

**Caracterización de la nodulación de un vivero
diferencial de frijol común (*Phaseolus vulgaris*
L.) con aislamientos y poblaciones residentes
de *Rhizobium* spp. de Honduras**

**Luis Daniel Daza Vélez
Andrés Sebastian Rosas Narváez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Caracterización de la nodulación de un vivero
diferencial de frijol común (*Phaseolus vulgaris*
L.) con aislamientos y poblaciones residentes
de *Rhizobium* spp. de Honduras**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Luis Daniel Daza Vélez
Andrés Sebastian Rosas Narváez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2017

Caracterización de la nodulación de un vivero diferencial de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con aislamientos y poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. de Honduras

**Luis Daniel Daza Vélez
Andrés Sebastian Rosas Narváez**

Resumen. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente importante de proteínas y cumple un rol fundamental en la seguridad alimentaria en Centro América. Los objetivos del estudio fueron caracterizar la nodulación de aislamientos y poblaciones residentes de *Rhizobium*, utilizando un vivero diferencial de 12 genotipos (seis Andinos y seis Mesoamericanos). Se caracterizaron 10 aislamientos de *Rhizobium* spp. de nódulos colectados en fincas de las regiones noroccidental y centro-oriental de Honduras. Los genotipos fueron sembrados en canaletas de PVC de 0.90 × 0.20 m con arena gruesa, ubicados en una casa malla de 5 × 3 m con microaspersión. En un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Las plantas se inocularon con los aislamientos de *Rhizobium* a los 3 y 5 días después de siembra (DDS) y se fertilizaron con una solución libre de nitrógeno a los 4, 6 y 8 DDS. A los 15 DDS, se cosecharon las raíces, se evaluó la nodulación utilizando una escala visual 1-9. Los aislamientos fueron identificados como cepas según el valor binario asignado a los genotipos diferenciales. Se consideró como reacción compatible a los valores de la escala de nodulación de 4 a 9 e incompatible a los de 1 a 3. Los aislamientos de La Zona y El Barro (región noroccidental) presentaron la mayor nodulación en los genotipos Andinos y Mesoamericanos. Las poblaciones residentes de *Rhizobium* presentaron variaciones en la nodulación con los genotipos diferenciales y se identificaron las cepas 63-63 en El Paraíso y El Pajarillo (región centro-oriental).

Palabras clave: Cepas, reacción compatible e incompatible, valores binarios.

Abstract. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important source of protein and plays a key role in food security in Central America. The objectives of the study were to characterize the nodulation of isolates and resident populations of *Rhizobium* spp. using a differential nursery of 12 genotypes (six Andean and six Mesoamerican). Ten isolates of *Rhizobium* were characterized from nodules collected on farms in the northwestern and central-eastern regions of Honduras. The genotypes were planted in PVC channels of 0.90 × 0.20 m with coarse sand and were located in a 5 × 3 m mesh house with micro sprinkler in randomized complete block design with four replications. Plants were inoculated with *Rhizobium* isolates at 3 and 5 days after planting (DAP) and fertilized with a nitrogen free solution at 4, 6 and 8 DAP. At 15 DAP, roots were harvested and was evaluated using a visual scale 1 – 9. The isolates were identified as strains nodulation according to the binary value assigned to differential genotypes. The values of the nodulation scale from 4 to 9 were considered incompatible and those from 1 to 3 compatible. The isolates from La Zona and El Barro (northwestern region) had the highest nodulation in the Andean and Mesoamerican genotypes. Resident populations of *Rhizobium* showed variations in nodulation with differential genotypes and were identified as strains 63-63 in El Paraíso and El Pajarillo (central-eastern region).

Key words: Binary values, compatible and incompatible reactions, strains

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	23
5. RECOMENDACIONES	24
6. LITERATURA CITADA.....	25

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Localidades productoras de frijol donde se hicieron las recolecciones de nódulos para los aislamientos de <i>Rhizobium</i> spp. Honduras, 2016- 2017.	3
2. Resultados de los análisis de suelo de las localidades de recolección de nódulos. Honduras, 2017.....	4
3. Valores binarios asignados a los genotipos del vivero diferencial de frijol para la caracterización de cepas de <i>Rhizobium</i> spp.	7
4. Ejemplo de la nodulación en genotipos del vivero diferencial de frijol para caracterizar aislamientos y poblaciones de <i>Rhizobium</i> spp. Zamorano, Honduras 2017.	8
5. Variaciones en la nodulación (1-9) de líneas de frijol de los viveros diferenciales debido a los aislamientos de <i>Rhizobium</i> spp. de 10 localidades. Zamorano, Honduras 2017.....	11
6. Efecto del genotipo en el número de nódulos de líneas de frijol en viveros diferenciales colectados de 10 localidades. Honduras, 2017.	12
7. Coeficientes de correlación de Pearson entre la nodulación (escala 1-9) y el número de nódulos evaluados en genotipos diferenciales inoculados con los aislamientos de <i>Rhizobium</i> spp. provenientes de 10 localidades. Honduras, 2017.....	13
8. Caracterización de aislamientos e identificación como cepas de <i>Rhizobium</i> spp. en nódulos colectados en 10 localidades de Honduras usando el vivero diferencial de frijol. Zamorano, 2017.....	14
9. Rendimiento (kg/ha) de genotipos de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental. Honduras, 2016-2017.....	16
10. Variaciones en la nodulación (escala 1-9) de líneas de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental donde se evaluaron las poblaciones residentes de <i>Rhizobium</i> spp. Honduras, 2016-2017.....	17
11. Biomasa aérea (g/planta) de líneas de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental donde se evaluaron las poblaciones residentes de <i>Rhizobium</i> spp. Honduras, 2016-2017.....	19
12. Identificación las cepas de las poblaciones residentes presentes en fincas de ocho localidades en la región noroccidental. Honduras, 2016-2017.....	21
13. Análisis de suelos de las localidades donde se obtuvieron los aislamientos y se evaluaron las poblaciones residentes de <i>Rhizobium</i> spp. Honduras, 2017.....	22

1. Ubicación geográfica de las localidades de recolección de nódulos para los aislamientos de <i>Rhizobium</i> spp. Honduras, 2016-2017.....	4
2. Escala de nodulación (1-9): 1= ausencia de nódulos, 3= < 10 nódulos pequeños (< 1 mm), 5= 10-20 nódulos pequeños-medianos (1-2 mm), 7= 20-30 nódulos medianos-grandes (2-3 mm), 9= > 30 nódulos grandes (> 3 mm).	7

1. INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo importante en la dieta de los pobladores de varios países de América y África por su alto contenido de proteína, fibra y minerales (Ulloa et al. 2011). Además de contribuir con la seguridad alimentaria, la producción de este grano tiene un impacto social por la generación de ingresos en comunidades rurales.

