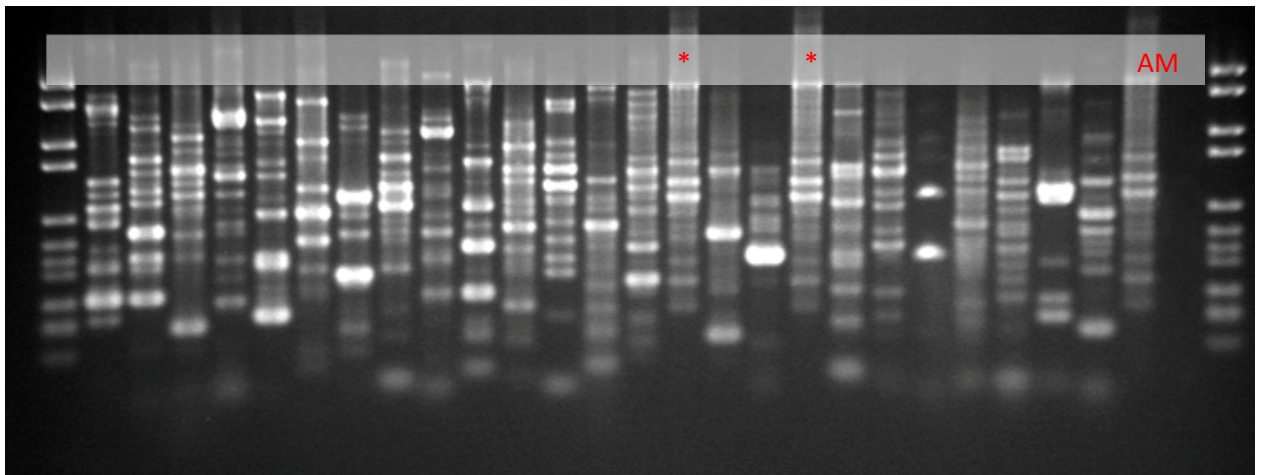


Table S.M.4. Metadata corresponding to the treatment x location mean values (standard errors in parenthesis) of the dependent variables obtained at harvesting, for the different fertilization strategies.

Dependent variable/ Fertilization strategy	Locations															
	Arroyo Loro-1		Arroyo Loro-2		Aromal		Santomé		Wilson		Hato Viejo		Manoguayabo-1		Manoguayabo-2	
<b>Pods per plant</b>																
N 0 non-inoculated control	106.3	(23.7)	71.8	(10.1)	160.7	(19.7)	86.7	(19.9)	142.0	(18.2)	51.4	(9.0)	70.8	(6.2)	89.4	(12.4)
AMBPC1010	146.6	(27.9)	92.8	(12.1)	207.8	(27.9)	82.7	(12.1)	172.8	(18.9)	55.9	(9.3)	118.5	(11.8)	118.6	(13.4)
ALSPC3051	146.4	(30.1)	89.2	(15.6)	198.1	(18.2)	83.4	(12.5)	175.9	(14.9)	51.4	(8.2)	132.2	(9.7)	115.5	(13.6)
AMBPC1040	137.5	(22.4)	95.6	(12.0)	206.8	(19.2)	80.5	(14.7)	196.8	(18.3)	43.6	(6.9)	125.0	(10.8)	117.1	(16.3)
N fertilized non-inoculated control	138.1	(32.7)	85.0	(10.6)	182.6	(21.1)	90.2	(20.1)	220.0	(36.7)	57.6	(12.1)	126.4	(21.2)	137.4	(23.2)
<b>Seeds per pod</b>																
N 0 non-inoculated control	4.60	(0.192)	4.57	(0.243)	4.65	(0.203)	5.35	(0.090)	4.99	(0.168)	4.96	(0.193)	5.04	(0.250)	5.08	(0.223)
AMBPC1010	5.07	(0.121)	4.99	(0.125)	5.37	(0.133)	5.20	(0.093)	5.32	(0.170)	5.20	(0.164)	5.47	(0.168)	5.45	(0.201)
ALSPC3051	5.35	(0.123)	5.07	(0.132)	5.43	(0.108)	5.30	(0.080)	5.47	(0.176)	5.19	(0.169)	5.42	(0.207)	5.56	(0.178)
AMBPC1040	5.32	(0.106)	5.06	(0.158)	5.33	(0.101)	5.33	(0.089)	5.59	(0.139)	5.27	(0.188)	5.47	(0.190)	5.55	(0.226)
N fertilized non-inoculated control	5.33	(0.184)	4.84	(0.243)	5.33	(0.143)	5.39	(0.064)	5.29	(0.346)	5.11	(0.246)	5.52	(0.200)	5.29	(0.194)
<b>1000-seed weight (g)</b>																
N 0 non-inoculated control	119.4	(10.63)	104.9	(5.14)	120.2	(11.4)	120.8	(11.80)	106.5	(7.28)	137.0	(5.29)	138.5	(7.54)	120.7	(9.43)
AMBPC1010	117.0	(8.45)	110.6	(5.67)	130.3	(6.46)	124.7	(7.73)	114.1	(6.03)	141.3	(3.72)	137.1	(6.40)	125.6	(5.31)
ALSPC3051	116.9	(7.57)	110.5	(5.78)	125.3	(6.64)	125.4	(8.14)	113.3	(7.27)	147.6	(3.36)	134.6	(5.86)	124.6	(5.00)
AMBPC1040	117.8	(7.74)	109.8	(5.43)	126.7	(6.88)	123.2	(9.29)	110.2	(5.54)	147.6	(3.70)	139.1	(8.02)	129.1	(7.80)
N fertilized non-inoculated control	120.1	(10.84)	102.2	(5.68)	125.6	(9.01)	122.5	(11.80)	121.4	(12.23)	137.3	(5.65)	131.7	(6.83)	129.8	(8.91)
<b>Fresh yield (kg/ha)</b>																
N 0 non-inoculated control	1917	(159)	1263	(157)	3193	(262)	2388	(316)	2871	(249)	1309	(167)	1976	(374)	1742	(78)
AMBPC1010	3027	(367)	1988	(151)	4789	(360)	2240	(228)	4148	(351)	1288	(93)	3157	(211)	2776	(205)
ALSPC3051	3219	(387)	1945	(195)	4721	(395)	2331	(195)	4228	(248)	1301	(98)	3357	(255)	2896	(235)
AMBPC1040	3098	(381)	1995	(120)	5026	(369)	2177	(250)	4618	(364)	1149	(66)	3084	(252)	2889	(310)
N fertilized non-inoculated control	3157	(461)	1799	(194)	4637	(348)	2518	(322)	4613	(515)	1522	(142)	3680	(439)	2955	(251)
<b>Harvest index</b>																
N 0 non-inoculated control	26.87	(0.809)	26.49	(4.769)	27.35	(2.220)	15.93	(1.013)	29.23	(1.389)	14.28	(1.413)	24.52	(6.550)	22.93	(2.579)
AMBPC1010	27.34	(1.577)	28.80	(2.515)	31.75	(2.007)	20.16	(1.617)	26.06	(2.081)	15.43	(0.925)	31.38	(3.295)	26.27	(2.883)
ALSPC3051	28.17	(1.807)	33.63	(2.229)	28.72	(1.283)	17.10	(1.527)	26.40	(1.590)	14.87	(0.754)	30.61	(2.443)	27.87	(2.839)
AMBPC1040	29.23	(1.402)	30.32	(2.172)	30.88	(1.317)	17.35	(1.418)	30.11	(1.523)	14.79	(1.030)	29.11	(2.972)	27.36	(2.674)
N fertilized non-inoculated control	32.76	(0.519)	27.42	(5.040)	29.46	(0.519)	21.19	(1.805)	32.78	(1.467)	15.53	(0.874)	31.73	(4.946)	25.95	(1.728)
<b>Percentage of N in seeds (Kjeldahl)</b>																
N 0 non-inoculated control	2.94	(0.075)	3.17	(0.031)	3.11	(0.117)	3.60	(0.149)	3.10	(0.115)	3.27	(0.211)	3.00	(0.181)	3.02	(0.132)
AMBPC1010	3.13	(0.104)	3.16	(0.058)	3.23	(0.088)	3.13	(0.135)	2.97	(0.118)	3.07	(0.072)	3.00	(0.103)	3.15	(0.115)
ALSPC3051	2.97	(0.110)	3.12	(0.055)	3.15	(0.099)	3.04	(0.098)	3.16	(0.123)	3.00	(0.128)	3.07	(0.069)	3.04	(0.083)
AMBPC1040	3.11	(0.090)	3.31	(0.087)	3.13	(0.112)	3.11	(0.180)	2.84	(0.102)	3.10	(0.101)	3.16	(0.111)	3.11	(0.131)
N fertilized non-inoculated control	3.28	(0.135)	3.44	(0.175)	3.44	(0.089)	3.35	(0.205)	3.41	(0.104)	2.94	(0.121)	3.07	(0.172)	3.07	(0.264)
<b>Total N content (kg N / ha) in seeds</b>																
N 0 non-inoculated control	25.3	(1.96)	18.1	(2.41)	44.5	(3.24)	38.5	(5.15)	40.4	(4.68)	19.5	(2.95)	26.6	(5.12)	23.5	(0.90)
AMBPC1010	41.4	(4.22)	28.1	(1.99)	69.6	(5.53)	32.0	(3.77)	55.6	(5.01)	17.7	(1.17)	42.2	(2.92)	39.3	(3.33)
ALSPC3051	42.8	(5.42)	27.4	(2.88)	66.4	(5.49)	31.3	(2.16)	59.8	(3.89)	18.0	(2.00)	46.8	(4.42)	39.6	(3.55)
AMBPC1040	43.5	(5.71)	29.7	(2.02)	72.1	(7.24)	30.8	(4.04)	59.3	(5.46)	16.0	(1.17)	44.2	(4.20)	40.5	(4.66)
N fertilized non-inoculated control	46.1	(6.43)	28.1	(4.08)	72.1	(6.56)	38.5	(6.10)	71.5	(9.44)	20.1	(1.89)	52.0	(8.10)	40.9	(4.71)





