

**Selección de genotipos de frijol común
tolerantes a bajo contenido de nitrógeno
en el suelo**

Ana Gabriela Vargas Palacios

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Selección de genotipos de frijol común
tolerantes a bajo contenido de nitrógeno
en el suelo**

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera Agrónoma
en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ana Gabriela Vargas Palacios

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2008

Selección de genotipos de frijol común tolerantes a bajo contenido de nitrógeno en el suelo

Presentado por:

Ana Gabriela Vargas Palacios

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Director de Carrera Ciencia y
Producción Agropecuaria

Marcelino Guachambala, I. A.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador Área Fitotecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Vargas, A. 2008. Selección de genotipos de frijol común tolerantes a bajo contenido de nitrógeno en el suelo. Proyecto especial del programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras, 17 p.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano en la región centroamericana. El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar genotipos tolerantes a bajo contenido de nitrógeno en el suelo y con buena respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*. Se realizaron dos ensayos en casa de malla. En el primer ensayo se efectuó la evaluación preliminar de 180 genotipos inoculados con una mezcla de las cepas CIAT899 (*Rhizobium tropici*) y CR477 (*Rhizobium etli*), utilizando una distribución al azar sin repeticiones. A la floración se realizaron mediciones de nodulación (escala 1 a 9), pesos secos de raíces y parte aérea y se identificaron 25 genotipos superiores. En el segundo ensayo se validó la respuesta de 25 genotipos usando un arreglo en parcelas divididas de un diseño de bloques completamente al azar, con cuatro tratamientos (con *Rhizobium* sin nitrógeno, con *Rhizobium* con nitrógeno, sin *Rhizobium* con nitrógeno y sin *Rhizobium* sin nitrógeno) distribuidos en las parcelas y los 25 genotipos en las sub-parcelas con un total de cuatro repeticiones. Se observó una buena respuesta a la inoculación que varió según el tratamiento y genotipo. Se logró identificar genotipos con buen crecimiento en bajo N que presentaron muy buena nodulación y peso seco de la planta, incluyendo a Carioca, Cincuentaño y G21212. Aunque no presentaron una alta nodulación, los genotipos Don Cristóbal, Morales y Victoria, presentaron un buen peso seco de las plantas.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, inoculación, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*.

ABSTRACT

Vargas, A. 2008. Selection of common bean genotypes tolerant to low nitrogen content in the soil. Special Project Program in Science, Engineering and Agricultural Production, Zamorano, Honduras, 17 p.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important grain legume for human consumption in the Central American region. This study was conducted with the purpose of identifying genotypes tolerant to low nitrogen (N) content in the soil, and with good response to inoculation with *Rhizobium*. Two trials were conducted under green house conditions. The first trial, a preliminary assessment of 180 genotypes inoculated with a mixture of CIAT899 (*Rhizobium tropici*) and CR477 (*Rhizobium etli*), was conducted using a random distribution without replications. At flowering, nodulation (using a 1 to 9 scale), root and shoot dry weight were measured. In the second trial, the tolerant response to low N was validated in 25 genotypes using an split plot arrangement of a randomized complete block design with four treatments (with *Rhizobium*, without N; with *Rhizobium*, with N; without *Rhizobium*, with N; and without *Rhizobium*, without N) distributed in the main plots and 25 genotypes in the sub-plots, with a total of four replications. There was a good response to inoculation which varied according to the treatment and genotype. Genotypes with good growth under low N that presented very good nodulation and plant dry weight, including Carioca, Cincuentaño and G21212, were identified. Although they did not presented high nodulation, the genotypes Don Cristobal, Morales and Victoria, did have high plant weight values.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, inoculation, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*.

CONTENIDO

Portadilla.....	I
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
CONCLUSIONES.....	12
RECOMENDACIONES.....	13
LITERATURA CITADA.....	14
ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Acciones de frijol común de la Colección de Trabajo del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) utilizadas en el Ensayo 1. Zamorano, Honduras, 2008.....	5
2. Rangos de variación en nodulación, peso seco de la parte aérea (PSA), raíces (PSR) y total (PST), y la relación PSA/PSR a floración de 180 acciones de frijol común inoculadas con las cepas de <i>Rhizobium</i> CR477 y CIAT 899, y crecidas en un sustrato con bajo contenido de nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.....	7
3. Coeficientes de correlación (r) entre la nodulación, el peso seco de raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) a floración de 180 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2008.....	8
4. Ecuaciones de regresión lineal entre los valores de nodulación, pesos secos de raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) a la floración de 180 genotipos de frijol común crecidos con <i>Rhizobium</i> y bajo nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.....	8
5. Promedios de tratamientos, genotipos, su interacción y diferencias mínimas significativas del peso seco de nódulos (PSN), parte aérea (PSA), raíz (PSR) y total (PST) en la etapa de floración y del peso seco de granos (PSG) y cien semillas (PSCS) a la cosecha de 25 genotipos de frijol común crecidos bajo tratamientos con <i>Rhizobium</i> y nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.....	10
6. Coeficientes de correlación (r) entre los pesos secos de nódulos (PSN), raíces (PSR), aéreo (PSA) total (PST) a la floración y peso seco de granos (PSG) y de cien semillas (PSCS) a la cosecha de 25 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2008.....	11
7. Ecuaciones de regresión lineal entre las relaciones del peso seco de nódulos (PSN) con raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) de 25 genotipos de frijol común crecidos bajo tratamientos con <i>Rhizobium</i> y nitrógeno. Zamorano, Honduras. 2008.....	11