El nivel de producción del frijol en latinoamérica es relativamente bajo por diversos factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (suelos con baja fertilidad y climas adversos) que afectan el crecimiento y rendimiento del cultivo (Rancancoj 2013). Por otro lado, la mayor parte de la producción de este grano se concentra en parcelas de pequeños productores con limitaciones económicas, acceso a tecnologías y crédito (Rosas 2011).

Las leguminosas son cultivos que se pueden asociar en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, permitiendo mantener la sustentabilidad de los sistemas agrícolas, reducir costos de producción, disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados, pero por otro lado beneficiando las condiciones físico químicas del suelo (Paredes 2013). En el caso del frijol, por ser un cultivo de ciclo corto, la cantidad de nitrógeno que puede fijar es menor en comparación con otras leguminosas (Graham et al. 2003).

El nitrógeno es un elemento esencial en la composición de ácidos nucleicos, proteínas y diversos componentes celulares en las plantas. El nitrógeno atmosférico no puede ser absorbido por las plantas ya que no poseen el mecanismo de fijación biológica del nitrógeno (FBN), el cual consiste en reducir el nitrógeno atmosférico hasta una forma que puede ser asimilado por las plantas (Mayz Figueroa 2004). Usualmente este mecanismo está presente en microorganismos como bacterias y actinomicetos.

Las bacterias del género *Rhizobium* spp. son Gram negativas, se encuentran de forma natural en el suelo alimentándose de materia orgánica en descomposición (saprófitas), se mueven mediante flagelos y son capaces de inducir la formación de nódulos en leguminosas para la FBN y se clasifican por su grado de especificidad hacia una determinada leguminosa (Acuña 1996; Paredes 2013).

Existen factores bióticos y abióticos que influyen en el proceso de nodulación y FBN como la presencia de bacterias nativas, el antagonismo microbiano, temperatura, pH, humedad, acidez y nutrientes en el suelo como nitrógeno, fósforo, calcio y molibdeno (Arroyo et al. 1994; Hormazábal 2013).

El vivero diferencial para caracterizar aislamientos de *Rhizobium* spp. es un conjunto de 12 genotipos (seis andinos y seis mesoamericanos) que se destacaron en una investigación previa en su capacidad de nodulación (Racancoj et al. 2014).

La FBN constituye una opción viable para ser implementada en parcelas de pequeños productores; sin embargo, es necesario caracterizar cepas residentes e identificar su capacidad de nodulación y FBN para obtener el máximo beneficio de esta simbiosis.

Con los resultados obtenidos se espera seleccionar cepas eficientes adaptadas a nichos agroecológicos y sistemas de producción específicos, para su uso como inoculante en diferentes zonas productoras de frijol con suelos y manejo deficiente de nitrógeno, y para mejorar los rendimientos del cultivo y reducir el costo de producción.

En este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar aislamientos de *Rhizobium* spp. de nódulos colectados en fincas de 10 localidades productoras de frijol de Honduras utilizando el vivero de genotipos diferenciales de frijol común.
- Caracterizar las poblaciones de *Rhizobium* spp. en fincas de pequeños productores de frijol de Honduras utilizando el vivero diferencial.

2. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos del estudio se condujeron dos ensayos que se describen a continuación:

Ensayo 1: Caracterización de 10 aislamientos de *Rhizobium* spp. con el vivero diferencial de genotipos de frijol

Ubicación del estudio. Se colectaron nódulos en 14 localidades productoras de frijol del noroccidente y centro-oriente de Honduras (Cuadro 1; Figura. 1); pero sólo se lograron obtener aislamientos de 10 localidades ya que en cuatro de ellas los nódulos se encontraban contaminados con otros microorganismos o no estaban activos. Para la recolección se identificaron plantas de buen vigor sin síntomas de deficiencia de nitrógeno y presencia de abundantes nódulos y de buen tamaño. Para el traslado al laboratorio, los nódulos se conservaron en viales con algodón y silica gel; en el laboratorio se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

En las localidades se recolectaron muestras de suelo para ser analizadas en el laboratorio de suelos. Los análisis indicaron que la mayoría de localidades tienen bajos contenidos de nitrógeno total y fósforo (Cuadro 2).

Cuadro 1. Localidades productoras de frijol donde se hicieron las recolecciones de nódulos para los aislamientos de *Rhizobium* spp. Honduras, 2016- 2017.

Muestra	Localidad	Departamento
1	El Pajarillo, Cantarrana	Francisco Morazán
2	El Barro, Concepción Sur	Santa Bárbara
3	La Zona, Concepción Sur	Santa Bárbara
4	La Cancha, Nueva Esperanza	Santa Bárbara
5	La Isla, Concepción Sur	Santa Bárbara
6	La Seca, Zacapa	Santa Bárbara
7	Laguna Seca, San José	Comayagua
8	El Paraíso, Concepción Sur	El Paraíso
9	Cuyalí, El Paraíso	El Paraíso
10	El Pescadero, Danlí	El Paraíso
11	Araulí, Danlí	El Paraíso
12	El Arenal, Danlí	El Paraíso
13	Jacaleapa, Danlí	El Paraíso
14	Río Azul, Potrerillos	El Paraíso



Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de recolección de nódulos para los aislamientos de *Rhizobium* spp. Honduras, 2016-2017.