## Supplementary Material 2. Materials and Methods details

### 1. Field trial details

#### Purpose of the field trials and location

As the inoculation of legume crops is not a common practice in Caribbean agriculture, there are no data sets available on the effect of the inoculation technology compared to the conventional technology. Thus, the purpose of the field trial was to quantify the crop yield under inoculation technology and under conventional technology, based on a set of field trials carried out in commercial farms, presented in this work for the first time. The field trials were performed on eight farms for the common bean, located at San Juan de la Magüana, and nine farms for Pigeon pea, located at Azua (Dominican Republic) during the years 2016 to 2018. The location corresponds to the most important regions for pulse production in the Dominican Republic. The location of each field with coordinates, the edapho-climatic conditions of the experimental fields during the experimental season and the sowing dates are shown in Supplementary Material Table S1.

#### Experimental design

The experimental design at each field was randomised complete block, with three blocks for common bean and four for Pigeon pea and the treatment being the technology used. The experimental design was adapted in order to produce minimal disturbance on the farms because they were real farms rather than experimental plots. For Pigeon pea, inside each block, half of the surface was randomly assigned to CT and the other half to IT. For common bean, each block was divided into thirds, which were randomly assigned to CT, IT or C- respectively. Common bean farmers were economically compensated for the yield loss in the surface intended for C-. The minimum size of each elementary plot was 80 m<sup>2</sup>, although as the experiment was carried out in commercial fields, the surface of the elementary plot depended on the farm, ranging from the mentioned 80 m<sup>2</sup> up to 150 m<sup>2</sup>.

#### Plant germplasm used and seeding process

For common bean, the cultivar was “José Veta”, with a seeding rate of 60 kg ha<sup>-1</sup> in lines 0.5 m apart, for a distance between seeds of 0.2 m and a final density of ten plants m<sup>-2</sup>. For Pigeon pea, the cultivar was “Arroyoloro”, with a seeding rate of 7 kg ha<sup>-1</sup> at 1 m x 1 m, for a final density of 1 plant m<sup>-2</sup>. Inoculation was carried out prior to sowing. The appropriate seeds quantity for the farm extension was mixed with a 2% (w:w) of the powdery component and a 1% (vol:w) of the binder component. After coating, seeds were dried in the shade and then sown by the conventional procedure, by machine in the case of common bean and by hand for Pigeon pea.

