

**Caracterización de cepas de *Rhizobium*
utilizando un vivero de diferenciales de frijol
común**

**Maritza Anabelle Ortega Martínez
Macedonio Casavilca Carhuas**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Caracterización de cepas de *Rhizobium* utilizando un vivero de diferenciales de frijol común

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

Presentado por

Maritza Anabelle Ortega Martínez
Macedonio Casavilca Carhuas

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Caracterización de cepas de *Rhizobium* utilizando un vivero de diferenciales de frijol común

Maritza Anabelle Ortega Martínez
Macedonio Casavilca Carhuas

Resumen: El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es cultivado en zonas tropicales y templadas. Es un componente básico de la dieta tradicional en Centroamérica y una fuente importante de proteínas. Sus rendimientos son afectados por suelos con bajo contenido de nitrógeno que limita el crecimiento y potencial del cultivo. Se caracterizaron aislamientos de *Rhizobium* de nódulos colectados en fincas de 13 localidades de Honduras, mediante la evaluación de la nodulación utilizando un vivero de 12 genotipos diferenciales (seis andinos y seis mesoamericanos). Se usó un diseño de bloques completos al azar con 13 tratamientos (aislamientos) y 12 genotipos diferenciales con cuatro repeticiones. Los diferenciales fueron sembrados en canaletas de poli cloruro de vinilo (PVC) de 0.90 × 0.20 m conteniendo un sustrato de arena gruesa esterilizada en casa de malla con micro aspersión. Las plantas se inocularon con los aislamientos de *Rhizobium* a los 2 y 4 días después de la siembra (DDS) y se fertilizaron con una solución nutritiva libre de nitrógeno a los 3, 5, 7 y 9 DDS. A los 15 DDS, se cosecharon las raíces y la nodulación se evaluó utilizando una escala visual de nodulación temprana 1-9 (1= ausencia de nódulos; 9= > 30 nódulos grandes y > 3 mm). Los aislamientos fueron identificados como cepas según el valor binario asignado a los genotipos, se consideró como reacción compatible a los valores de la escala de nodulación de 4 a 9 y reacción incompatible a los valores de 1 a 3. Se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en nodulación por efecto de los aislamientos de *Rhizobium* (A), de los genotipos diferenciales (G) y la interacción A × G. Los aislamientos de El Ocotal y Pajarillo presentaron la mayor nodulación tanto en los genotipos andinos como en los mesoamericanos, siendo identificados como las cepas 58-63 y 61-63, respectivamente. La cepa 61-63 se comportó de manera similar a la cepa testigo CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

Palabras clave: Aislamientos, escala de nodulación, *Phaseolus vulgaris*, valor binario.

Abstract: The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is cultivated in tropical and temperate regions. It is a basic component of the traditional diet in Central America and an important source of protein. The yield of common bean is affected by low soil nitrogen content which limit the growth and potential of the crop. *Rhizobium* isolates from nodules collected in 13 locations in Honduras were evaluated using 12 bean differential genotypes (six Andean and six Middle American). A randomized complete blocks design with 13 treatments (isolates) and 12 differential genotypes with four replications were used in the study. Differential genotypes were planted in polyvinyl chloride (PVC) rain gutters of 0.90 × 0.20 m containing a substrate of sterilized thick sand in a mesh home with a micro spray system. Plants were inoculated with the *Rhizobium* isolates at 2 and 4 days after planting (DAP) and fertilized with a free nitrogen nutrient solution at 3, 5, 7 and 9 DAP. At 15 DAP, the roots were harvested and nodulation was assessed using a visual scale of early nodulation 1-9 (1= no nodules; 9= > 30 large nodules and > 3 mm). The isolates were identified as strains according to the binary value assigned to the genotypes, a compatible reaction considered nodulation values in the scale from 4 to 9 and an incompatible reaction, nodulation values in the scale from 1 to 3. Highly significant differences ($P \leq 0.01$) in nodulation were observed by effect of *Rhizobium* isolates (I), bean genotypes (G), and the interaction of I × G. Isolates from El Ocotal and Pajarillo had the highest nodulation both in Andean and Middle American genotypes and were characterized as the strains 58-63 and 61-63 respectively. The strain 61-63 behaved similarly to strain CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

Key words: Binary value, isolates, nodulation scale, *Phaseolus vulgaris*.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de Cuadros y Figuras	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	16
5. RECOMENDACIONES	17
6. LITERATURA CITADA.....	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Genotipos de frijol común que conforman el vivero de diferenciales para la caracterización de cepas de <i>Rhizobium</i> . Zamorano, Honduras, 2016.	4
2. Localidades de recolección de nódulos para los aislamientos en fincas de agricultores de frijol de Honduras, 2016.	4
3. Valores binarios asignados a los genotipos del vivero diferencial de frijol para la caracterización de cepas de <i>Rhizobium</i>	8
4. Genotipos diferenciales de frijol y valores binarios para la caracterización de la respuesta a la inoculación con aislamientos de <i>Rhizobium</i> mediante la variable de nodulación. Zamorano, Honduras, 2016.	9
5. Evaluación de la nodulación de genotipos diferenciales de frijol inoculados con aislamientos de <i>Rhizobium</i> de 13 localidades usando la escala visual 1-9. Zamorano, Honduras, 2016.	11
6. Caracterización de aislamientos e identificación como cepas de <i>Rhizobium</i> usando el vivero de diferenciales de frijol común. Zamorano, Honduras, 2016....	14
7. Aislamientos de <i>Rhizobium</i> de las localidades de El Ocotal y Pajarillo caracterizados como cepas mediante el vivero de diferenciales de 12 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2016.	15