Cuadro 2. Resultados de los análisis de suelo de las localidades de recolección de nódulos. Honduras, 2017.

Localidades	pH (H ₂ O)	g/100g		mg/kg (extractable)			
		M.O.	N total	P	K	Ca	Mg
1 El Barro, Concepción Sur	5.68	2.54	0.13	40	347	1,375	292
2 La Zona, Concepción Sur	6.09	4.61	0.23	55	160	3,932	305
3 La Cancha, Nueva Esperanza	4.71	5.80	0.29	1	139	1,034	218
4 La Isla, Concepción Sur	5.02	17.3	0.87	54	72	5,849	160
5 La Seca, Zacapa	4.17	15.0	0.75	13	164	1,556	154
6 Laguna Seca, Comayagua	6.26	7.76	0.39	1	117	5,728	216
7 El Paraíso, Concepción Sur	5.09	3.89	0.19	6	137	1,018	162
8 Cuyalí, El Paraíso	5.96	1.88	0.09	13	133	2,558	949
9 El Pescadero, Danlí	6.35	2.53	0.13	6	295	5,376	1,194
10 Araulí, Danlí	5.81	3.51	0.18	5	506	4,799	1,542
11 El Arenal, Danlí	5.40	2.64	0.13	18	129	1,165	202
12 Jacaleapa, Danlí	6.23	2.20	0.11	10	152	1,438	191
13 Rio Azul, Potrerillos	5.69	5.76	0.29	18	153	1,176	209
Rango Medio		2.00	0.20	13	Por: Saturación de bases		
		4.00	0.50	30			

Procedimiento para el aislamiento de *Rhizobium* spp. en el laboratorio

Los aislamientos de *Rhizobium* spp. se realizaron usando el método descrito por Somasegaran y Hoben (1994), que se detalla a continuación:

Se seleccionaron los mejores nódulos de la muestra que fueron colectados en las localidades y se rehidrataron durante 30 minutos para posteriormente ser lavados y retirar cualquier residuo de suelo. Luego se sumergieron los nódulos en alcohol al 95% por 5 a 10 segundos para romper la tensión superficial y remover las bolsas de aire del tejido. Continuando con la desinfección, se transfirieron los nódulos a una solución de hipoclorito de sodio al 3% (v/v) por 2 a 4 minutos para esterilizar los nódulos.

Después se enjuagaron los nódulos cinco veces en agua estéril y se añadió una gota de agua destilada para posteriormente macerarlos con una pinza estéril. El extracto obtenido se sembró con un asa de inoculación en platos Petri en un medio de agar-levadura-manitol (ALM) con indicador rojo congo.

Una vez que el cultivo se desarrolla se realiza un sub-cultivo en otro plato Petri con ALM + indicador para la producción de colonias individuales, tomando una porción del crecimiento bacteriano con un asa y rayando en el nuevo plato Petri en forma de estriado, para así reducir la concentración de bacterias en el medio de cultivo, y obtener la proliferación de colonias individuales.

Una vez crecidas las colonias individuales, se procede al cultivo de las mismas en platos petri con ALM+ indicador mediante un rayado en zigzag, sucesivamente se va purificando las cepas. Los implementos utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave a una temperatura de 121 °C y a 15 PSI durante 20 min. El procedimiento del aislamiento del *Rhizobium* spp. se ejecutó en la cámara de flujo laminar donde se usó un mechero y etanol al 95% para el flameo y desinfección de las herramientas.

Procedimiento para la producción de inóculo líquido de los aislamientos de *Rhizobium* spp. en el laboratorio. El inóculo líquido se obtuvo a partir del aislamiento de colonias individuales de *Rhizobium* spp. Se preparó una solución con 6.95 g de levadura-manitol (LM) y 250 ml de agua destilada. Se vertió el contenido en los erlenmeyer y se esterilizó en el autoclave por 20 min a 121 °C. Cada erlenmeyer con su correspondiente inóculo de cada aislamiento, fue colocado en el agitador orbital Modelo Orbit Shaker 3220 (fabricado por Lab-Line Instruments Inc., Estados Unidos, durante cuatro días a una velocidad de 700 rpm para propiciar el crecimiento bacteriano. El crecimiento de las bacterias en el inoculante líquido se diferenció por la turbidez del líquido y el olor a levadura.

Procedimiento para la pre-germinación de las semillas en el laboratorio. Para la desinfección de semilla los 12 genotipos se colocaron cada uno en un Erlenmeyer y se añadió cloro al 95% por 30 seg, después se hicieron tres lavados con agua destilada y finalmente se los dejó en agua unos minutos hasta que la semilla se hinche por la absorción de agua para después pasarlas a los platos Petri conteniendo una solución de agar-agua. Este procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar la cual se desinfectó previamente con alcohol al 95% mientras que los platos Petri se dejaron en la cámara de incubación Modelo Thermolyne (fabricada por Cole Parmer Instrument Company, Estados Unidos, a

temperatura ambiente durante tres días. Todas las herramientas se esterilizaron en el autoclave Modelo STM-EL (fabricada por CVS industries, Estados Unidos) a 121 °C a 15 PSI por 20 min.

Manejo del ensayo en casa de malla

Material experimental. El vivero de genotipos diferenciales compuesto por seis andinos (ICA Quimbaya, Montcalm, Ervilha, Mantega, CAL 143,G06727) y seis mesoamericanos (Macuzalito, G21212, Bribri,Tío Canela 75,Carioca, Dorado). Este vivero diferencial fue utilizado para determinar la respuesta a la inoculación con los aislamientos de nódulos colectados en zonas productoras de frijol común.

Las evaluaciones de los aislamientos de *Rhizobium* spp. se realizaron en una casa malla de 5 × 3 m, previo lavado y desinfección de las paredes, techo y mesas plásticas con 20 L de solución con 1.5 L de cloro comercial y 18.5 L de agua. Para la siembra de semillas se utilizaron canaletas de PVC de 0.90 × 0.20 m lavadas previamente con una solución de 200g de detergente en 20 L de agua y desinfectadas con una solución con 1 L de cloro al 5% disuelto en un tanque de 200 L de agua durante 2 horas.