#### Sampling process

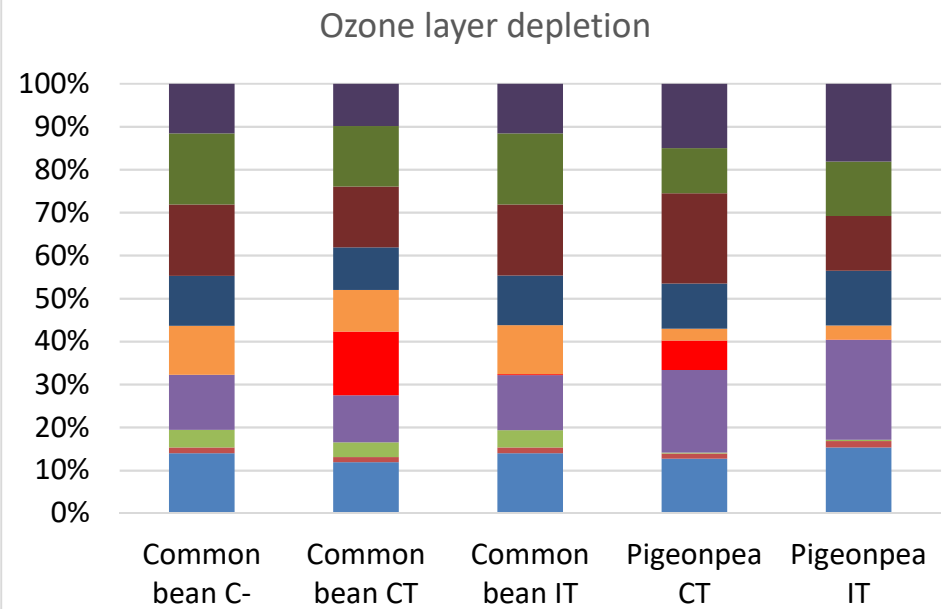
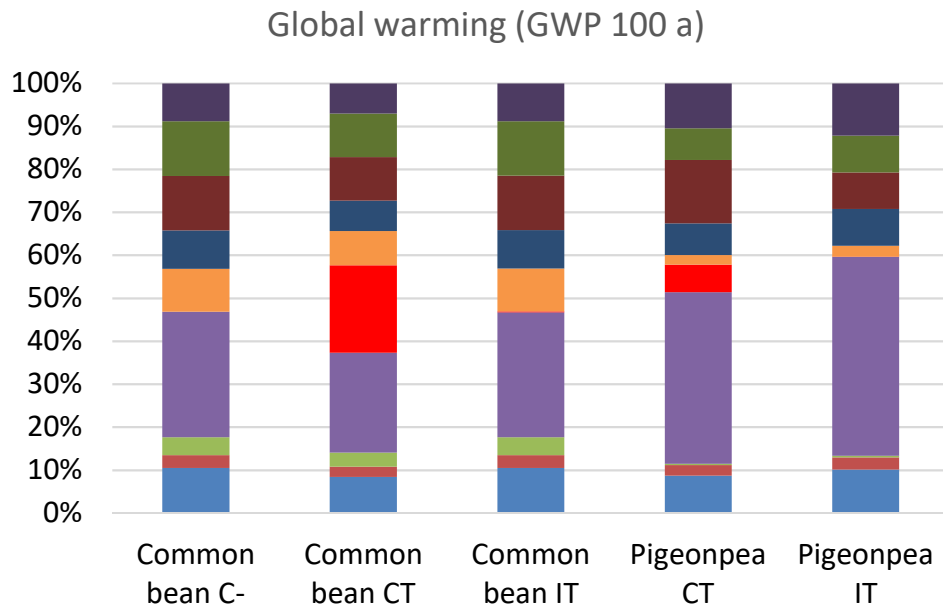
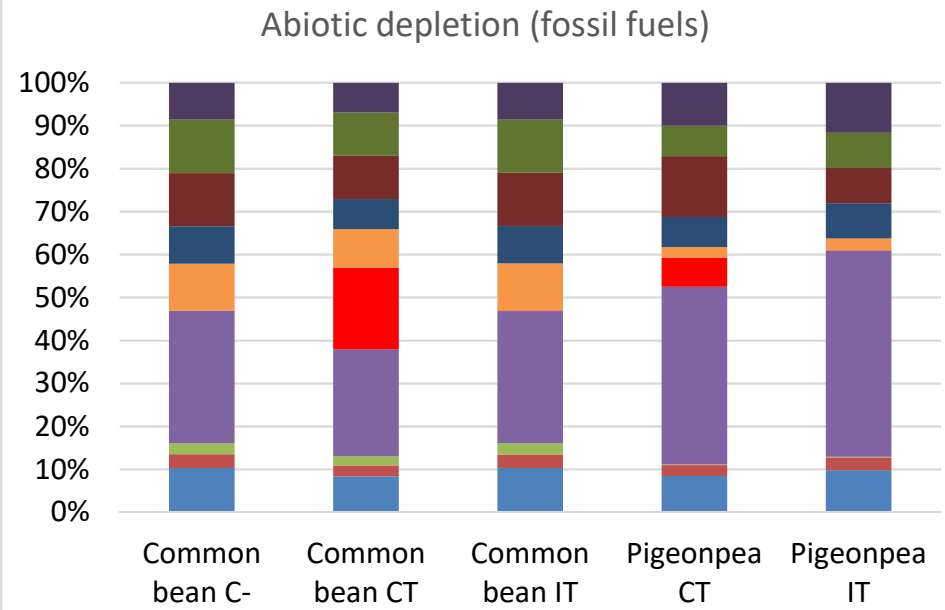
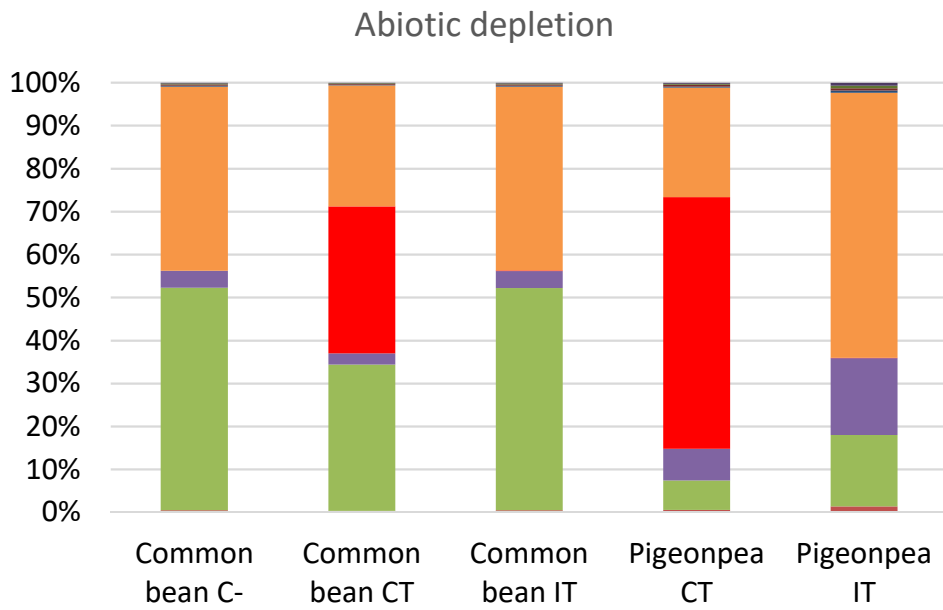
Sampling at harvesting was carried out in the central part of each experimental plot, in order to prevent the possible effects of the rhizobia spreading in the soil water. For common bean, three subsamples were sampled per experimental unit, each consisting of two adjacent rows, 0.5 m in length, which, given that rows were 0.5 m apart, covers a total surface of 0.5 m<sup>2</sup>.