Figuras	Página
1. Ubicación geográfica de las localidades de recolección de nódulos para los aislamientos. Honduras, 2016.....	5
2. Escala de nodulación temprana (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
3. Nodulación de los genotipos diferenciales andinos con los aislamientos de las localidades de El Ocotal y Pajarillo, y las cepas CIAT 899 (<i>Rhizobium tropici</i>) y 632 (<i>Rhizobium etli</i>). Reacción incompatible (1-3) y compatible (4-9). Zamorano, Honduras, 2016.....	12
4. Nodulación de los genotipos diferenciales mesoamericanos con los aislamientos de las localidades de El Ocotal y Pajarillo y las cepas CIAT 899 (<i>Rhizobium tropici</i>) y 632 (<i>Rhizobium etli</i>). Reacción incompatible (1-3) y compatible (4-9). Zamorano, Honduras, 2016.	13

1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es intensamente cultivado desde las zonas tropicales hasta las zonas templadas (Debouck e Hidalgo 1985). Esta leguminosa, es un componente básico de la dieta tradicional en Centroamérica y una fuente importante de proteínas. Sin embargo, los rendimientos de frijol se ven afectados debido a diversos factores que influyen en su productividad incluyendo la variación en el clima, el ataque de plagas y enfermedades y la siembra en suelos deficientes de nutrientes. La deficiencia de nitrógeno en el suelo, es una de las principales limitantes de la producción de frijol (Rosas y Bliss 1986; Bliss 1993).

Para un pequeño productor el acceso a un plan de fertilización con uso de agroquímicos nitrogenados es limitado por sus costos además es una práctica poco amigable con el medio ambiente. El manejo efectivo de microorganismos rizosféricos puede constituir un modelo agrícola, ecológico y económicamente viable para reducir la degradación del suelo e incrementar la productividad y valor nutritivo de las leguminosas disminuyendo el uso de fertilizantes convencionales (Bergersen *et al.* 1971; Nascimento *et al.* 2008). Mediante la asociación simbiótica con las leguminosas, la bacteria *Rhizobium* tiene la capacidad de formar nódulos fijando nitrógeno atmosférico haciéndolo disponible para la planta (Viteri *et al.* 1992).

Esta relación ocurre a través de una secuencia de estados de desarrollo que culminan en el establecimiento de una simbiosis efectiva cuyo proceso se denomina fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Mayz 1997). La FBN es afectada negativamente por la presencia de exceso de nitratos en los suelos (Herridge *et al.* 1994). Esta asociación se considera un sistema de baja eficiencia en FBN (Bliss 1993); sin embargo, algunos genotipos son capaces de fijar grandes cantidades de nitrógeno (Hardarson 1993).

La evaluación de la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium* es tan variable como la interacción existente entre la planta hospedera y el patógeno (Graham y Rosas 1977). Desde que el *Rhizobium* es un microorganismo benéfico, el estudio de las interacciones de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium* se realiza a través de un vivero de diferenciales con el fin de facilitar la identificación y caracterización de cepas efectivas para la producción de inoculantes. Esto puede incluir la introducción de cepas bien adaptadas o seleccionadas para ambientes específicos en el campo (Racancoj 2013; Racancoj *et al.* 2014).

En el presente estudio se determinó la variabilidad de aislamientos del *Rhizobium* mediante la caracterización fenotípica de las cepas provenientes de aislamientos de nódulos

colectados en diferentes localidades de Honduras, utilizando un vivero de diferenciales para la identificación de patrones de reacción en términos de compatibilidad de la interacción cepa-hospedero. En el estudio se plantearon como objetivos coleccionar, aislar y cultivar en laboratorio aislamientos de *Rhizobium* a partir de nódulos colectados de plantas de frijol en diversas localidades productoras de frijol de Honduras, validar la efectividad de un vivero de diferenciales de frijol para la caracterización de aislamientos de *Rhizobium* y caracterizar la diversidad de los aislamientos e identificar el valor potencial como cepas de *Rhizobium* utilizando el sistema binario de nomenclatura de un vivero diferencial compuesto por 12 genotipos de frijol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El proyecto de investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y casas de malla del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Esta institución está localizada en el Valle del Yegüare, Francisco Morazán, Honduras, a una elevación de 800 msnm, con una temperatura media anual de 24 °C y una precipitación de 1,100 mm. El proyecto se llevó a cabo a partir del mes de octubre del 2015 hasta septiembre del 2016.

Material experimental. Las accesiones de frijol utilizadas conforman el vivero de 12 genotipos diferenciales de frijol común compuesto por seis accesiones andinas y seis mesoamericanas (Cuadro 1), el cual fue desarrollado para evaluar la respuesta de la inoculación con aislamientos de *Rhizobium* y su caracterización como cepas (Racancoj 2013; Racancoj *et al.* 2014). Las cepas CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) y CIAT 632 (*Rhizobium etli*) se usaron como referencias debido a su alta efectividad en nodulación.