Anexos

1.	Resultados del análisis de medio y sustrato utilizado en los dos ensayos. Zamorano, Honduras. 2008.....	16
2.	Prueba de gota para estimar la concentración de rizobios en el inóculo.....	16
3.	Representación de la escala 1-9 para evaluar la nodulación por <i>Rhizobium</i> en la planta de frijol común.....	17
4.	Representación de la escala 1-5 para evaluar vigor vegetativo en plantas de frijol común crecidas en bajo nitrógeno.....	17

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano alimenticia más importante para el consumo humano. Su producción abarca áreas diversas, pudiéndose decir con propiedad que prácticamente se cultiva en todo el mundo. América Latina es la zona de mayor producción y consumo, estimándose que más del 45% del total de la producción mundial proviene de esta región, siendo la fuente de mayor valor proteico a la cual tienen acceso los habitantes de bajos recursos en estos países (Voyses 2000). El frijol es un componente de la dieta diaria de la mayoría de la población centroamericana; en la última década se ha convertido en un rubro importante de exportación hacia los mercados de inmigrantes de Centro América en los EE.UU. (IICA 2007).

Los rendimientos del frijol común en las regiones productoras de Latinoamérica y África son inferiores al potencial del mismo, debido a diversos factores limitantes incluyendo la sequía, los daños por plagas y enfermedades, y la baja fertilidad de los suelos. La deficiencia de nutrientes en la mayoría de los suelos dedicados a la producción de este rubro, limitan los niveles de productividad del cultivo. La baja inversión en la aplicación de insumos y prácticas recomendadas para el manejo en la mayoría de las regiones productoras, contrasta con la de los países desarrollados donde la productividad del mismo es significativamente mayor.

Aunque el nitrógeno es abundante en la atmósfera, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo en forma de nitratos. En los suelos, dicho elemento está contenido en la materia orgánica y en muchas regiones su bajo contenido no cubre las necesidades de N de los cultivos. La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la biosfera, en el cual, bacterias del género *Rhizobium*, inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos mediante el establecimiento de un proceso simbiótico. Estos microorganismos sintetizan la enzima nitrogenasa y por medio de ésta el nitrógeno atmosférico (N₂) se hace disponible para la planta. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la FBN; sin embargo, es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo (López 2005).

La inoculación con cepas de *Rhizobium* y su interacción con variedades que presentan mayor capacidad de nodulación y fijación de N₂, es una alternativa para suplir las necesidades del nutriente y aumentar la productividad de este cultivo en zonas con suelos de bajo contenido de materia orgánica. Diversos estudios indican que la planta de frijol puede obtener hasta el 50% de sus necesidades de N para una producción ideal, cuando se establece una simbiosis efectiva con dichas cepas (Rosas 2003). Una de las bacterias de este género predominante en la región Mesoamericana es *Rhizobium etli*; sin embargo, el efecto de esta bacteria en el

cultivo de frijol se ve afectado por las cepas nativas presentes en los suelos donde se cultiva esta leguminosa (Martínez 2003).

La práctica de la inoculación con cepas de *Rhizobium* seleccionadas es eficiente, económica y amigable al ambiente; mediante la inoculación se puede manejar la nutrición nitrogenada en la mayoría de leguminosas. Por otro lado, la utilización de variedades de frijol con mayor eficiencia en el uso de N proveniente de la mineralización de la materia orgánica en el suelo y/o del N inorgánico aportado mediante la fertilización, representa una alternativa para mejorar la productividad en zonas donde los aportes de materia orgánica y de fertilizantes nitrogenados están limitados por su disponibilidad y precio.

En este estudio se evaluó una amplia diversidad de germoplasma de frijol común bajo condiciones controladas y usando sustratos con bajo contenido de nitrógeno e inoculación con cepas de *Rhizobium*. Se analizó la tolerancia de los genotipos a diferentes niveles de nitrógeno, con el propósito de seleccionar aquellos con tolerancia a bajos niveles del mismo, para utilizarlos dentro de programas de mejoramiento y su posible validación comercial con agricultores.

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN

Para esta investigación se realizaron dos ensayos conducidos en casas de malla, complementados con evaluaciones en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF). Ambas facilidades están ubicadas en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, valle del Yeguare, departamento de Francisco Morazán, Honduras; a 800 msnm, con una temperatura media anual de 24°C y precipitación promedio anual de 1,100 mm. Los estudios se llevaron a cabo durante el período de mayo a septiembre de 2008.

ENSAYO 1: SELECCIÓN PRELIMINAR DE GENOTIPOS DE FRIJOL COMÚN CON TOLERANCIA A BAJO NITRÓGENO Y ALTA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN CON CEPAS DE *Rhizobium*.

Material Experimental

Se usaron 180 accesiones criollas y mejoradas de frijol de la colección élite del Banco de Germoplasma de *Phaseolus* del PIF (Cuadro 1). Como inóculo se utilizaron las cepas CIAT899 (*Rhizobium tropici*) y CR477 (*Rhizobium etli*).

Tratamientos

Los tratamientos fueron los 180 genotipos de frijol común que fueron evaluados en un medio de crecimiento (suelo: arena) bajo en nitrógeno.