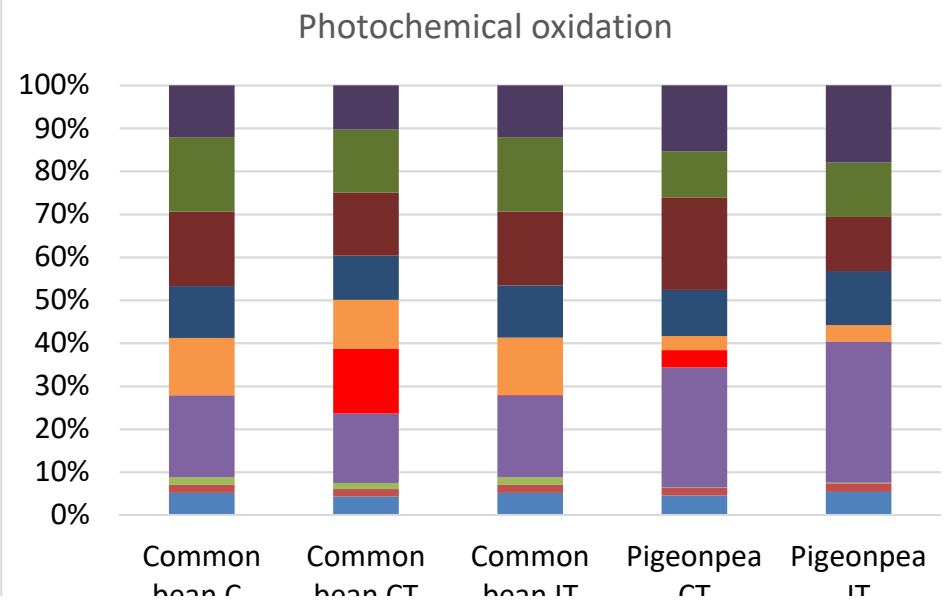
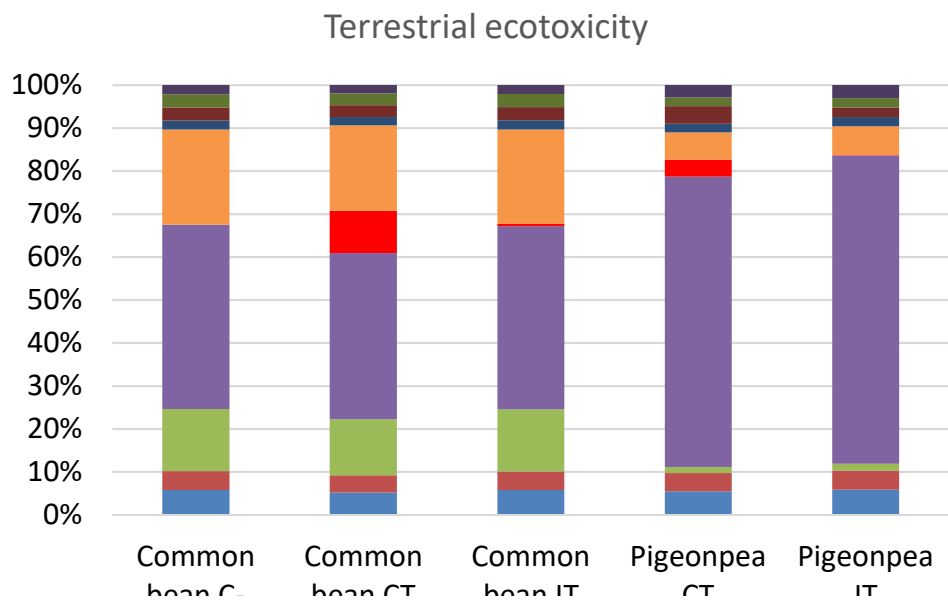
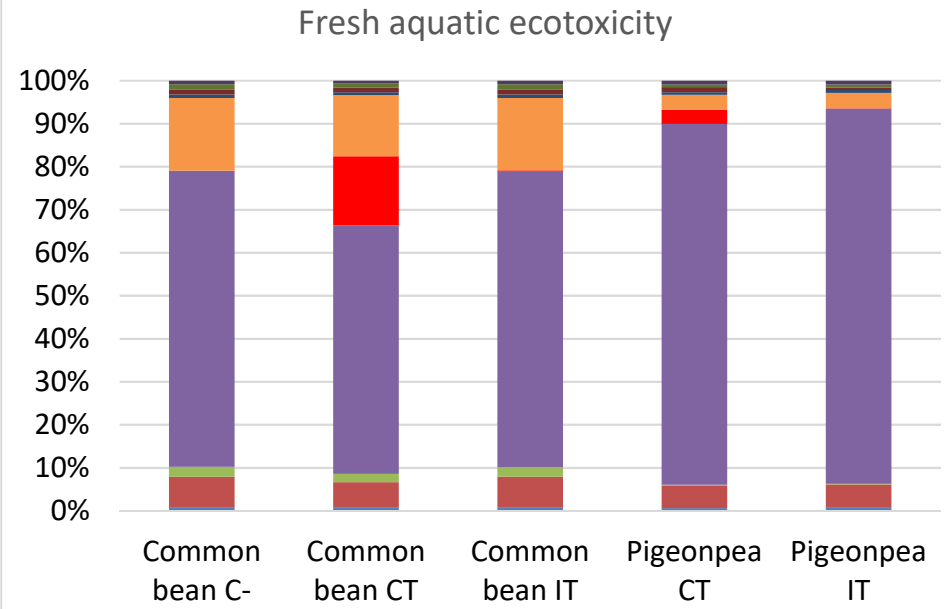
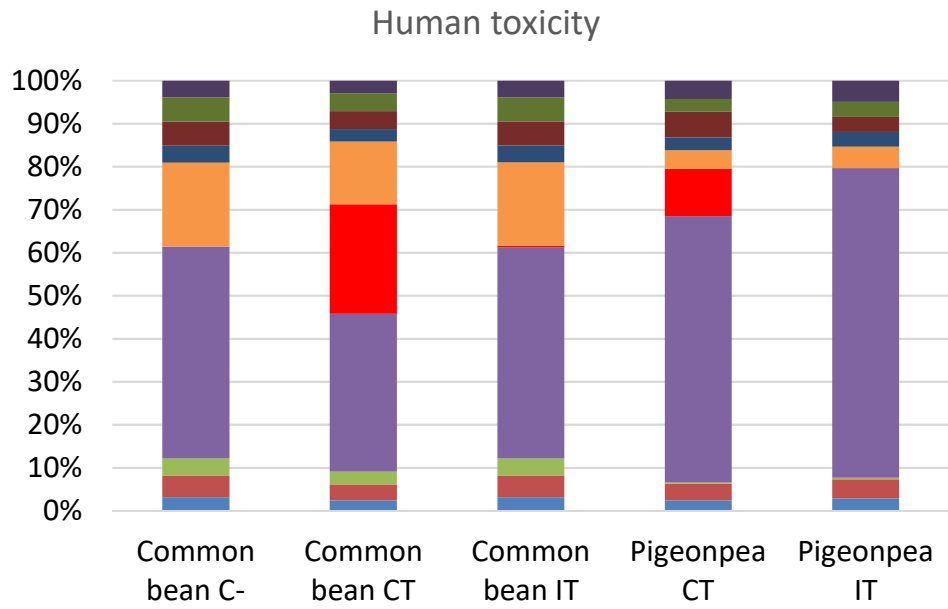
The plants in the two rows were counted and fully harvested, and the grain yield and the average number of pods per plant were assessed. The average number of seeds per pod was assessed from 20 pods. The dry biomass of the grains and the rest of the vegetative biomass were measured separately after desiccation at 60 °C until constant weight. The dry weight of 100 seeds and the Harvest index were then calculated from dry biomass values. The yield was expressed as kg ha<sup>-1</sup> of commercial grains containing 89% dry matter.