Para el desarrollo del estudio se recolectaron muestras de nódulos de plantas de frijol en época de cosecha en fincas de agricultores de 13 localidades de Honduras (Cuadro 2). Para la recolección de los nódulos se seleccionaron las plantas más vigorosas y con una nodulación abundante (> 50 nódulos por planta). Para el transporte al laboratorio de biotecnología aplicada del PIF, los nódulos se colocaron en tubos con tapón pequeños conteniendo sílica gel para absorber la humedad, según la metodología desarrollada por Somasegaran y Hoben (2012). En el laboratorio, se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

Procedimiento para los aislamientos de *Rhizobium* en el laboratorio. Los aislamientos de *Rhizobium* se obtuvieron a partir de los cultivos puros de colonias individuales, de acuerdo a la metodología desarrollada por Somasegaran y Hoben (2012). Los tubos de ensayo con cepas de *Rhizobium* se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su uso posterior. Éste procedimiento se ejecutó en la cámara de flujo laminar disponible en el laboratorio, donde se usó un mechero y etanol al 95% para el flameo y desinfección de las herramientas.

Cuadro 1. Genotipos de frijol común que conforman el vivero de diferenciales para la caracterización de cepas de *Rhizobium*. Zamorano, Honduras, 2016.

Número	Genotipos diferenciales
	Andinos
1	ICA Quimbaya
2	G05686
3	Ervilha
4	Mantenga
5	CAL 143
6	G02767
	Mesoamericanos
7	Macuzalito
8	G21212
9	Bribri
10	Tío Canela 75
11	Carioca
12	Dorado

Cuadro 2. Localidades de recolección de nódulos para los aislamientos en fincas de agricultores de frijol de Honduras, 2016.

Muestra	Localidad	Departamento
1	Guinope, Guinope	El Paraíso
2	La Bodega, Santa Ana	Francisco Morazán
3	Ciudad Mateo, El Espino	Choluteca
4	San Juan de Flores, Cantarrana	Francisco Morazán
5	El Ocotal, Yuscarán	El Paraíso
6	Araulí, Danlí	El Paraíso
7	Río Bonito, Siguatepeque	Comayagua
8	Cofradía, Tatumbula	Francisco Morazán
9	Zacapa, Zacapa	Santa Bárbara
10	Las Acacias, Jamastrán	El Paraíso
11	La Vega 4, Zamorano	Francisco Morazán
12	Agua Dulce, Siguatepeque	Comayagua
13	Pajarillo, Cantarrana	Francisco Morazán



Figura 1. Ubicación geográfica de las localidades de recolección de nódulos para los aislamientos. Honduras, 2016.

Procedimiento para el inoculante líquido de *Rhizobium* en el laboratorio. El inoculante líquido se obtuvo a partir de los aislamientos de *Rhizobium*, según el proceso implementado por Somasegaran y Hoben (2012). Cada frasco con su respectivo inóculo fue colocado en el agitador orbital (Modelo Orbit Shaker 3220, fabricado por Lab-Line Instruments Inc., Estados Unidos) durante tres días a una velocidad de 700 revoluciones por minuto (rpm) para acelerar la multiplicación de las bacterias. El crecimiento de las bacterias en el inoculante líquido se distinguió por la turbidez del líquido y el olor a levadura.

Procedimiento para la pre germinación de las semillas en el laboratorio. Las semillas de cada uno de los 12 genotipos diferenciales fueron desinfectadas y sembradas en medio de cultivo de Agar Levadura Manitol (ALM) en placas Petri, de acuerdo a la metodología desarrollada en el laboratorio de biotecnología aplicada del PIF. Éste procedimiento se ejecutó en la cámara de flujo laminar usando etanol al 95% para la desinfección del área y herramientas. Las placas Petri con las semillas se dejaron en la cámara de incubación (Modelo Thermolyne, fabricada por Cole Parmer Instrument Company, Estados Unidos) a una temperatura de 22 °C durante tres días.

Todos los implementos utilizados fueron esterilizados en la autoclave (Modelo STM-EL, fabricada por CVS industries, Estados Unidos) a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (PSI) durante 20 min.

Manejo del ensayo en casa de malla. Las evaluaciones de los aislamientos y su caracterización como cepas de *Rhizobium* se realizaron en una casa de malla de 5 × 3 m acondicionada para este fin. Para su acondicionamiento, se desinfectaron las paredes y mesas plásticas con 20 L de solución que contenía 0.5 L de cloro comercial y 19.5 L de agua, se desmalezó el área interna y se revisó que el sistema de riego por micro aspersión automático funcione perfectamente.

Para la siembra de las semillas, se utilizaron canaletas de PVC de 0.90 × 0.20 m distribuidas sobre las mesas a manera de cuatro canaletas por mesa. Antes de la siembra, las canaletas se lavaron con una solución que contenía 200 g de detergente y 20 L de agua y se desinfectaron colocando 1 L de cloro al 5% en un tanque con 200 L de agua durante 3 horas.

Se usó arena gruesa como sustrato en las canaletas de siembra. La arena se colocó en bolsas para autoclave de polipropileno de tamaño 40 × 48 cm, a razón de 2 kg de arena por bolsa, se amarraron con tiras twist para soporte y se esterilizaron a una temperatura de 121 °C y 15 PSI durante 30 min. Se utilizaron 2 bolsas de arena (4 kg) por cada canaleta.