El sustrato empleado fue arena gruesa esterilizada en autoclave a 121 °C y 15 PSI durante 25 min, a razón de 5 kg por canaleta. En cada canaleta se sembraron los 12 genotipos diferenciales y se usaron cuatro repeticiones (canaletas) para la evaluación de cada uno de los 10 aislamientos. El sustrato se humedeció 10 min antes de la siembra y se sembraron semillas pre germinadas a una distancia de 7 cm con su respectiva identificación.

La inoculación de las plantas con los aislamientos se realizó a los 3 y 5 días después de siembra (DDS), aplicando 1 mL (1×10^5 UFC/mL) de inóculo líquido por planta con una micropipeta. Las inoculaciones se realizaron en horas frescas del día para evitar afectar al crecimiento de las bacterias. A los 4, 6 y 8 DDS se fertilizó cada planta con 50 mL (600 mL por canaleta) de solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dillworth 1970). El riego con un sistema de microaspersión se aplicó durante el día (7 am a 5 pm) cada 30 min durante 30 seg evitando la aplicación de un exceso de agua a las plantas.

Las plantas de los genotipos diferenciales se cosecharon a los 15 DDS, para lo cual se humedeció el sustrato de arena gruesa y se cortó la parte aérea de la planta, dejando 2-3 cm de tallo sobre la raíz. Las raíces se retiraron del sustrato con cuidado y se colocaron en una bolsa de plástico de 26 × 20 cm con su respectiva etiqueta y se almacenaron a 4 °C para la posterior evaluación de la nodulación en el laboratorio.

Evaluación de la nodulación. La capacidad de nodulación se determinó con una escala visual de nodulación, teniendo en cuenta el número y tamaño de nódulos en la raíz elaborada por Rosas (2015), del 1 a 9 (1= ausencia de nódulos; 9 = > 30 nódulos grandes y > 3 mm) (Fig. 2). Según la evaluación de la nodulación, se considera una reacción incompatible cuando los valores de la escala de nodulación son de 1-3 y una reacción compatible cuando los valores son de 4-9.



Figura 2. Escala de nodulación (1-9): 1= ausencia de nódulos, 3= < 10 nódulos pequeños (< 1 mm), 5= 10-20 nódulos pequeños-medianos (1-2 mm), 7= 20-30 nódulos medianos-grandes (2-3 mm), 9= > 30 nódulos grandes (> 3 mm).

Caracterización de los aislamientos y su identificación como cepas de *Rhizobium* spp.

Para la caracterización de los aislamientos como cepas de *Rhizobium*, se utilizó la metodología del vivero de diferenciales de cepas de *Rhizobium* desarrollado y validado por (Racancoj et al. 2014). Este vivero diferencial emplea un sistema binario de nomenclatura. La identificación de las cepas resulta de los valores binarios obtenidos de la respuesta de los genotipos diferenciales cuando son inoculados con los aislamientos, cada genotipo diferencial tiene asignado un valor binario (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores binarios asignados a los genotipos del vivero diferencial de frijol para la caracterización de cepas de *Rhizobium* spp.

Valor Binario	Genotipos diferenciales	
	Andinos	Mesoamericanos
1	ICA Quimbaya	Macuzalito
2	Montcalm	G21212
4	Ervilha	Bribri
8	Mantega	Tío Canela 75
16	CAL 143	Carioca
32	G06727	Dorado

Para la identificación de un aislamiento como cepa de *Rhizobium* spp. se suman los valores binarios de los genotipos evaluados como compatibles, (4-9 de la escala) es decir una reacción positiva (+) con el aislamiento de *Rhizobium* spp. En contraste los genotipos con una reacción incompatible (1-3 de la escala) o negativa (-) con el aislamiento de *Rhizobium* spp. Por lo tanto, no se toman en cuenta en la sumatoria.

La mayor compatibilidad de una cepa se expresa en términos de reacción entre los genotipos evaluados y el aislamiento, cuando su valor binario es 63-63 (Cuadro 4); es decir cuando el aislamiento nodula de manera efectiva a todos los genotipos diferenciales.

Cuadro 4. Ejemplo de la nodulación en genotipos del vivero diferencial de frijol para caracterizar aislamientos y poblaciones de *Rhizobium* spp. Zamorano, Honduras 2017.

Genotipos	Valor binario	Aislamientos			
		W	X	Y	Z
Andinos					
ICA Quimbaya	1	+	+	-	-
Montcalm	2	+	+	-	-
Ervilha	4	+	+	-	-
Mantega	8	+	+	-	-
CAL 143	16	+	+	-	-
G06727	32	+	+	-	-
Mesoamericanos					
Macuzalito	1	+	-	+	-
G21212	2	+	-	+	-
Bribri	4	+	-	+	-
Tío Canela 75	8	+	-	+	-
Carioca	16	+	-	+	-
Dorado	32	+	-	+	-
Cepa		63-63	63-0	0-63	0-0

Ensayo 2: Caracterización de poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. en fincas de productores de frijol con el vivero diferencial

El estudio se realizó en las localidades El Pajarillo, El Barro, La Zona, La Cancha, La Isla, La Seca, Laguna Seca y El Paraíso, ubicadas en la región noroccidental de Honduras. Se sembraron dos repeticiones de los viveros diferenciales, utilizando un surco de 5 m de largo por genotipo, y a una distancia entre surcos de 0.7 m y entre plantas de 0.1 m (50 plantas/surco).

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, el área experimental fue fertilizada con 100 kg de 18-46-0 (DAP) a la siembra. Previo a la siembra de los ensayos se tomaron muestras de suelo para ser analizadas. Así mismo, se monitoreó la influencia de factores bióticos y abióticos que pudieran afectar el experimento.