For Pigeon pea, the four central plants of each experimental unit were harvested once a month until the end of the crop cycle, and the cumulative grain yield and the yield components (pods per plant, seeds per pod and 100-seed weight) were assessed in a similar manner to common bean. Dry matter was also obtained, as for common bean. The yield, expressed as kg ha<sup>-1</sup>, was referred to as grain dry matter because it is commonly collected and consumed as “green” or fresh grains. Due to the great variation in dry matter content of “green grains”, the data attributed to commercial grains are very imprecise, and for this reason it is necessary to standardize the data, expressing them referred to dry matter.

## **2. System boundaries details for the Life Cycle Assessment of the crops production process**

Regarding the LCA-CP, the entire systems of common bean and Pigeon pea productions were covered by the system boundaries. Thus, fieldwork and agricultural activities resulting in pollutant emissions to the soil, water and air have been considered. The following steps were taken in the agricultural activities: soil occupation, preparation of soil consisting on tillage with tractor, irrigation, fertilisation, seeds inoculation, sowing, phytosanitary control and harvesting. Regarding the soil occupation, only the use by the crop of water rain and the occupation by an annual crop have been considered, whereas the transformation to permanent crop has been considered outside the system boundaries. Irrigation needs were calculated with Cropwat v.8.0 (FAO, 2018) considering the characteristics of the local irrigation system. Regarding the application of fertilisers, phosphorous (P) and potassium (K) fertilisation was the same for all the treatments in a given crop, whereas N fertilisation was fully eliminated in the plots corresponding to the IT, and, in the case of common bean, it was also eliminated in the C- control (Table 3). For fertilisers and phytosanitary products, the processes incorporated the extraction of raw materials, manufacturing process, electricity consumption, fuel production and transportation to the farm gate. All the assumptions for transportation are in Supplementary Material Table S.M.3. However, the application of the fertilisers was by hand, and the application of the phytosanitary products and foliar fertilisers was done with a manually operated backpack sprayer, and thus there were no impacts associated with the application process. Seeding was by hand for Pigeon pea, and a seeding machine was used for common bean, so that, in the first case, there were no impacts due to the seeding process, and in the second case, the inventory considered the diesel fuel consumption and the proportional amount of machinery and of the shed, as well as the amount of emissions to the air from combustion and the emission to the soil from tyre abrasion. Weed control was done by hand with a hoe, and thus no impacts were burdened to weeding.