Diseño Experimental

No se utilizó un diseño experimental con repeticiones. Los 180 genotipos fueron distribuidos al azar en la casa de malla. La unidad experimental fue de tres plantas de cada genotipo por macetero.

Siembra

Se sembraron semillas esterilizadas con cloro al 10% y pre-germinadas durante dos días. La siembra se realizó con semillas pre-germinadas escogidas por presentar una longitud de radícula similar, con el fin de obtener plantas uniformes en tamaño para cada genotipo. La siembra se realizó en maceteros de 20 cm conteniendo 4.5 kg de un sustrato suelo: arena (1:1)

Fertilización

El análisis del medio de crecimiento indicó contenidos bajos de materia orgánica (1.24%) y nitrógeno total (0.06%), deseables para el ensayo (Anexo 1). Debido a que los contenidos de calcio y fósforo fueron medios y el de magnesio bajo, se procedió a incorporar al sustrato, cal dolomítica (22% Ca y 9.5% Mg) y superfosfato triple (0-46-0), siguiendo las recomendaciones del laboratorio de suelos para evitar que se

presentaran deficiencias nutricionales de otros nutrimentos además de N.

Inoculación

Las plantas fueron inoculadas cuatro días después de siembra (DDS) con un inoculante líquido elaborado con una mezcla de las cepas CIAT 899 y CR 477, en un caldo levadura- manitol (LM), agitado durante 96 horas hasta alcanzar la saturación total del medio. El inóculo líquido (1.25×10^4 rizobios/ml) fue aplicado en la base del tallo de cada planta utilizando una pipeta. La concentración de rizobios en el inóculo fue determinada mediante la prueba de gota (Anexo 2).

Manejo del ensayo

Las plantas fueron regadas diariamente con agua potable a las 9 am y 2 pm con volúmenes similares a todas las plantas, el cual fue incrementando de acuerdo al desarrollo de las plantas, empleándose 200 ml por macetero en las primeras semanas hasta 500 ml en la semana previa al muestreo realizado a floración.

Evaluaciones

La nodulación fue evaluada visualmente a los 35 DDS utilizando una escala de 1 a 9 (1= pobre nodulación y 9= máxima nodulación) ajustada de acuerdo con la variación observada en el ensayo al momento del muestreo (Anexo 3). Asimismo, el follaje se evaluó visualmente con una escala de 1 a 5, desarrollada con base en los síntomas de deficiencia de nitrógeno (Anexo 4). Para realizar la evaluación de la nodulación, se cosecharon las plantas separando la parte aérea de las raíces a la altura de la base del tallo mediante un corte con tijera de poda. Una vez hecha la evaluación de la nodulación, las raíces y la parte aérea se secaron a $70^\circ\text{C} \times 24$ horas, para determinar el peso seco de raíces (PSR) y peso seco de la parte aérea (PSA). El peso seco total (PST) de la planta se determinó mediante la suma de los dos anteriores.

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos para determinar el promedio, la correlación (Pearson) y regresión lineal de los datos de nodulación, PSR, PSA y PST de las plantas cosechadas de los 180 genotipos con el programa Statistix[®] 8.1.

ENSAYO 2: VALIDACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL CON ALTA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN CON *Rhizobium* BAJO CONDICIONES VARIABLES DE CONTENIDO DE NITRÓGENO.

Material Experimental

Se utilizaron 25 genotipos de frijol seleccionados del ensayo anterior, incluyendo los 21 genotipos con los valores más altos en nodulación y PST, tres genotipos con valores bajos de nodulación y PST (Morales, Victoria y Don Cristóbal), y un genotipo con valores intermedios (Negro Jamapa). Para los tratamientos inoculados con *Rhizobium* se emplearon las cepas CIAT899 y CR477.

Tratamientos

Los genotipos se manejaron bajo cuatro tratamientos diferentes: 1) con *Rhizobium*, sin nitrógeno, 2) con *Rhizobium*, con nitrógeno, 3) sin *Rhizobium*, con nitrógeno y 4) sin *Rhizobium*, sin nitrógeno.

Cuadro 1. Accesiones de frijol común de la Colección de Trabajo del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) utilizadas en el Ensayo 1. Zamorano, Honduras, 2008.