En la etapa de prefloración se cosecharon cinco plantas por parcela. El follaje se dejó secar al aire libre por dos días para posteriormente ser secado en estufa a 70°C × 48 horas para determinar el peso seco del follaje. La extracción de raíces se realizó con cuidado evitando la pérdida de raíces y nódulos, para de inmediato ser lavadas con agua y detergente. Se

procedió a evaluar visualmente la nodulación usando la escala de 1-9, donde 1= ausencia de nódulos y 9= >30 nódulos grandes (Fig. 2). En la etapa de madurez de cosecha, se cosecharon 10 plantas para estimar rendimiento de grano en kg/ha ajustado al 14% de humedad considerando una densidad de 142,857 plantas por ha.

Diseño experimental. Se usó un diseño de bloques completos al azar (BCA), con cuatro repeticiones

Análisis estadístico. El análisis de varianza (ANDEVA) se realizó para determinar la significancia del modelo y la separación de medias por el método de diferencia mínima significativa (DMS) con base en una probabilidad de $P \leq 0.05$ para evidenciar las diferencias entre tratamientos. Los datos recolectados fueron analizados con el programa estadístico “Statistix 8.1®”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1: Caracterización de aislamientos de *Rhizobium* spp. con el vivero diferencial de genotipos de frijol

Según la escala de nodulación 1-9, se encontraron diferencias significativas en la nodulación de los genotipos diferenciales en seis de los 10 aislamientos de nódulos, indicando las diferencias entre aislamientos provenientes de nódulos de plantas noduladas por poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. de diferentes localidades con condiciones de clima, suelo y manejo del cultivo diversas (Cuadro 5). Además de las condiciones diversas donde viven estas poblaciones residentes, la efectividad de los aislamientos depende de sus características propias para interactuar con las plantas hospederas de los genotipos diferenciales y producir una buena nodulación y fijación de nitrógeno (Díaz 2010; Paredes 2013).

En relación a los genotipos del reservorio andino destacan Ervilha, Mantega y G06727 que presentaron nodulación efectiva en las localidades a excepción de G06727 en El Pescadero, Mantega en La Isla y Cuyalí y Ervilha en Jacaleapa y El Pescadero con un promedio de nodulación entre 4-6 lo que indica que los aislamientos pueden formar nódulos con los genotipos evaluados de forma eficiente. En contraste en los genotipos mesoamericanos la interacción con la mayoría de los genotipos con el aislamiento fue incompatible mientras que destaca el genotipo Bribri que presentó una nodulación de 4 (Cuadro 5). Lo que demuestra que la interacción *Rhizobium*-hospedero tiene un alta grado de especificidad (Ramírez et al. 2016).

En relación al número de nódulos/planta se encontraron diferencias significativas entre los genotipos diferenciales inoculados con aislamientos de todas las localidades (Cuadro 6). Se presentaron variaciones en el número de nódulos de <10 hasta 100/planta, dependiendo del genotipo y el aislamiento, sugiriendo una interacción genotipo- aislamiento bastante variable. En promedio de los aislamientos de las 10 localidades, el genotipo Ervilha presentó el mayor número de nódulos (77/planta), y el menor fue Montcalm (21/planta).

En los genotipos andinos destacan Ervilha, Mantega y G06727 con un promedio de número de nódulos entre 49-77 en contraste la nodulación de los genotipos mesoamericanos fue menor encontrándose en un rango de 27-39. Este aspecto es importante ya que el número de nódulos tiene correlación con la nodulación influyendo por consiguiente en la compatibilidad de genotipos e aislamientos (Cuadro 6). Los datos de la nodulación (escala 1-9) estuvieron correlacionados positivamente al número de nódulos con los aislamientos de nueve de las 10 localidades (Cuadro 7).

Cuadro 5. Variaciones en la nodulación (1-9) de líneas de frijol de los viveros diferenciales debido a los aislamientos de *Rhizobium* spp. de 10 localidades. Zamorano, Honduras 2017.

Genotipos	Región										Promedio
	Noroccidental			Centro-oriental							
	La Isla	La Zona	El Barro	El Paraíso	El Arenal	Cuyalí	Jacaleapa	El Pescadero	Araulí	Río Azul	
Andinos											
ICA Quimbaya	2	3	5	3	3	4	3	3	4	4	3
Montcalm	2	2	3	2	2	2	2	2	5	2	2
Ervilha	5	4	5	5	5	4	3	2	6	4	4
Mantega	3	6	6	4	6	3	5	4	5	5	5
CAL 143	2	4	4	2	3	2	4	2	6	3	3
G06727	7	7	7	7	8	9	4	3	7	4	6
Mesoamericanos											
Macuzalito	3	4	3	3	4	2	3	3	3	2	3
G21212	2	5	2	4	4	3	2	3	3	3	3
Bribri	2	4	7	3	3	4	4	3	5	3	4
Tío Canela 75	3	5	6	3	3	3	3	5	3	2	3
Carioca	2	3	6	3	3	3	3	3	2	3	3
Dorado	4	4	3	4	3	3	5	4	3	3	3
Promedio	3	4	5	3	4	3	3	3	4	3	
CV (%)	36	52	31	57.6	31.8	29.6	41.6	40.8	39.1	30.2	
DMS (0.05)	0.8**	1.5 ^{n.s}	1**	1.4 ^{n.s}	0.8**	0.7**	0.9 ^{n.s}	0.8 ^{n.s}	1.2**	0.7**	

CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa: no significativo; significativo al $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

Cuadro 6. Efecto del genotipo en el número de nódulos de líneas de frijol en viveros diferenciales colectados de 10 localidades. Honduras, 2017.