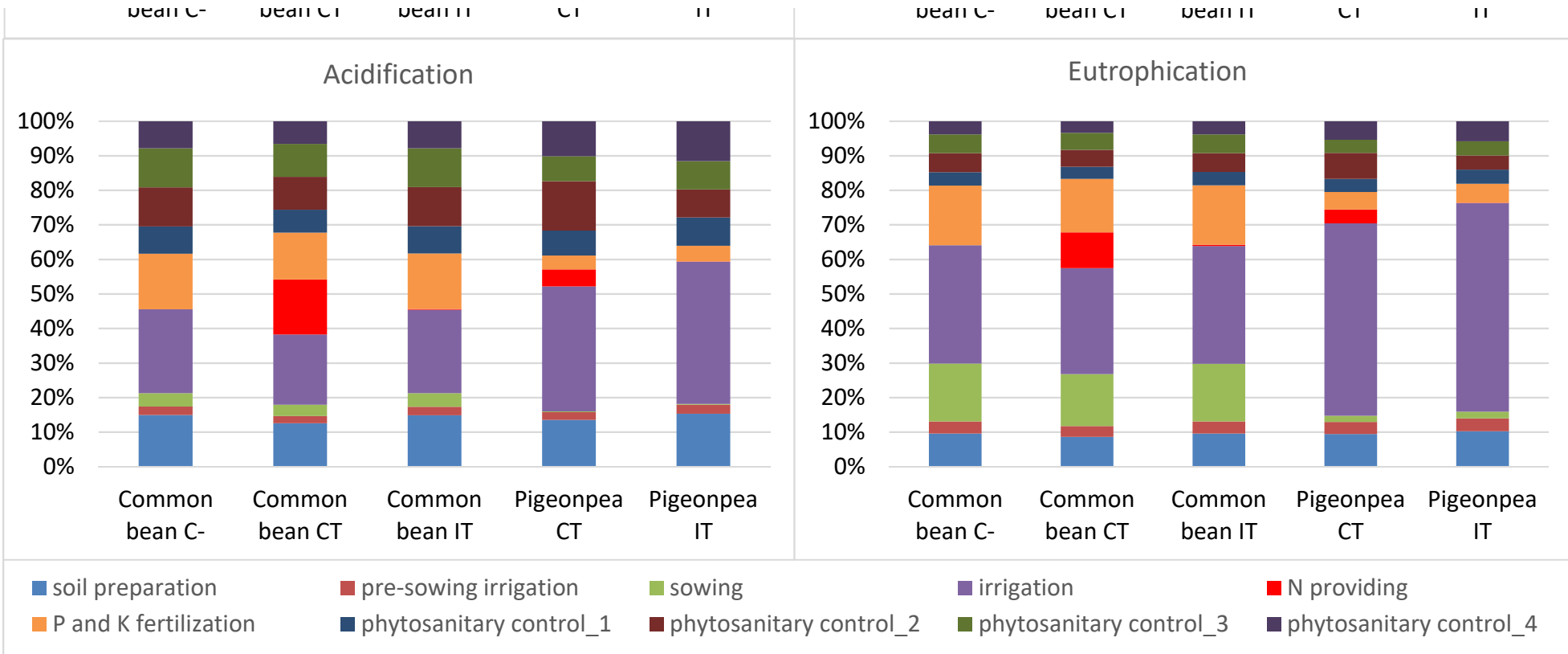


Figure S1. Environmental analysis of common bean and pigeonpea production under two different technologies, conventional (CT) and inoculation (IT); plus, in the case of common bean, a negative control (C-) in relation to ten selected CML-IA categories. LCIA is allocated to 1 ha.

Table S1. Transport distance assumptions for the raw materials for manufacturing the rhizobial inoculant (LCA-RI).

Ingredients	Origin	Transportation route
<b>Bacterial broth</b>		
Sugarcane molasses	Residue from local industry	150 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
Beer vinasses	Residue from local industry	45 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
Inoculum	From the biofertilizers plant	0 km
Water	Not applicable	Local from nature
<b>Bacterial broth with cells protectors</b>		
Polysaccharide (bacterial cells protector 1)	USA industry	600 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 25 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
Disaccharide (bacterial cells protector 2)	USA industry	600 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 25 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
<b>Powdery component of the inoculant</b>		
Sieved expanded perlite	USA industry	350 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 25 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
<b>Binder component of the inoculant</b>		
Refined gum Arabic	USA industry	600 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight to Dominican Republic + 25 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
Raw gum Arabic	Recollection from nature in Senegal	300 km by road in Senegal to the port + 7600 km by sea freight to the USA + 700 km by road in the USA to the factory
<b>Packaged powdery component</b>		
Package for the powdery component of the inoculant	USA industry	350 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 25 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
<b>Packaged binder component</b>		
Package for the binder component	Local industry	120 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant
<b>Packaged finished inoculant</b>		
Package for the finished inoculant	Local industry	150 km by road in Dominican Republic to the biofertilizers plant

Supplementary material Araujo et al. (2020b)

Table S2. General characteristics and edapho-climatic conditions of soils from the sites in which the field experiment was established.

A. General characteristics						B. Edaphic characteristics													
Location	Crop	Farm No.	Sowing date	Latitude	Longitude	Texture (%)			pH 1:2 (soil:water)	Electric conductivity (dS/m)	Organic matter (%)	Total nitrogen* (%)	CEC (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Lime (%)	Posphorus (Olsen) (mg kg <sup>-1</sup> )	Potassium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Calcium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Magnesium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )	Sodium (cmol(+) kg <sup>-1</sup> )
						Sand	Silt	Clay											
La Chanola	C. bean	CB1	06/nov./2016	18°46'15"	71°08'32"	32.0	33.0	35.0	7.4	1.51	2.28	0.25	16.7	negligible	36.0	0.21	19.0	1.37	0.36
Pedro Corto	C. bean	CB2	07/nov./2016	18°50'22"	71°22'52"	45.0	26.0	29.0	7.4	1.32	2.28	0.27	22.2	negligible	35.0	0.24	25.0	1.86	0.48
Santome	C. bean	CB3	08/nov./2016	18°49'11"	71°17'10"	47.0	28.0	25.0	7.4	2.09	1.14	1.14	20.0	negligible	28.0	0.19	18.0	2.43	0.42
Aromal	C. bean	CB4	05/nov./2017	18°46'41"	71°12'37"	23.0	34.0	42.0	7.5	1.18	2.69	0.32	16.7	negligible	36.0	0.26	22.4	0.91	0.36
Las Charcas	C. bean	CB5	06/nov./2017	18°50'11"	71°14'26"	41.0	30.0	29.0	7.7	1.13	1.03	0.11	15.0	negligible	34.0	0.30	20.0	0.80	0.31
Los Mates	C. bean	CB6	08/nov./2017	18°47'06"	71°10'02"	31.0	32.0	37.0	7.5	2.25	2.07	0.25	15.0	negligible	39.0	0.20	18.0	1.03	0.34
Ent. Las Charcas	C. bean	CB7	09/nov./2017	18°49'53"	71°14'32"	19.0	38.0	43.0	7.7	1.20	2.28	0.25	16.1	negligible	42.0	0.16	22.0	0.69	0.29
Santomé 2	C. bean	CB8	10/nov./2017	18°49'08"	71°17'00"	21.0	34.0	45.0	7.4	2.84	2.38	0.27	20.6	1.6	42.0	0.14	28.0	0.57	0.36
Carlos Montilla	Pigeonpea	P1	07/mar./2017	18°25'34"	70°45'25"	12.0	36.0	52.0	7.3	5.69	4.6	0.50	14.1	negligible	40.0	0.21	9.72	1.34	0.61
Maximo Alcantara	Pigeonpea	P2	16/mar./2017	18°25'18"	70°45'38"	12.0	26.0	62.0	7.1	3.38	5.0	0.54	12.0	negligible	30.0	0.22	8.21	1.11	0.74
Manuel Matos	Pigeonpea	P3	26/mar./2017	18°25'20"	70°46'23"	20.0	36.0	44.0	7.1	2.10	4.6	0.47	14.4	negligible	28.0	0.16	10.0	1.13	1.78
Richard Ramos	Pigeonpea	P4	01/apr./2017	18°25'34"	70°47'58"	26.0	38.0	36.0	7.5	1.68	3.3	0.39	15.8	negligible	33.0	0.20	12.3	0.98	0.92
Joaquin Herrera	Pigeonpea	P5	05/nov./2017	18°24'19"	70°48'48"	20.0	32.0	48.0	5.7	2.65	5.5	0.55	15.1	negligible	26.0	0.26	11.8	0.97	0.58
Elias Lemo	Pigeonpea	P6	07/nov./2017	18°25'50"	70°48'30"	40.0	24.0	36.0	8.0	5.70	3.0	0.35	11.7	negligible	29.0	0.22	7.57	1.23	0.70
Luis Adames	Pigeonpea	P7	10/nov./2017	18°26'41"	70°50'02"	30.0	32.0	38.0	7.7	3.21	4.2	0.48	14.3	negligible	29.0	0.20	10.5	1.16	0.47
Juan Cedano	Pigeonpea	P8	12/nov./2017	18°27'06"	70°47'36"	54.0	16.0	30.0	7.1	2.37	4.5	0.47	14.4	negligible	31.0	0.27	11.5	0.84	0.45
Epifanio Montero	Pigeonpea	P9	23/dec./2017	18°28'09"	70°45'18"	58.0	16.0	26.0	6.3	3.39	4.2	0.46	14.7	negligible	26.0	0.20	10.3	1.37	0.54