No.	Accesión	No.	Accesión	No.	Accesión	No.	Accesión
1	A 774	46	F000 8	91	MH 43-2	136	Seda (Morocelí)
2	Aifi Wuriti	47	F0057	92	MH 53-1	137	SEQ 11
3	Amadeus 77	48	G 05686	93	MHC 2-11-33	138	SEQ 12
4	Arroyo Loro Negro	49	G 06727	94	MHR 311-17	139	SEQ 32
5	BCN 20-02-2	50	G 21212	95	MHR 312-13	140	SRC 1-1-18
6	BFSZ 15132-12-3	51	G 3513	96	MHR 314-30	141	SRC 1-2-12
7	B 2018	52	Gibre	97	MR 14292-2	142	SRC 1-12-1-47
8	B 98311	53	Habichuela Tierna	98	Milenio	143	SRC 2-17-81
9	BAT 477	54	IBC 301-204	99	Morales	144	SRC 2-18-2
10	BAT 881	55	IBC 302-29	100	MUS 132	145	SRCO 14-31
11	BAT 93	56	IBC 302-29 VR	101	MUS 181	146	SRCO 21-4
12	Bribri	57	IBC 305-6	102	MUS N-8	147	SRCO 3-39
13	Cardenal	58	IBC 305-55	103	Negro INIFAP	148	SRCO 9-7
14	Carioca	59	IBC 305-67	104	Negro Jamapa	149	SRS 6-6
15	Carrizalito	60	IBC 306-82	105	NOD 125	150	SX 14825-7-1
16	Catrachita	61	IBC 306-95	106	Nueva Esperanza	151	Salamanca
17	Catracho de Seda	62	IBC 308-15	107	Orgullosa	152	Tío Canela 75
18	Cedrón	63	IBC 308-25	108	Oriente	153	TLP 19
19	CENTA Pipil	64	IBC 309-23	109	Palmichal 1	154	TLP 35
20	Chile	65	ICTA Ligero	110	Paraisito	155	Tonjibe
21	Chingo R	66	ICTA Ostúa	111	PI 172030	156	Turbo III
22	Cincuentaño	67	Ind. Jamaica Red	112	Pompadour G	157	UCR 55
23	Conán 33	68	INTA precoz	113	Pompadour J	158	UCR 61
24	Concha Rosada	69	L88-13	114	Porrillo Sintético	159	UPR 9177-214-1
25	Cornell 49242	70	L88-30	115	PPB 11-20MC	160	UPR 9356-26
26	CRF 61	71	L88-33	116	PR 9357-107	161	UPR 9438-129
27	Cuarentaño	72	L88-62	117	PR 9443-4	162	UPR 9438-140
28	Curré	73	L88-63	118	PRF 9653-16B-1	163	UPR 9609-2-2
29	DEORHO	74	L91-30	119	PRF 9804-34	164	UPR 9825-49-4
30	Dicta 113	75	Macuzalito	120	PRF 9924-50-N	165	UW 23-24
31	DICTA 117	76	Madura Parejo	121	PR 0310-242	166	VAX 1
32	Dicta 122	77	MAR 1	122	PR 0310-243-2	167	VAX 3
33	Don Cristóbal	78	Marciano	123	PTC 9557-10	168	VAX 6
34	Don Silvio RR	79	MD 30-19	124	PTC 9557-32	169	Victoria
35	Don Víctor	80	MD 30-37	125	RAB 651	170	V 8025
36	DOR 390	81	MD 30-97	126	RAB 655	171	X01-36-81-100-5
37	DOR 391	82	MDSX 14797-6-1	127	Raven	172	X069-153-9-4-3-3
38	DOR 483	83	MER 2212-28	128	Rojo de Seda	173	X069-157-8-5-6-1
39	DOR 500	84	MER 2226-12	129	Rojo Lila	174	XRAV 40-4
40	Dorado	85	MER 2226-34	130	Rosada Nativa	175	Yeguaré
41	EAP 9020-14	86	MER 2226-35	131	Rosita Nativa	176	Zamorano
42	EAP 9021-14	87	MH 2-2	132	Sacapobres	177	428 DFBZ 15094
43	EAP 9503-32B	88	MH 3-1	133	Salagnac	178	519 DFSZ 15089
44	EAP 9504-30B	89	MH 4-9	134	Santa Gertrudis	179	523 DFBS 15092
45	EAP 9508-48	90	MH 5-14	135	SEA 5	180	703 SM 15216

Diseño Experimental

Se utilizó un arreglo factorial en parcelas divididas en un Diseño de Bloques Completamente al Azar con cuatro tratamientos distribuidos en las parcelas y los 25 genotipos en las sub-parcelas con cuatro repeticiones de cada uno.

Siembra

Se sembraron semillas esterilizadas con etanol al 10% y pre-germinadas por dos días. La siembra se hizo escogiendo las semillas pre-germinadas con tamaño similar de radícula para obtener plantas de tamaño uniforme. La siembra se realizó en maceteros de 15 cm conteniendo 2.5 kg de sustrato suelo: arena (2:1) previamente esterilizado con vapor. Se sembraron dos maceteros (una planta/macetero) de cada genotipo para cada tratamiento y repetición, para los dos muestreos realizados a la floración y a la madurez fisiológica, respectivamente.

Inoculación

Las plantas fueron inoculadas a los cuatro y ocho DDS para asegurar una buena infección. En ambas inoculaciones se utilizó un inóculo líquido mezcla de las cepas CIAT 899 y CR 477, aplicado en la base del tallo con una pipeta a razón de 1 ml inóculo/planta (1.25×10^4 rizobios/ml). La concentración de rizobios en el inóculo fue determinada mediante la prueba de gota.

Fertilización

Se fertilizó con una solución nutritiva sin N (Broughton y Dillworth 1970), aplicada cada dos días a las 9 am. Los riegos con agua potable fueron realizados diariamente a las 9 am y 3 pm. Se suministró la misma cantidad de solución a todas las plantas y el volumen aplicado se aumentó gradualmente de acuerdo al crecimiento de las mismas. A los 10 y 12 DDS se aplicaron 50 ml/macetero, y a partir de los 14 hasta los 56 DDS se aplicaron 75 ml/ macetero. Para los tratamientos con N se agregó a dicha solución N a razón de 70 ppm utilizando nitrato de potasio.