Genotipos	Región										Promedio
	Noroccidental			Centro-oriental							
	La Isla	La Zona	El Barro	El Paraíso	El Arenal	Cuyalí	Jacaleapa	El Pescadero	Araulí	Río Azul	
Andinos											
ICA Quimbaya	30	46	43	20	17	36	37	23	38	33	32
Montcalm	28	28	42	9	1	5	23	8	40	24	21
Ervilha	80	37	64	32	51	40	45	32	61	51	49
Mantega	60	58	63	61	73	26	60	57	53	70	58
CAL 143	50	68	42	20	36	22	69	37	81	43	47
G06727	95	77	79	82	93	91	57	44	99	55	77
Mesoamericanos											
Macuzalito	22	31	40	31	38	17	26	22	27	17	27
G21212	22	48	34	46	54	33	31	36	47	38	39
Bribri	27	47	42	45	37	33	30	37	45	38	38
Tío Canela 75	38	34	36	31	45	32	40	39	32	18	34
Carioca	30	32	33	43	37	33	32	33	36	38	35
Dorado	40	30	29	41	42	27	37	45	26	26	34
Promedio	43	45	45	38	43	33	41	34	49	38	
CV (%)	28	40	35	49	34	52	47	50	35	51	
DMS (0.05)	9**	13**	11**	13**	11**	12**	13*	12*	12**	14*	

CV: Coeficiente de Variación; DMS: Diferencia mínima significativa: no significativo; significativo al $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre la nodulación (escala 1-9) y el número de nódulos evaluados en genotipos diferenciales inoculados con los aislamientos de *Rhizobium* spp. provenientes de 10 localidades. Honduras, 2017.

Localidades	Coeficientes de correlación de nodulación y N° Nódulos
El Arenal	0.85 **
Cuyalí	0.90 **
Jacaleapa	0.58 *
El Pescadero	0.10
Araulí	0.81 **
Río Azul	0.73 **
EL Barro	0.56 *
LA Zona	0.60 *
La Isla	0.73 **
El Paraiso	0.59 *

Probabilidad: (**) >0.68, (*) >0.55

La evaluación de la respuesta de la nodulación con los genotipos diferenciales permitió la caracterización de los aislamientos de las 10 localidades de dónde se colectaron los nódulos. Con base en la sumatoria de los valores binarios asignados a los genotipos diferenciales que presentaron reacciones compatibles al ser inoculados con los aislamientos, se determinaron las razas correspondientes cuyos valores variaron desde la cepa 8-40 hasta la 61-28 (Cuadro 8). Los aislamientos de cada localidad fueron caracterizados como cepas diferentes, sugiriendo la gran diversidad genética presente a pesar de ser la muestra del estudio una pequeña en relación a la diversidad de condiciones y ambientes en los que se cultiva el frijol en Honduras (Lloret y Martínez 2005). Los aislamientos de La Zona y El Barro resultaron ser las cepas de mayor valor binario, es decir las que nodularon mejor a la mayoría de los genotipos diferenciales.

Cuadro 8. Caracterización de aislamientos e identificación como cepas de *Rhizobium* spp. en nódulos colectados en 10 localidades de Honduras usando el vivero diferencial de frijol. Zamorano, 2017.

Genotipos	Valor binario	Región									
		Noroccidental			Centro-oriental						
		La Isla	La Zona	El Barro	El Paraíso	El Arenal	Cuyalí	Jacaleapa	El Pescadero	Araulí	Río Azul
<u>Andinos</u>											
ICA Quimbaya	1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Montcalm	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ervilha	4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Mantega	8	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CAL 143	16	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
G06727	32	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<u>Mesoamericanos</u>											
Macuzalito	1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
G21212	2	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Bribri	4	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Tío Canela 75	8	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Carioca	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dorado	32	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Cepa		36-32	60-47	61-28	44-34	44-3	37-4	56-36	8-40	63-4	45-0

Reacción incompatible (-): 1-3 en escala de nodulación; reacción compatible (+): 4-9 en escala de nodulación.

Ensayo 2: Caracterización de poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. en fincas de productores de frijol con el vivero diferencial

Los rendimientos de los genotipos diferenciales sembrados en siete localidades de la región noroccidental, no presentaron diferencias significativas en ninguna de las localidades (Cuadro 9). Los mayores rendimientos se encontraron en las localidades de El Pajarillo, El Barro y La Seca (región noroccidental). Por otro lado, los genotipos con mayor rendimiento a través de las localidades fueron G21212 y Carioca.

Al evaluar la nodulación en los genotipos diferenciales en ocho localidades con la escala de nodulación, no se encontraron diferencias significativas dentro de las localidades con la excepción de Laguna Seca (Cuadro 10). Sin embargo, los promedios de nodulación variaron desde 3 hasta 9 de la escala, sugiriendo respuestas de nodulación similares en las poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. de cada localidad. Los promedios más altos de nodulación (>7) se observaron en las localidades de El Pajarillo, La Zona (región noroccidental) y El Paraíso (región centro-oriental).

Cuadro 9. Rendimiento (kg/ha) de genotipos de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental. Honduras, 2016-2017.

Genotipos	El Pajarillo	El Barro	La Zona	La Cancha	La Isla	La Seca	El Paraíso	Promedio
Andinos								
ICA Quimbaya	1,044	1,508	164	390	572	988	507	739
Montcalm	1,027	1,460	93	350	187	711	314	592
Ervilha	1,183	1,798	229	532	552	840	589	817
Mantega	877	2,139	207	271	506	1,513	334	835
CAL 143	1,086	1,924	196	311	233	1,159	514	775
G06727	679	786	221	333	281	1,111	664	582
Mesoamericanos								
Macuzalito	823	2,257	200	386	496	1,520	363	863
G21212	1,636	3,714	264	397	1,192	1,845	654	1,386
Bribri	1,022	2,143	229	332	657	1,547	507	919
Tío Canela 75	1,045	2,010	229	422	558	1,721	804	969
Carioca	1,428	3,512	321	243	835	1,653	445	1,205
Dorado	1,437	1,314	257	447	321	1,308	617	814
Promedio	1,107	2,047	218	368	532	1,326	526	
CV (%)	22	42	41	21	64	24	27	
DMS (0.05)	243 ^{n.s}	865 ^{n.s}	89 ^{n.s}	78 ^{n.s}	344 ^{n.s}	316 ^{n.s}	144 ^{n.s}	

CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativas: no significativo, significativo al $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

Cuadro 10. Variaciones en la nodulación (escala 1-9) de líneas de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental donde se evaluaron las poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. Honduras, 2016-2017.