En cada canaleta, se sembraron los 12 genotipos diferenciales (seis andinos y seis mesoamericanos) y se utilizaron cuatro repeticiones (canaletas) para las evaluaciones de cada uno de los 13 aislamientos. En las canaletas, las semillas pre germinadas fueron sembradas a una distancia de 7.5 cm y se colocaron etiquetas rotuladas del 1 al 12 para facilitar el manejo de los genotipos. Para facilitar la siembra, se humedeció el sustrato de las canaletas con agua. Se seleccionaron las mejores semillas pre germinadas y se sembraron en el siguiente orden: la numeración del 1 al 6 perteneció a los diferenciales andinos (ICA Quimbaya, G05686, Ervilha, Mantenga, CAL 143 y G06727) y del 7 al 12 a los diferenciales mesoamericanos (Macuzalito, G21212, Bribri, Tío Canela 75, Carioca y Dorado). Cada juego de los 12 genotipos diferenciales fue inoculado independientemente con cada uno de los aislamientos de *Rhizobium* que se obtuvieron de los nódulos recolectados en las fincas. Adicionalmente, y como referencia se hicieron inoculaciones de juegos de diferenciales con las cepas CIAT 632 (*R. etli*) y CIAT 899 (*R. tropici*) que son utilizadas actualmente para la producción de inoculantes en el PIF.

A los 2 y 4 días después de la siembra (DDS), con una micro pipeta se aplicó 1 mL (1×10^5 bacterias por mL) de inóculo líquido a cada planta. Así, un total de 48 plantas fueron inoculadas con cada aislamiento. Las inoculaciones se realizaron en horas nubladas del día para disminuir el impacto de la radiación solar por la variación de temperatura que ocasiona en el interior de la casa malla.

Para la fertilización de los genotipos diferenciales se preparó una solución nutritiva libre de nitrógeno (N), según el método desarrollado por Broughton y Dillworth (1970). Las plantas se fertilizaron a los 3, 5, 7 y 9 DDS, a razón de 50 mL por genotipo en cada canaleta. Las plantas fueron regadas de 6:30 am a 4:00 pm mediante un sistema de micro aspersión automatizado cada 30 min durante 1 min. El riego se suspendió durante 2 horas luego de que las semillas fueron inoculadas y fertilizadas para evitar lixiviación.

Para la cosecha de los diferenciales a los 15 DDS, se humedeció el sustrato de cada canaleta con agua para facilitar la extracción de las raíces y nódulos. Las raíces de cada diferencial se cosecharon cortando los tallos a una altura de 2 cm sobre la raíz, se enjuagaron en un recipiente lleno de agua para quitar la arena adherida, se colocaron en una bolsa plástica de 28 × 20 cm y se almacenaron a una temperatura de 4 °C para la posterior evaluación de la nodulación.

Evaluación de la nodulación. La capacidad de nodulación se determinó usando una escala de evaluación visual, tomando en cuenta el tamaño y número de nódulos presentes en la raíz. Bajo las condiciones donde se llevó a cabo el experimento, se estableció una escala de nodulación temprana 1 a 9 (1= ausencia de nódulos; 9 = > 30 nódulos grandes y > 3 mm) (Figura 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.

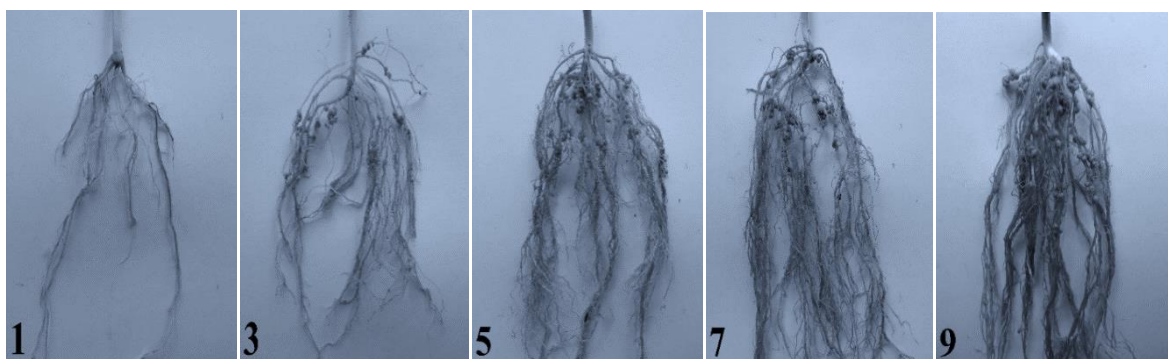


Figura 2. Escala de nodulación temprana (1-9): 1= ausencia de nódulos, 3= < 10 nódulos pequeños (< 1 mm), 5= 10-20 nódulos pequeños-medianos (1-2 mm), 7= 20-30 nódulos medianos-grandes (2-3 mm), 9= > 30 nódulos grandes (> 3 mm).

Caracterización de los aislamientos y su identificación como cepas de *Rhizobium*. 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 numérico binario de nomenclatura. Para la identificación de las cepas, cada genotipo diferencial ya 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*.

Valor binario	Genotipos diferenciales	
	Andinos	Mesoamericanos
1	ICA Quimbaya	Macuzalito
2	G05686	G21212
4	Ervilha	Bribri
8	Mantenga	Tío Canela 75
16	CAL 143	Carioca
32	G02767	Dorado

La identificación como cepa de *Rhizobium* resulta de la suma de los valores binarios de los genotipos diferenciales que presentan compatibilidad (reacción +) con el aislamiento de *Rhizobium*, cuando la nodulación observada está entre los valores 4 a 9 de la escala de nodulación temprana 1-9. Por el contrario, los genotipos diferenciales que presentan incompatibilidad (reacción -) con el aislamiento obtienen valores de 1 a 3 de acuerdo a la escala de nodulación y no son tomados en cuenta en la sumatoria.