Evaluaciones

La nodulación fue evaluada a los 35 DDS, para lo cual se procedió a separar las raíces de la parte aérea mediante un corte en la base del tallo con tijera de podar. Luego se lavaron las raíces y se separaron los nódulos de cada planta. Los nódulos fueron colocados en latas de aluminio a $70^\circ\text{C} \times 24$ horas para determinar el PSN. Las raíces y la parte aérea fueron colocadas a secar a $70^\circ\text{C} \times 48$ horas, para determinar los PSR y PSA. El PST se determinó mediante la suma de los anteriores. A la madurez de cosecha, 72 DDS, se cosecharon las semillas de las plantas y se determinaron el peso seco de granos/planta (PSG) y el peso seco de 100 semillas (PSCS).

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de varianza de los datos de las variables medidas en ambos muestreos, y se separaron las medias en los factores donde se presentaron diferencias significativas utilizándose la diferencia mínima significativa (DMS). Además, se realizaron análisis de correlación de Pearson y regresión lineal para todas las variables utilizando el Programa Statistix[®] 8.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ENSAYO 1: SELECCIÓN PRELIMINAR DE GENOTIPOS DE FRIJOL COMÚN CON TOLERANCIA A BAJO NITRÓGENO Y ALTA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN CON CEPAS DE *Rhizobium*.

La respuesta a la inoculación fue sumamente variable debido a la diversidad de los genotipos utilizados en el ensayo, entre los cuales se incluyeron variedades criollas y mejoradas, de ambos reservorios genéticos: Andino y Mesoamericano; así como líneas avanzadas de frijol generadas por recombinaciones entre progenitores provenientes de razas diversas de estos dos reservorios genéticos. Todos los genotipos han sido utilizados en el mejoramiento genético del cultivo llevado a cabo por el PIF de Zamorano, la Universidad de Puerto Rico, el Programa Bean/Cowpea CRSP-USAID, y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Los valores de la nodulación (escala 1 a 9), y los del PSR, PSA y PST, y de la relación PSA/PSR, observada en los genotipos del ensayo variaron ampliamente presentándose diferencias entre los genotipos para las variables medidas. Para observar esta amplia variación genotípica, se presentan los rangos de los valores de estas variables con base en los 180 genotipos, así como los datos contrastantes de los 10 genotipos superiores y los 10 genotipos inferiores en nodulación y el promedio (Cuadro 2).

Al comparar los dos grupos, se puede observar que además de la diferencia en nodulación, los genotipos de uno y otro grupo contrastan en el PSR, PST y la relación PSA/PSR. Los 10 genotipos con mayor nodulación son muy superiores a los 10 genotipos de menor nodulación en este aspecto; pero también presentan mayor PSR que los de pobre nodulación. En cuanto al PSA, el rango es relativamente similar en los genotipos superiores como en los inferiores. La relación PSA/PSR es menor en los genotipos de mayor nodulación que en los de baja nodulación, sugiriendo mayor distribución de la materia seca total en las raíces de los genotipos con mejor nodulación.

Cuadro 2. Rangos de variación en nodulación, pero seco de la parte aérea (PSA), raíces (PSR) y total (PST), y la relación PSA/PSR, en la etapa de floración de 180 accesiones de frijol común inoculadas con las cepas de *Rhizobium* CR477 y CIAT 899, y crecidas en un sustrato con bajo contenido de nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.

Genotipo	Nodulación (1-9)	PSA (g/pl)	PSR (g/pl)	PST (g/pl)	Relación PSA/PSR
Rango (n=180)	2.0-8.5	1.3-2.8	0.2-1.2	1.6-3.5	1.8-9.7
Superior (10)	7.0-8.5	1.9-2.5	0.5-1.1	2.6-3.4	2.1-4.0
Inferior (10)	2.0-2.7	0.8-2.3	0.2-0.6	2.1-2.9	4.1-9.7
Promedio (n= 180)	4.58	2.60	0.62	2.68	1.23

Valores de nodulación (1-9) según escala de medición visual.

Los coeficientes de correlación (r) fueron significativos entre el PSA y PST, PSR y PST, y de la nodulación y los valores de PSR y PST (Cuadro 3), demostrándose relaciones entre estas variables en las condiciones de crecimiento de bajo contenido de N. Sin embargo, en la relación del PSA con el PSR y la nodulación, los coeficientes no fueron significativos, lo que sugiere que para las condiciones de bajo N las relaciones con el PST de las plantas son más relevantes. Por ello se decidió identificar los genotipos superiores para estudios posteriores, con base en la nodulación y el PST de las plantas. Hay que considerar que la tolerancia de los genotipos de frijol a bajo N en el suelo, dependerá de la capacidad de nodulación y fijación de N_2 en interacción con cepas específicas, y adicionalmente de otros mecanismos que les permita aprovechar el N presente de una forma más eficiente. Los genotipos que aumentan el PSR con la nodulación lo hacen debido a la formación de raíces laterales como una respuesta positiva al inóculo, formando mayor estructura radicular en el área donde se establece la cepa (Menéndez 1982). Las ecuaciones de regresión indican los valores en los cuales, a partir de un valor base, aumentan los PSR, PSA y PST (Y), por el aumento en los valores de la nodulación (X) (Cuadro 4).

Por haberse utilizado un sustrato bajo en materia orgánica y N total, se pudo establecer que las diferencias entre los genotipos en las variables medidas se debieron a variaciones en el establecimiento de una simbiosis efectiva. Sin embargo, en este ensayo no se pudo separar los efectos de interacción genotipo \times cepa, debido a la utilización de una mezcla de dos cepas de *Rhizobium* en vez de inoculaciones separadas. Lo que se esperaba lograr era identificar los genotipos sobresalientes en un grupo diverso, con los que se podrá continuar ensayos más detallados con cepas individuales que facilitarán identificar interacciones genotipo \times *Rhizobium* efectivas, teniendo en cuenta los estudios que demuestran que para cada genotipo existe una bacteria específica con la cual la simbiosis es más efectiva (López 2005).