B. Climatic characteristics of the growing season

Month	Temperatures (°C)					R (mm)	PET (mm)
	Hmax	Havg	Tavg	Lavg	Lmin		
November 2016	31.8	30.1	24.9	19.7	14.7	63.9	5.1
December 2016	32.0	30.5	23.6	16.6	13.2	7.4	5.1
January 2017	32.7	29.5	21.9	14.2	10.7	2.2	5.0
March 2017	33.0	31.6	24.8	17.9	13.7	45.6	6.9
April 2017	34.2	30.8	24.9	19.0	15.4	154.1	5.9
May 2017	34.1	31.0	25.6	20.1	16.7	31.3	5.9
June 2017	34.9	33.0	26.7	20.4	17.9	40.1	7.7
July 2017	34.5	32.5	26.0	19.5	16.2	49.8	7.0
August 2017	35.3	33.5	27.0	20.5	18.7	168.1	5.9
September 2017	35.2	31.9	26.4	20.9	17.8	174.5	5.5
October 2017	33.9	32.4	26.0	19.6	16.3	74.8	6.0
November 2017	32.1	29.6	24.4	19.3	14.4	45.5	4.1
December 2017	32.3	30.5	23.6	16.8	12.8	1.8	4.7
January 2018	32.2	29.8	23.7	17.5	15.1	28.7	4.7
February 2018	32.7	31.1	22.5	14.0	11.7	14.9	6.1
March 2018	34.2	32.0	24.5	16.9	14.3	0.0	7.2
April 2018	32.9	32.0	25.7	19.4	15.5	55.2	6.5

\*Total N: organic + nitric + ammonia nitrogen.

Hmax: maximum high temperature (°C); Havg: average high temperature (°C); Tavg: average mean temperature (°C); Lavg: average low temperature (°C); Lmin: minimum low temperature (°C); R: monthly precipitation (mm); PET: potential evapotranspiration (mm). The climatic data were recorded at the San Juan de la Maguana provincial meteo station.



Table S3. Transport distance assumptions for the agricultural inputs for crop production (LCA-CP).

Ingredients	Origin	Transportation route
<b>N fertilizers</b>		
Ammonium sulphate 21 % N		
Foliar fertilizer urea 46 % N		
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fertilizers</b>		
Single superphosphate 21% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	USA industry	600 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 175 km by road in Dominican Republic to the farm
Liquid fertilizer 50% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		
<b>K<sub>2</sub>O fertilizers</b>		
Potassium chloride 60% K <sub>2</sub> O		
Liquid fertilizer 60% K <sub>2</sub> O		
Finished inoculant	Local biofertilizers plant	170 km by road from San Cristobal industrial area to pulses production area
Seeds for sowing	Locally produced	20km
<b>Products for phytosanitary treatments</b>		
Insecticide Imidacloprid	USA industry	650 km by road in the USA to the port + 1500 km by sea freight + 190 km by road in Dominican Republic to the farm
Insecticide Cypermethrin		
Fungicide Cyproconazole		
Insecticide Thiamethoxam		

Table S4. Relative contribution of the components included in the packaged powdery component to the total environmental impact. The LCIA was estimated as Global Warming Potential (GWP) according to the methodology IPCC 2013 and also as cumulative energy demand based on Lower Heating Values (v 1.05) (PRé Sustainability, 2018).

Impact assessment method	Unit	Components of the packaged powdery component (100 %)					Empty package
IPCC 2013 GWP 20y		Powdery component					Empty package
	kg CO <sub>2</sub> eq	84.7 %					15.3%
		Expanded perlite	Bacterial broth	Cells protector 1 (polysaccharide)	Cells protector 2 (disaccharide)	Other processes (transport♥)	
	kg CO <sub>2</sub> eq	67.0%	10.6%	1.2%	1.1%	4.8%	
Energy demand		Powdery component					Empty package
	MJ	71 %					29%
		Expanded perlite	Bacterial broth	Cells protector 1 (polysaccharide)	Cells protector 2 (disaccharide)	Other processes (transport♥)	
	MJ	53.8%	9.5%	1.1%	1.0%	5.6%	

♥Corresponds to transport of expanded perlite and the bacterial cells protectors (the polysaccharide and the disaccharide), from the manufacturing plant in the USA to the biofertilizers plant in Dominican Republic

Table S5. Relative contribution of the components included in the packaged binder to the total environmental impact. The LCIA was estimated as Global Warming Potential (GWP) according to the methodology IPCC 2013 and also as cumulative energy demand based on Lower Heating Values ( $\nu$  1.05) (PRé Sustainability, 2018).