Genotipos	El Pajarillo	El Barro	La Zona	La Cancha	La Isla	La Seca	Laguna Seca	El Paraíso	Promedio
Andinos									
ICA Quimbaya	5	4	8	3	3	3	8	7	6
Montcalm	7	5	6	3	3	3	8	5	5
Ervilha	8	4	8	3	3	3	7	6	5
Mantega	8	8	9	3	3	3	7	9	7
CAL 143	6	5	9	3	3	3	7	7	6
G06727	9	9	9	3	3	3	8	8	7
Mesoamericanos									
Macuzalito	6	7	6	3	6	3	5	5	6
G21212	8	9	9	3	3	3	4	7	7
Bribri	5	6	6	3	3	3	5	7	5
Tío Canela 75	5	6	8	3	3	3	4	7	6
Carioca	8	7	8	3	3	3	7	9	7
Dorado	4	7	6	3	3	3	3	8	6
Promedio	7	6	8	3	3	3	6	7	6
CV (%)	33	29	15	N.A	32	N.A	25	18	22
DMS _(0.05)	2 ^{n.s}	2 ^{n.s}	1 ^s	N.A	1 ^{n.s}	N.A	2 [*]	1 ^{n.s}	1 [*]

N.A: no aplica; CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa: no significativo; significativo al $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

El peso seco del follaje o biomasa de los genotipos diferenciales dentro de las localidades fue significativo en las localidades de El Pajarillo (región centro-oriental) y La Seca (región noroccidental) (Cuadro 11). Los promedios más altos de biomasa se registraron con los diferenciales andinos ICA Quimbaya y Mantega; y el mejor de los mesoamericanos fue Tío Canela 75 dado que existe relación entre la nodulación y el crecimiento de varias partes de la planta (Vargas 2008).

Cuadro 11. Biomasa aérea (g/planta) de líneas de frijol del vivero diferencial en fincas de agricultores de la región noroccidental donde se evaluaron las poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. Honduras, 2016-2017.

Genotipo	El Pajarillo	El Barro	La Zona	La Cancha	La Isla	La Seca	Laguna Seca	El Paraíso	Promedio
Andinos									
ICA Quimbaya	40.2	16.1	6.0	8.4	22.0	16.7	7.2	31.1	18.8
Montcalm	32.1	24.5	5.5	11.0	13.0	12.5	4.4	12.6	13.9
Ervilha	49.0	17.0	6.1	9.6	17.0	18.1	5.4	19.4	14.9
Mantega	34.0	32.2	5.2	10.5	13.7	16.5	5.6	18.4	17.4
CAL 143	50.1	16.4	5.2	10.0	7.7	15.5	6.2	13.8	10.8
G06727	28.0	10.0	5.1	10.7	21.0	19.6	4.3	21.5	14.4
Mesoamericanos									
Macuzalito	22.6	11.7	4.0	11.0	10.8	20.2	5.6	15.6	10.5
G21212	44.7	22.7	4.5	13.5	10.1	29.9	10.5	18.2	13.9
Bribri	34.5	18.5	5.5	9.3	16.2	18.0	5.2	16.2	14.1
Tío Canela 75	31.2	18.0	6.9	12.7	16.7	24.5	5.4	16.6	14.6
Carioca	22.2	23.1	4.0	6.2	6.6	19.7	5.7	13.5	11.8
Dorado	33.5	14.2	6.0	9.2	9.5	24.5	5.0	19.8	12.4
Promedio	35.2	18.7	5.3	10.2	13.7	19.7	5.9	18.1	
CV (%)	16.3	34.0	30.3	18.6	38.7	14.7	34.9	42.0	
DMS _(0.05)	6 ^{**}	6 ^{n.s}	2 ^{n.s}	2 ^{n.s}	5 ^{n.s}	3 ^{**}	2 ^{n.s}	8 ^{n.s}	

CV: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa: no significativo; significativo al $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$.

Poblaciones residentes de Honduras evaluadas en campo Se caracterizaron las poblaciones residentes de *Rhizobium* de las ocho localidades donde se condujeron los ensayos con el vivero de genotipos diferenciales de frijol. En las localidades de El Barro, La Zona (región noroccidental) , El Paraíso y El Pajarillo (región centro- oriental) se obtuvo reacciones compatibles (+) con todos los genotipos diferenciales, por lo que las poblaciones residentes se caracterizaron con valor binario de cepas 63-63 (Cuadro 12). Por el contrario, las poblaciones de La Cancha, La Isla y La Seca (región noroccidental) no produjeron nodulaciones compatibles con los genotipos diferenciales indicando la presencia de poblaciones muy escasas o representadas por cepas inefectivas. En la localidad de la Isla pudiera deberse a los altos contenidos de materia orgánica y nitrógeno total que impiden o limitan la nodulación efectiva (Barrientos 1989; Villanueva y Quintana 2012) (Cuadro 13).

Cuadro 12. Identificación las cepas de las poblaciones residentes presentes en fincas de ocho localidades en la región noroccidental. Honduras, 2016-2017.

	Valor binario	El Pajarillo	El Barro	La Zona	La Cancha	La Isla	La Seca	Laguna Seca	El Paraíso
Andinos									
ICA Quimbaya	1	+	+	+	-	-	-	+	+
Montcalm	2	+	+	+	-	-	-	+	+
Ervilha	4	+	+	+	-	-	-	+	+
Mantega	8	+	+	+	-	-	-	+	+
CAL 143	16	+	+	+	-	-	-	+	+
G06727	32	+	+	+	-	-	-	+	+
Mesoamericanos									
Macuzalito	1	+	+	+	-	+	-	+	+
G21212	2	+	+	+	-	-	-	+	+
Bribri	4	+	+	+	-	-	-	+	+
Tío Canela	8	+	+	+	-	-	-	+	+
Carioca	16	+	+	+	-	-	-	+	+
Dorado	32	+	+	+	-	-	-	-	+
Cepa		63-63	63-63	63-63	0-0	0-1	0-0	63-31	63-63

Reacción incompatible (-): 1-3 en escala de nodulación; reacción compatible (+): 4-9 en escala de nodulación.