Cuadro 3. Coeficientes de correlación (r) entre la nodulación, el peso seco de raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) en la etapa de floración de 180 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2008.

Observaciones	Nodulación	PSA	PST
PSA	0.269 ^{ns}		
PST	0.508*	0.832**	
PSR	0.567*	0.280 ^{ns}	0.765**

*, ** y ns Significativo ($P \leq 0.05$), altamente significativo ($P \leq 0.01$) y no significativo, respectivamente, según análisis de correlación lineal de Pearson.

Cuadro 4. Ecuaciones de regresión lineal entre los valores de nodulación, pesos secos de raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) en la etapa de floración de 180 genotipos de frijol común crecidos con *Rhizobium* y bajo nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.

VARIABLES	Ecuación
Nodulación- PSR	$Y = 0.570 + 0.280 X$ **
Nodulación- PSA	$Y = 5.486 + 0.151 X$ **
Nodulación- PST	$Y = 6.054 + 0.431 X$ **

**Altamente significativo ($P \leq 0.01$) según análisis de regresión lineal.

ENSAYO 2: VALIDACIÓN DE GENOTIPOS DE FRIJOL CON ALTA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN CON *Rhizobium* BAJO CONDICIONES VARIABLES DE CONTENIDO DE NITRÓGENO.

Se presentaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos para las variables de PSN, PSR, PSA, PST y PSG. De manera similar, se presentaron diferencias entre genotipos para todas las variables medidas. En lo que respecta a la interacción tratamiento \times genotipo (T \times G), no se presentaron diferencias en ninguna de las variables (Cuadro 5).

El PSN fue mayor en el tratamiento con *Rhizobium* y sin N. Esto se debe a que la bacteria alcanza su mayor efectividad cuando se encuentra en un medio deficiente en este nutrimento (Mulongoy *et al.* 1990). Por el contrario, se presenta una reducción en la nodulación en el tratamiento inoculado con adición de N, lo cual afecta la nodulación. En las plantas de los dos tratamientos sin inoculación, se observaron nódulos debido a que el procedimiento de pasteurización no fue efectivo en eliminar la presencia de rizobios nativos presentes en el suelo agrícola utilizado en la preparación del sustrato. Sin embargo, los nódulos en estas plantas estaban distribuidos en las partes extremas de las raíces y presentaban una coloración verde o blanca, característicos de una nodulación inefectiva causada por rizobios nativos. Lo opuesto se observó en las plantas inoculadas con las cepas CIAT899 y CR477, cuyos nódulos estaban concentrados en la zona basal de las raíces y su coloración era completamente rosada, típica de nódulos activos con un buen contenido de leghemoglobina y nodulinas (Morán 1995). Estas características tan diferenciadas entre las plantas bajo los tratamientos con y sin inóculo, descartaron la posibilidad de que las plantas no inoculadas se hubiesen contaminado con las cepas efectivas que se utilizaron como inóculo. Por otro lado, estas contaminaciones con rizobios nativos no necesariamente se consideran indeseables en estudios de esta naturaleza, ya que permite la identificación de genotipos que puedan establecer simbiosis altamente efectivas en presencia de rizobios nativos los cuales están presentes en la mayoría de los suelos donde se produce este cultivo.

Los valores de PSR, PSA, PST y PSG variaron de acuerdo a los tratamientos significativamente, siendo mayores en los dos tratamientos con nitrógeno. En la práctica, no puede esperarse que las plantas inoculadas superen en crecimiento y productividad a las que reciben una buena dosis de N; sino que en suelos con bajo contenido de materia orgánica y bajo N disponible, teniendo en cuenta las limitaciones para la adquisición de fertilizantes nitrogenados, la combinación de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium* efectivas ofrezcan alternativas en condiciones con bajos insumos.

La variación entre los genotipos, confirmó las diferencias en la capacidad de ciertos genotipos de establecer una simbiosis más efectiva que otros con las cepas utilizadas. Los genotipos que tuvieron mejores valores de nodulación presentaron los mayores valores de PSG con diferencias significativas; los cuales representan una alternativa comercial. Los genotipos con menores valores de nodulación seleccionados por sus alto PST tuvieron valores altos en el PSG, lo que sugiere que dichos genotipos poseen otros mecanismos para utilizar el poco nitrógeno disponible de manera más eficiente.

Cuadro 5. Promedios de tratamientos, genotipos, su interacción y diferencias mínimas significativas del peso seco de nódulos (PSN), parte aérea (PSA), raíz (PSR) y total (PST) en la etapa de floración, y del peso seco de granos (PSG) y cien semillas (PSCS) a la cosecha de 25 genotipos de frijol común crecidos bajo tratamientos con *Rhizobium* y nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.