Por ejemplo, si un aislamiento produce una nodulación ≥ 4 (compatible) en los genotipos andinos G05686, Mantenga y CAL 143 y en los genotipos mesoamericanos Macuzalito y Bribri, el número binario de la cepa será 26-5. La expresión de máxima compatibilidad de una cepa en términos de reacción entre los genotipos y la bacteria está dado por el valor binario 63-63 (Cuadro 4) lo que indica que es altamente efectiva en nodulación.

Diseño experimental. Se usó un arreglo factorial de bloques completos al azar (BCA) de dos factores, aislamientos y genotipos con cuatro repeticiones. 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) basada 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®.

Cuadro 4. Genotipos diferenciales de frijol y valores binarios para la caracterización de la respuesta a la inoculación con aislamientos de *Rhizobium* mediante la variable de nodulación. Zamorano, Honduras, 2016.

Aislamientos <i>Rhizobium</i>	Genotipos												Cepa
	Andinos						Mesoamericanos						
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Valor binario	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	
Aislamiento 1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	26-5
Aislamiento 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	63-63

Genotipos Andinos (A: ICA Quimbaya, B: G05686, C: Ervilha, D: Mantenga, E: CAL 143, F: G02767); Genotipos Mesoamericanos (G: Macuzalito, H: G21212, I: Bribri, J: Tío Canela, K: Carioca, L: Dorado).

Reacción incompatible (-): 1-3 en escala de nodulación temprana.

Reacción compatible (+): 4-9 en escala de nodulación temprana.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La respuesta de los genotipos diferenciales a la inoculación con los 13 aislamientos de *Rhizobium* fue altamente significativa ($P \leq 0.01$). Se observaron diferencias significativas debidas al efecto de los aislamientos de *Rhizobium* (A), de los genotipos diferenciales (G) y en la interacción de los Aislamientos \times Genotipos en la variable de nodulación utilizando la escala 1-9 de evaluación visual.

Evaluación de la capacidad de nodulación de los aislamientos de *Rhizobium*. Las reacciones de los genotipos diferenciales andinos y mesoamericanos en respuesta a la inoculación con los diferentes aislamientos de *Rhizobium* fueron muy variables debido a la diversidad de los genotipos y a las diferencias en la compatibilidad de las reacciones a la inoculación con los diversos aislamientos (Cuadro 5). De acuerdo a los resultados, los aislamientos de las localidades San Juan de Flores, Río Bonito, Cofradía, La Vega 4 y Agua Dulce presentaron un promedio en nodulación ≤ 3 lo que evidencia una incompatibilidad en la reacción, debido a la baja especificidad entre la planta hospedera y la bacteria (Martínez *et al.* 2006). Por otro lado, la capacidad de los genotipos para establecer una relación simbiótica efectiva (valores en la escala ≥ 4) se evidenció con el resto de los aislamientos demostrando que la interacción hospedero-bacteria es más específica (Cuadro 5). Esto, se atribuye a la variabilidad de las cepas en cuanto a su capacidad para fijar N_2 . No obstante, estos valores promedios no superan a los alcanzados por las cepas CIAT 899 (*R. tropici*) y CIAT 632 (*R. etli*), que fueron utilizadas como referencias y se comportaron de la manera esperada con muy buena nodulación.

La nodulación de las cepas CIAT 632 (*R. etli*) y CIAT 899 (*R. tropici*), con las que se prepara inoculante comercial en Zamorano, fue bastante efectiva. Su comportamiento es comparable con los aislamientos de El Ocotol y Pajarillo que dieron lugar a las cepas identificadas como 58-63 y 63-63, respectivamente (Cuadro 7).

Para el reservorio genético andino la interacción de los genotipos ICA Quimbaya con el aislamiento de El Ocotol, G05686 con el aislamiento del Pajarillo y CIAT 899 y Ervilha con el aislamiento de El Ocotol evidenciaron reacciones incompatibles (≤ 3 en la escala de nodulación temprana 1-9) (Figura 3).

Cuadro 5. Evaluación de la nodulación de genotipos diferenciales de frijol inoculados con aislamientos de *Rhizobium* de 13 localidades usando la escala visual 1-9. Zamorano, Honduras, 2016.

Genotipos	Aislamientos de localidades														Cepas	
	GU	LB	EE	SJF	EO	AR	RB	CO	ZA	AC	V4	AD	PA	Pm [¶]	CIAT	
															899	632
Andinos																
ICA Quimbaya	4	4	3	3	3	4	4	3	4	5	3	2	4	3	5	6
G05686	4	3	3	3	4	3	3	3	4	4	3	3	3	3	3	5
Ervilha	6	4	3	3	3	4	3	3	3	3	4	3	4	3	5	8
Mantenga	5	4	4	3	5	4	4	4	5	5	4	3	6	4	6	8
CAL 143	3	2	3	1	4	3	3	3	3	4	3	4	6	3	4	4
G02767	5	5	4	4	4	4	3	4	4	4	4	2	4	4	5	8
Mesoamericanos																
Macuzalito	3	3	4	4	4	4	3	3	4	5	4	4	4	3	6	6
G21212	5	4	4	3	5	4	3	2	4	4	4	4	6	4	4	6
Bribri	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	5	5	4	6	8
Tío Canela 75	3	4	6	4	4	4	4	3	6	4	4	5	6	4	7	7
Carioca	4	6	5	4	4	5	4	3	3	4	4	4	4	4	7	5
Dorado	3	3	4	3	4	4	3	3	3	3	3	4	5	3	4	6
Pm [¶]	4	4	4	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4		5	6
CV (%) ^δ	22.6	25.6	17.2	20.3	30.0	25.9	25.3	18.1	27.9	25.1	16.1	28.9	26.0		24.4	23.8
DMS (0.05) ^β	0.6**	0.6**	0.4**	0.5**	0.8 ^{n.s.}	0.7 ^{n.s.}	0.6 ^{n.s.}	0.4 ^{n.s.}	0.8*	0.7*	0.4 ^{n.s.}	0.7**	0.8**		1.0*	1.2*

Aislamientos: Guinope (GU), La Bodega (LB), El Espino (EE), San Juan de Flores (SJF), El Ocotol (EO), Araulí (AR), Rio Bonito (RB), Cofradía (CO), Zacapa (ZA), Las Acacias (AC), La Vega 4 (V4), Agua Dulce (AD), Pajarillo (PA).