Impact assessment method	Unit	Components of the packaged binder component (100%)	
		Binder component	Empty package for binder
IPCC 2013 GWP 20y	kg CO <sub>2</sub> eq	83.5%	16.5%
		Refined gum Arabic	Other processes (transport♥)
	kg CO <sub>2</sub> eq	77.7%	5.8%
Energy demand	MJ	75.5%	24.5%
		Refined gum Arabic	Other processes (transport♥)
	MJ	69.8%	5.7%

♥Corresponds to transport of the refined gum Arabic from the manufacturing plant in the USA to the biofertilizers plant in Dominican Republic

Table S6. Metadata corresponding to the common bean field trial. Data are mean values for each farm and technology, with standard error in parenthesis. CT: conventional technology; IT: inoculation technology, and C-: control without inoculation or N-fertilisation.

Farm No. (according to Table S1)	Plants m <sup>2</sup>			Pods per plant			1000-seed weight (g) (dry matter)			Seeds per pod			Yield of commercial beans (containing 89% dry matter) (kg ha <sup>-1</sup> )		
	C -	CT	IT	C -	CT	IT	C -	CT	IT	C -	CT	IT	C -	CT	IT
1	8.4 (0.18)	8.4 (0.22)	8.7 (0.17)	7.7 (0.93)	9.9 (0.24)	9.5 (0.37)	48.5 (1.11)	46.6 (1.53)	47.2 (1.20)	3.5 (0.11)	3.6 (0.08)	3.6 (0.06)	1,067 (121)	1,375 (75)	1,403 (59)
2	8.7 (0.29)	8.3 (0.17)	8.9 (0.26)	8.0 (0.79)	9.9 (0.25)	8.6 (0.63)	45.8 (1.17)	46.3 (1.14)	46.2 (0.63)	3.6 (0.04)	3.5 (0.06)	3.8 (0.07)	1,148 (115)	1,363 (56)	1,272 (88)
3	8.3 (0.29)	8.1 (0.31)	8.8 (0.28)	5.9 (0.81)	9.6 (0.53)	8.7 (0.56)	50.0 (1.82)	44.8 (1.18)	46.8 (1.32)	3.4 (0.12)	3.6 (0.04)	3.7 (0.05)	828 (120)	1,205 (51)	1,292 (58)
4	9.0 (0.29)	9.3 (0.41)	9.3 (0.24)	11.6 (0.72)	14.9 (0.49)	14.5 (0.52)	43.5 (1.19)	40.7 (0.88)	41.0 (0.57)	3.9 (0.08)	4.0 (0.08)	4.0 (0.05)	1,740 (94)	2,193 (126)	2,228 (83)
5	9.2 (0.28)	9.6 (0.18)	9.1 (0.42)	12.6 (0.63)	15.1 (0.82)	17.8 (1.20)	40.3 (1.44)	39.9 (0.91)	39.0 (0.72)	4.3 (0.10)	4.4 (0.09)	4.3 (0.07)	1,991 (125)	2,404 (143)	2,650 (146)
6	8.7 (0.24)	8.7 (0.33)	9.2 (0.22)	14.1 (1.02)	17.5 (0.50)	15.8 (1.01)	42.7 (0.91)	42.4 (0.40)	41.9 (0.52)	4.0 (0.07)	4.2 (0.07)	4.1 (0.09)	2,072 (100)	2,718 (126)	2,560 (164)
7	8.8 (0.28)	8.8 (0.32)	9.4 (0.18)	15.5 (0.69)	16.5 (1.02)	15.7 (0.82)	41.6 (0.70)	42.0 (0.50)	42.0 (0.94)	4.0 (0.04)	4.1 (0.06)	4.1 (0.07)	2,363 (101)	2,476 (174)	2,529 (113)
8	8.8 (0.40)	8.6 (0.18)	8.7 (0.24)	11.4 (0.49)	15.3 (1.23)	15.8 (1.80)	43.1 (0.97)	42.3 (1.15)	44.2 (1.05)	3.9 (0.05)	4.2 (0.09)	4.4 (0.10)	1,698 (130)	2,354 (200)	2,444 (235)

Table S7. Metadata corresponding to the Pigeon pea field trial. Data are mean values for each farm and technology, with standard error in parenthesis.

Farm No. (Table S1)	Pods per plant		100-seed weight (g) (dry matter)		Seeds per pod		Yield referred to dry matter (kg ha <sup>-1</sup> )*	
	CT	IT	CT	IT	CT	IT	CT	IT
1	31.8 (1.22)	36.1 (1.58)	38.0 (0.60)	38.5 (1.44)	3.9 (0.12)	4.4 (0.10)	453 (11)	622 (54)
2	33.4 (1.16)	35.7 (3.12)	37.5 (1.19)	38.5 (0.65)	4.5 (0.16)	4.6 (0.11)	587 (7)	614 (33)
3	50.9 (1.78)	56.4 (2.57)	38.3 (0.85)	39.3 (1.84)	4.6 (0.16)	4.6 (0.26)	917 (56)	1023 (31)
4	43.2 (1.81)	59.0 (2.46)	36.4 (0.90)	38.5 (2.10)	4.6 (0.08)	4.8 (0.19)	749 (20)	1120 (68)
5	32.7 (6.20)	48.0 (1.96)	37.0 (0.71)	38.5 (1.50)	4.5 (0.15)	4.5 (0.24)	560 (105)	855 (56)
6	47.7 (0.93)	58.2 (2.21)	37.1 (0.53)	38.5 (1.32)	4.5 (0.19)	5.0 (0.16)	844 (23)	1116 (38)
7	61.1 (6.10)	82.3 (3.33)	36.5 (1.32)	38.0 (1.87)	4.7 (0.21)	4.7 (0.11)	1077 (94)	1561 (36)
8	59.5 (3.06)	81.9 (4.48)	37.0 (1.08)	37.8 (0.48)	4.8 (0.12)	4.9 (0.14)	1120 (62)	1633 (88)
9	65.3 (7.40)	71.1 (6.21)	37.0 (0.82)	37.5 (0.65)	4.9 (0.20)	4.8 (0.16)	1254 (154)	1332 (140)

\* Pigeon pea is collected and consumed as green grains, but due to the great variation of dry matter content of green grains, the yield has been corrected to dry matter for more constant values.