En los suelos analizados en la región noroccidental predominaban texturas franco arenoso (La Isla, La Seca), franco (Laguna seca) y franco arcillo arenoso (La Cancha y La Zona), con contenidos de materia orgánica altos. Cabe recalcar que la textura de estos suelos se determinó de forma manual.

Cuadro 13. Análisis de suelos de las localidades donde se obtuvieron los aislamientos y se evaluaron las poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. Honduras, 2017.

Localidades	pH (H ₂ O)	g/100g		mg/kg (extractable)			
		M.O.	N total	P	K	Ca	Mg
1 El Barro, Concepción Sur	5.68	2.54	0.13	40	347	1,375	292
2 La Zona, Concepción Sur	6.09	4.61	0.23	55	160	3,932	305
3 La Isla, Concepción Sur	5.02	17.3	0.87	54	72	5,849	160
4 El Paraíso, Concepción Sur	5.09	3.89	0.19	6	137	1,018	162
5 Cuyalí, El Paraíso	5.96	1.88	0.09	13	133	2,558	949
6 El Pescadero, Danlí	6.35	2.53	0.13	6	295	5,376	1,194
7 Araulí, Danlí	5.81	3.51	0.18	5	506	4,799	1,542
8 El Arenal, Danlí	5.40	2.64	0.13	18	129	1,165	202
9 Jacaleapa, Danlí	6.23	2.20	0.11	10	152	1,438	191
10 Río Azul, Potrerillos	5.69	5.76	0.29	18	153	1,176	209
Rango Medio		2.00	0.20	13	Por: Saturación de bases		
		4.00	0.50	30			

4. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron 10 aislamientos de *Rhizobium* spp. a partir de nódulos colectados en localidades productoras de frijol mediante la respuesta en nodulación de los genotipos del vivero de diferenciales, siendo los que presentaron nodulación superior los de El Barro (cepa 60-47) y La Zona (cepa 61-28) en la región noroccidental.
- Se caracterizaron poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. en fincas productoras de frijol de ocho localidades mediante la nodulación observada en los genotipos diferenciales, siendo las poblaciones residentes más efectivas caracterizadas como cepas 63-63 en El Pajarillo, El Paraíso (región centro-oriental), La Zona, y El Barro (región noroccidental).
- Los aislamientos presentaron una mejor nodulación en los genotipos andinos que en los mesoamericanos.

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar la caracterización de aislamientos de *Rhizobium* spp. mediante la recolección de nódulos de diferentes localidades productoras de frijol en Honduras, para obtener una muestra representativa e identificar mediante el vivero de genotipos diferenciales cepas compatibles que puedan posteriormente ser usadas como inoculantes comerciales. Debido a la variabilidad climática puede ser que las cepas que se usa actualmente ya no sean efectivas en el futuro.
- Utilizar el vivero diferencial para caracterizar las poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. en localidades productoras de frijol de Honduras, para realizar las recomendaciones de fertilización nitrogenada en donde las poblaciones residentes sean altamente efectivas, o el uso de inoculantes en donde las poblaciones sean poco efectivas.

6. LITERATURA CITADA

- Acuña O. 1996. Manejo y tecnología de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas de importancia agrícola. [Internet]. Universidad de Costa Rica; [consultado 2017 jul. 21]. http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_x/a50-2388-III_089.pdf.
- Arroyo F, Anguiano J, Ordaz J. 1994. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas forrajeras [Tesis]. Universidad de Guadalajara-México. 48 p.
- Barrientos L. 1989. Antecedentes de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas. [Internet]. Perú-Temuco:INIA; [consultado 2017 ago. 30]. <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR07140.pdf>.
- Broughton WJ, Dillworth MJ. 1970. Plant nutrient solutions: In Somasegaran P, Hoben HJ (editors). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Niftal Project, University of Hawaii (Hawaii). p. 245-249.
- Díaz C. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de rizobias autóctonas que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tesis]. Universidad de León-República Dominicana. 113 p.
- Graham PH, Rosas JC, Estévez de Jensen C, Peralta E, Tlustý B, Acosta-Gallegos JA. 2003. Addressing edaphic constraints to bean production: Bean/Cowpea CRSP perspective. Field Crops Research 82: 179-192.
- Hormazábal M. 2013. Evaluación de la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno de cepas silvestres de rizobios en simbiosis con tres variedades de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tesis]. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 36 p.
- Lloret L, Martínez E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Revista latinoamericana de microbiología. 47(1-2): 43 – 60.
- Mayz Figueroa J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. UDO Agrícola. 4(1):1-20.
- Paredes MC. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [Tesis]. Universidad Católica-Argentina. 105 p.
- Ramírez M, Peix Á, Velázquez E, Bedmar E. 2016. Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. Arbor 192(792):319-322.

- Rancancoj A. 2013. Desarrollo de un vivero diferencial para identificar interacciones de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium* [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 26 p.
- Racancoj A, Vargas AG, Rosas JC, Estevez de Jensen C, Beaver JS, Porch TG. 2014. Response of Andean and Mesoamerican common bean genotypes to inoculation with *Rhizobium* strains. Ann. Report. Bean Improv. Coop. 57:245-246.
- Rosas JC. 2011. Contribuciones del programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y El Caribe. CEIBA 52(1):65-73.
- Rosas JC. 2015. Escala ilustrada para evaluar la nodulación en frijol común. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, 1p.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook of rhizobia. Springer-Verlag Laboratory. New York, Berlin, Heidelberg.449 p.
- Statistix 8.1®. 2013. Data analysis software for researchers. User's Guide: Statistical. Florida (Estados Unidos).
- Ulloa J, Ramírez J, Ulloa B. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Centro de Tecnología de Alimentos: Universidad Autónoma de Nayarit-México; [Consultado 2017 jul. 2]. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>.
- Vargas A. 2008. Selección de genotipos de frijol común tolerantes a bajo contenido de nitrógeno en el suelo [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras .25 p.
- Villanueva E, Quintana A. 2012. Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. 32(1):24-103.