¶ Promedio, ^δ Coeficiente de Variación, ^β Diferencia Mínima Significativa.

^{n.s.} No significativo, (*) significativo al $P \leq 0.05$ y (**) altamente significativo al $P \leq 0.01$.

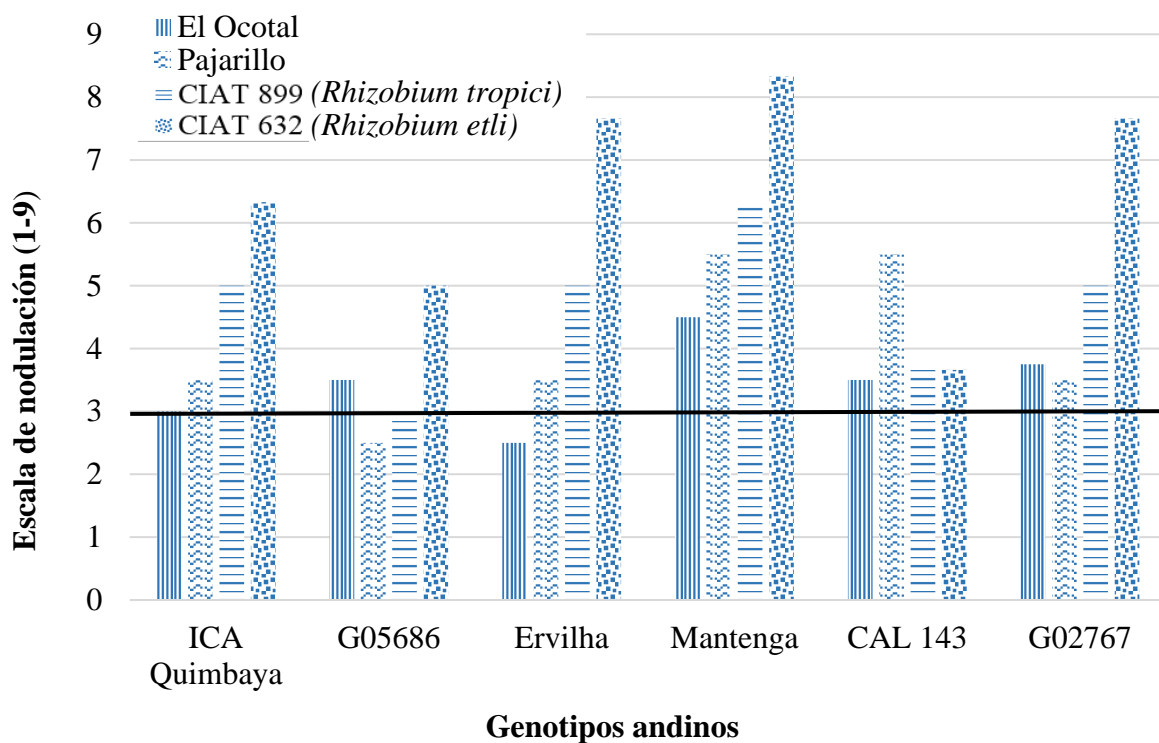


Figura 3. Nodulación de los genotipos diferenciales andinos con los aislamientos de las localidades de El Ocotal y Pajarillo, y las cepas CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) y 632 (*Rhizobium etli*). Reacción incompatible (1-3) y compatible (4-9). Zamorano, Honduras, 2016.

En los diferenciales del reservorio genético mesoamericano, la interacción de los genotipos diferenciales y las cepas de *Rhizobium* fue mucho mejor en relación al reservorio genético andino ya que hubo una reacción compatible con todos los genotipos mesoamericanos (≥ 4 en escala de nodulación temprana 1-9) (Figura 4). Este comportamiento se atribuye a la estabilidad en el material genético que está involucrado en la fijación de nitrógeno (Martínez *et al.* 1988) y a la relación entre la capacidad de fijar nitrógeno y transferirlo para el aprovechamiento de la planta (Dobereigner 1988).

Teniendo en cuenta el número limitado de aislamientos evaluados en el estudio y aunque se identificaron dos cepas 58-63 y 61-63 compatiblemente con la mayoría de los genotipos andinos y con todos los genotipos mesoamericanos; se considera necesario continuar evaluando aislamientos de diferentes zonas de producción de frijol en Honduras, con el fin de identificar cepas de mayor o igual capacidad de nodulación que las CIAT 632 (*R. etli*) y CIAT 899 (*R. tropici*). Mediante la caracterización de cepas de *Rhizobium* con el vivero de diferenciales se buscan cepas con alto grado de compatibilidad, es decir con alta capacidad de nodulación con la mayoría de genotipos andinos y mesoamericanos, para su uso posterior en la producción comercial de inoculantes.