Fuentes de Variación	Floración				Cosecha	
	PSN (mg/pl)	PSR (mg/pl)	PSA (g/pl)	PST (g/pl)	PSG (g/pl)	PSCS (g/100)
Tratamientos :						
+ <i>Rhizobium</i> – N	338	750	3.40	4.49	8.83	77.89
+ <i>Rhizobium</i> + N	268	971	4.44	5.68	9.48	64.32
- <i>Rhizobium</i> + N	244	865	4.04	5.15	9.74	62.45
- <i>Rhizobium</i> - N	208	600	2.53	3.33	6.73	55.1
DMS	**	73**	0.25**	0.34**	1.06**	Ns
Genotipos:						
Cincuentaño	378	776	4.30	5.45	10.91	52.38
G21212	336	867	4.07	5.27	10.76	48.81
Carioca	336	778	3.90	5.01	9.99	51.50
Sacapobres	329	903	3.95	5.18	8.83	60.24
SX 14825-7-1	309	873	4.20	5.38	9.30	58.72
B 98311	306	790	3.87	4.97	9.72	52.97
Dicta 117	302	778	4.03	5.11	9.45	57.19
Concha Rosada	300	872	3.84	5.01	5.36	116.05
Cuarenteño	293	762	3.57	4.63	8.91	64.25
G05686	293	1073	4.10	5.46	4.73	165.13
NOD 125	288	908	3.78	4.97	6.71	109.80
Negro Jamapa	280	766	3.36	4.41	7.28	132.73
DFBZ 15094-39-4	279	745	3.81	4.84	9.91	48.89
Bribri	269	797	3.60	4.67	9.78	47.38
BAT 881	251	856	3.38	4.49	7.96	53.94
Don Victor	241	813	3.58	4.64	7.74	63.10
Carrizalito	229	830	3.51	4.57	9.94	47.35
Don Silvio RR	224	677	3.26	4.16	9.41	45.72
Victoria	222	707	3.16	4.09	9.97	41.22
Cardenal	221	778	3.68	4.68	9.10	52.86
CRF 61	220	783	3.27	4.27	8.68	54.85
DOR 500	210	761	3.46	4.43	8.47	54.64
Don Cristóbal	193	722	3.28	4.19	8.89	50.09
BFSZ 15132-12-3	150	771	2.66	3.58	7.18	53.30
Morales	142	530	2.48	3.16	8.40	40.39
DMS	**	126**	0.43**	0.55**	1.31**	**
T × G (DMS)	ns	ns	Ns	Ns	ns	Ns

*, ** y ns Significativo ($P \leq 0.05$), altamente significativo ($P \leq 0.01$) y no significativo, respectivamente.

Los análisis de correlación indicaron coeficientes significativos para las relaciones entre el PSN y PST, PSR y PST, PSA y PST (Cuadro 6). Al comparar con la correlación establecida en el primer ensayo, se observó el aumento en la relación PSA y PST con PSN, lo cual mostró una mayor homogeneidad en las características y capacidad de nodular de los genotipos seleccionados. Adicionalmente, se observó que

no existe una correlación significativa entre el PSCS y los valores de PSA, PSR, PST y PSN. Para el PSG, la correlación fue negativa con el PSCS.

Cuadro 6. Coeficientes de correlación (r) entre los pesos secos de nódulos (PSN), raíces (PSR), aéreo (PSA) total (PST) a la floración y peso seco de granos (PSG) y se cien semillas (PSCS) a la cosecha de 25 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2008.

Observaciones	PSA	PSR	PST	PSN	PSG
PSR	0.765 **				
PST	0.990 **	0.840 **			
PSN	0.589 **	0.451 *	0.639 *		
PSG	0.385 ^{ns}	0.220 ^{ns}	0.368 ^{ns}	0.234 ^{ns}	
PSCS	0.142 ^{ns}	0.181 ^{ns}	0.155 ^{ns}	0.093 ^{ns}	-0.498 *

*, ** y ^{ns} Significativo ($P \leq 0.05$), altamente significativo ($P \leq 0.01$) y no significativo, respectivamente, según análisis de correlación de Pearson.

Los análisis de regresión lineal entre el PSN y las demás variables indican que a partir de un valor base, el aumento de estas variables (Y) se relaciona al aumento en la nodulación (X) de manera significativa. (Cuadro 7), lo que sugiere la interdependencia de la nodulación con el crecimiento de las diferentes partes de las plantas.

Cuadro 7. Ecuaciones de regresión lineal entre las relaciones del peso seco de nódulos (PSN) con raíces (PSR), aéreo (PSA) y total (PST) de 25 genotipos de frijol común crecidos bajo tratamientos con *Rhizobium* y nitrógeno. Zamorano, Honduras, 2008.

Relaciones	Ecuación
PSN- PSR	$Y = 0.512 + 0.108 X$ **
PSN- PSA	$Y = 2.045 + 0.589 X$ **
PSN- PST	$Y = 2.558 + 0.797 X$ **
PSN- PSG	$Y = 7.073 + 0.616 X$ **
PSN- PSCS	$Y = 47.378 + 0.663 X$ *

CONCLUSIONES

- Se presentó una respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium* en frijol común, la cual varió de acuerdo al genotipo y el tratamiento.
- La expresión de la respuesta a la inoculación se incrementó en condiciones deficientes de nitrógeno en el medio de crecimiento.
- No se pudo separar el efecto de cada cepa específica, debido a que el inóculo usado estaba compuesto por una mezcla de dos cepas de *Rhizobium*.
- Los genotipos que se comportaron mejor de acuerdo a las variables analizadas fueron Cincuentaño, G21212 y Carioca.
- Los genotipos Morales, Victoria y Don Cristóbal, presentaron un alto peso de grano a pesar de no presentar una buena nodulación.