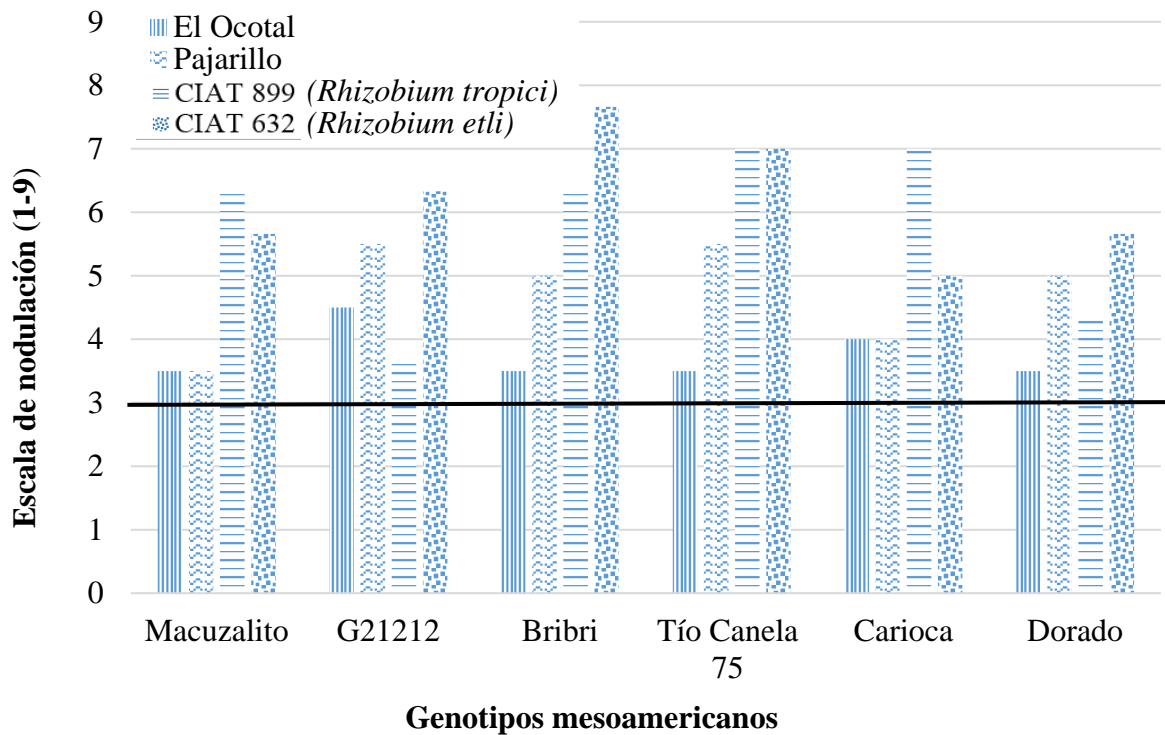


Figura 4. Nodulación de los genotipos diferenciales mesoamericanos con los aislamientos de las localidades de El Ocotal y Pajarillo y las cepas CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) y 632 (*Rhizobium etli*). Reacción incompatible (1-3) y compatible (4-9). Zamorano, Honduras, 2016.

Caracterización de los aislamientos de *Rhizobium*. Al evaluar los 13 aislamientos de *Rhizobium* queda evidenciado la variabilidad en la capacidad de nodulación temprana de estas cepas. Los aislamientos de El Ocotal y el Pajarillo presentaron una mayor reacción fenotípica compatible tanto con los genotipos andinos como los mesoamericanos, por lo que se identificaron como cepas 58-63 y 61-63 (Cuadro 6). La cepa 61-63 se comportó de la misma manera que el testigo CIAT 899 (*R. tropici*) lo que demuestra su alta compatibilidad y eficiencia en formación de nódulos en relación con el resto de las cepas caracterizadas (Cuadro 6). Los aislamientos de las localidades de El Espino, Araulí y Agua Dulce fueron compatibles con el reservorio genético mesoamericano. El aislamiento de localidad Cofradía no evidenció interacción alguna con los genotipos mesoamericanos. Este comportamiento se atribuye a la especificidad que poseen los genotipos de frijol con ciertas cepas de *Rhizobium*. Las variaciones en las reacciones de compatibilidad, pueden deberse a la co evolución del *Rhizobium* en interacción con la gran diversidad genética existente en el frijol común representada por los reservorios genéticos andino y mesoamericano (Martínez *et al.* 1988).

Cuadro 6. Caracterización de aislamientos e identificación como cepas de *Rhizobium* usando el vivero de diferenciales de frijol común. Zamorano, Honduras, 2016.

Valor binario	Genotipos												Cepa
	Andinos						Mesoamericanos						
	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	
Aislamientos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
<i>Rhizobium</i>													
Guinope	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	47-22
La Bodega	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	45-30
El Espino	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	40-63
San Juan de Flores	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	32-29
El Ocotal	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	58-63
Araulí	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	45-63
Río Bonito	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	9-28
Cofradía	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	40-0
Zacapa	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	43-15
Las Acacias	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	59-31
La Vega 4	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	44-31
Agua Dulce	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	16-63
Pajarillo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	61-63
Testigos													
CIAT 899 (<i>R. tropici</i>)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	61-63
CIAT 632 (<i>R. etli</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	63-63

Genotipos Andinos (A: ICA Quimbaya, B: G05686, C: Ervilha, D: Mantenga, E: CAL 143, F: G02767); Genotipos Mesoamericanos (G: Macuzalito, H: G21212, I: Bribri, J: Tío Canela, K: Carioca, L: Dorado).

Reacción incompatible (-): 1-3 en escala de nodulación temprana.

Reacción compatible (+): 4-9 en escala de nodulación temprana.

Cuadro 7. Aislamientos de *Rhizobium* de las localidades de El Ocotal y Pajarillo caracterizados como cepas mediante el vivero de diferenciales de 12 genotipos de frijol común. Zamorano, Honduras, 2016.

Aislamientos <i>Rhizobium</i>	Genotipos												Cepa
	Andinos						Mesoamericanos						
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Valor binario	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	(1)	(2)	(4)	(8)	(16)	(32)	
El Ocotal	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	58-63
Pajarillo	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	61-63

Genotipos Andinos (A: ICA Quimbaya, B: G05686, C: Ervilha, D: Mantenga, E: CAL 143, F: G02767); Genotipos Mesoamericanos (G: Macuzalito, H: G21212, I: Bribri, J: Tío Canela, K: Carioca, L: Dorado).

4. CONCLUSIONES

- El uso del vivero de genotipos diferenciales de frijol común para evaluar las diferencias en nodulación de aislamientos de *Rhizobium* resultó ser efectivo en determinar las variaciones en nodulación y en la caracterización como cepas compatibles y no compatibles.
- La respuesta de los genotipos diferenciales a la inoculación con los 13 aislamientos de *Rhizobium* fue altamente significativa. Se observaron diferencias significativas debidas al efecto de los aislamientos de *Rhizobium* (A), de los genotipos diferenciales (G) y en la interacción de los aislamientos \times genotipos en la variable de nodulación utilizando la escala 1-9 de evaluación visual.
- Se identificaron y caracterizaron cepas de 13 localidades, siendo las más efectivas en capacidad de nodulación las de El Ocotil y Pajarillo. El aislamiento de Pajarillo caracterizado como la cepa 61-63 presentó una alta nodulación similar a la cepa CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar la caracterización de aislamientos mediante la recolección de nódulos de diferentes localidades productoras de frijol con el fin de identificar cepas compatibles con nodulación similar o mejor a las CIAT 632 (*Rhizobium etli*) y 899 (*Rhizobium tropici*).
- Validar la efectividad de las cepas caracterizadas mediante ensayos de campo en fincas de productores de frijol con el fin de seleccionar las cepas más eficientes en nodulación.
- Ampliar la colección de cepas eficientes para diversificar la producción comercial de inoculantes en Zamorano.

6. LITERATURA CITADA

- Bergersen FJ, Brockwell J, Gibson AH, Schwinghamer EA. 1971. Studies of natural populations and mutants of rhizobium in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil* 35(1):3-16. eng. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02661831>.
- Bliss FA. 1993. Utilizing the potential for increased nitrogen fixation in common bean. *Plant and Soil* (152):156-160.
- Broughton WJ, Dillworth MJ. 1970. Plant nutrient solutions: In Somasegaran P, Hoben HJ (editors). *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Nifal Project, University of Hawaii (Hawaii). p. 245-249.
- Debouck GD, Hidalgo R. 1985. Morfología de la planta de frijol común. In: Lopez M, Schoonhoven AV (editores). *Frijol, investigación y producción*. Cali (Colombia), CIAT. 237 p.
- Dobereigner J. 1988. Recent advances in biological nitrogen fixation. In: Academia de Ciencias del Estado de Sao Paulo editor. VI Japan-Brazil Symposium on Science and Technology. Sao Paulo (Brasil) (4): 145-160.
- Graham PH, Rosas JC. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci. Cambridge* 88:503-508.
- Graham PH, Rosas JC. 1978. Nodule development and Nitrogen Fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by plant density. *J. Agric. Sci. Cambridge* 90: 19-29.
- Hardarson G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152: 1-17.
- Herridge DF, Rupela OP, Serraj R, Back DP. 1994. Screening techniques and improved biological nitrogen fixation in cool season food legumes. *Euphytica* 73: 95-108.
- Martínez E, Flores M, Brom S, Romero D, Davila G, Palacios R. 1988. *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. *Plant and Soil* 108:179-184.

- Martínez R, López M, Dibut B, Parra C, Rodríguez J. 2006. La fijación biológica del nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. In: Grupo Francis editores. Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierra. Maracay (Venezuela). 172 p.
- Mayz J. 1997. Simbiosis Leguminosas/Rhizobia. In: Instituto de Investigaciones Agropecuarias editores. IIAPUDO. Maturín (Venezuela), Núcleo de Monagas. 113 p.
- Nascimento CS, Junior MA, Stamford NP, Santos MB, Sousa CA. 2008. Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. In: Bras R, editor. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Brasília (Brasil): Bras Ci Solo 32:579.
- Racancoj A. 2013. Desarrollo de un vivero diferencial para identificar interacciones de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium* (Tesis). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 13 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, Bliss FA. 1986. Improvement of the nitrogen fixation potential of common beans in Latin America. Ceiba 27(2):245-260.
- Rosas JC, Kipe-Nolt J, Henson RA, Bliss FA. 1987. Estrategias de mejoramiento para incrementar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno del frijol común en América Latina. Ceiba 28(1): 39-57.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 2012. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. 1era ed. Nueva York (Estados Unidos): Springer-Verlag New York, Inc. p. 7-259.
- Statistix 8.1®. 2013. Data analysis software for researchers. User's Guide: Statistical. Florida (Estados Unidos).
- Viteri SE, Cosenza OE, Rosas JC. 1992. Catálogo de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Honduras). 4 p.