RECOMENDACIONES

- En próximos estudios asegurarse de una pasteurización correcta del medio para reducir la contaminación con cepas nativas, cuando se desee estimar el efecto de las cepas usadas en el inóculo en ausencia de éstas. Si se desea evaluar la competitividad potencial de cepas y genotipos, que se presentan en condiciones de campo, entonces no es necesaria una pasteurización absoluta del medio.
- Inocular los genotipos seleccionados con cada cepa por separado, para conocer los efectos específicos en las interacciones genotipo \times cepa.
- Continuar los estudios con los genotipos identificados como eficientes en la nodulación para su posible validación en actividades con agricultores. En estos estudios, se debe incluir aquellos genotipos que resultaron ser eficientes en la utilización de nitrógeno que no pudo atribuirse a la nodulación. Utilizarlos en estudios dirigidos a la selección de plantas capaces de alcanzar niveles eficientes de producción en suelos pobres en materia orgánica o en sistemas con pocos aportes de nitrógeno inorgánico.
- Realizar experimentos similares a nivel de campo utilizando los genotipos eficientes en nodulación y/o buen crecimiento en condiciones de bajo nitrógeno, para seleccionar aquellos con eficiencia general bajo estas condiciones.
- Emplear genotipos que presentan buena nodulación y/o buen crecimiento de raíces y parte aérea de las plantas en recombinaciones genéticas por hibridación para desarrollar aquellos que podrían ser más tolerantes a la deficiencia de nitrógeno en los suelos.

LITERATURA CITADA

- Analytical Software Statistix[®] 8.1 User's Manual. 2003. Analytical Software[®]. 396 p.
- Broughton, W. y Dillworth, G. 1970. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 1080 p.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2007. Mapeo de las Cadenas Agroalimentarias de Maíz Blanco y Frijol en Centroamérica. Managua, Nicaragua. 132 p.
- López, I. 2005. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. 16 p.
- Martin, A. 1984. Biological Nitrogen Fixation. Division of Plenum Publishing Corporation. Cornell University. 247 p.
- Martinez, E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.aginternetwork.net/whalecomwww.springerlink.com>. pdf. Consultado: 30 jul. 2008.
- Menéndez, J. 1982. Evaluación en Guatemala de nueve cepas de *Rhizobium phaseoli*, seleccionadas para pruebas internacionales de fijación de nitrógeno atmosférico en frijol, probadas en la variedad ICTA-81. Tesis Ing. Agr. Universidad de San Carlos, Guatemala. 42 p.
- Morán, J. 1995. Producción de especies activadas de oxígeno en nódulos de leguminosas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Tesis Ph. D. Universidad de Zaragoza, España. Disponible en: http://www.cibernetia.com/tesis_es/ciencias_de_la_vida/botánica/fisiología_vegetal. pdf. Consultado: 27 sep. 2008.
- Mulongoy, K; Gueye M; Spencer DSC. 1990. Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF), held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, Nigeria. 488 p.

Rosas, J.C. 2003. El cultivo del frijol común en América Tropical. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 56 p.

Voysest, O. 2000. Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 195 p.

ANEXOS

Anexo 1: Resultados del análisis de medio y sustrato utilizado en los dos ensayos. Zamorano, Honduras. 2008.

Laboratorio		pH	%		mg/Kg (extractable)				
Muestra	M.O.		N Total	P	K	Ca	Mg	Na	
08-S-0774	Medio	6.62	1.24	0.06	17	316	1070	140	163
			Bajo	Bajo	Medio	Alto	Medio	Bajo	Normal
08-S-1564	Sustrato	6.91	1.41	0.07	150	304	1310	180	143
			2.00	0.20	13	150	1000	180	
	Rango Medio		4.00	0.50	30	280	2500	250	

Anexo 2: Prueba de gota para estimar la concentración de rizobios en el inóculo.

Para la prueba de gota, se usan platos Petri con medio ALM (agar-levadura-manitol) + Rojo Congo refrigerado por tres días y secados dos horas antes. Se divide cada plato en ocho secciones iguales en el fondo externo rotulado con la dilución a usarse (dos repeticiones por dilución) para un total de cuatro diluciones por plato. Se procede de la siguiente manera:

Se diluye 1.0 g de inoculante en 9 ml de agua destilada estéril para obtener la dilución de 1/10; y continuar las diluciones hasta lograr la dilución 1/10⁸.

Se siembra cada dilución en los platos Petri con pipetas Pasteur cortas y estériles.

Se deja reposar el plato hasta que el medio absorba el líquido y se procede a sellarlos, invertirlos e incubarlos a 30 °C x 24 horas.

Se cuentan las colonias de bacterias cuando se observa su crecimiento.

Considerando que una pipeta Pasteur tiene capacidad para 1.0 ml de agua y que su punta más fina permite la salida de 0.03 ml de agua por gota, se determina la cantidad de *Rhizobium* en el inoculante empleado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de células / ml} = \frac{\text{Tamaño de pipeta (ml)} \times \text{No. colonias} \times \text{Factor dilución}}{\text{Tamaño de gota (ml)}}$$

Anexo 3. Representación de la escala 1-9 para evaluar la nodulación por *Rhizobium* en la planta de frijol común.



Anexo 4. Representación de la escala 1-5 para evaluar vigor vegetativo en plantas de frijol común crecidas en bajo nitrógeno.

