

**Validación de diferenciales de frijol común  
(*Phaseolus vulgaris* L.) para evaluar la  
respuesta a la inoculación con cepas de  
*Rhizobium***

**Myrna Gabriela Cruz Cerrato**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2014

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Validación de diferenciales de frijol común  
(*Phaseolus vulgaris* L.) para evaluar la  
respuesta a la inoculación con cepas de  
*Rhizobium***

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

Presentado por

**Myrna Gabriela Cruz Cerrato**

**Zamorano Honduras**

Noviembre, 2014

# **Validación de diferenciales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para evaluar la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium***

Presentado por:

Myrna Gabriela Cruz Cerrato

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Renán Pineda, Ph.D.  
Director  
Departamento de Ciencia y Producción  
Agropecuaria

---

Iveth Rodríguez, Ing. Agr.  
Asesora

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

## Validación de diferenciales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para evaluar la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*

Myrna Gabriela Cruz Cerrato

**Resumen.** El frijol común es uno de los granos básicos de mayor importancia en Honduras y Latinoamérica. Es cultivado en fincas pequeñas con suelos deficientes en nutrientes en especial nitrógeno; debido a los altos costos de los fertilizantes, la mayoría tiene un acceso limitado. Por ello, se recomienda aprovechar la capacidad de este cultivo de fijar nitrógeno atmosférico mediante la relación simbiótica con cepas de *Rhizobium*. El Programa de Investigaciones del Frijol (PIF) está desarrollando un vivero diferencial que permita caracterizar la respuesta a la inoculación de la interacción cepa de *Rhizobium* x genotipo de frijol. Se evaluaron 12 genotipos (6 andinos y 6 mesoamericanos) de frijol seleccionados por Racancoj (2013), bajo condiciones de laboratorio, invernadero y camas (bancales), inoculados con tres cepas de *Rhizobium*, CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), CIAT 632 (*Rhizobium etli*) y UPR 2010 (*Rhizobium leguminosarum*). Se evaluaron la nodulación (escala 1-9), el número de nódulos, los pesos secos de follaje, raíces y nódulos, y el rendimiento de grano. La respuesta de los genotipos diferenciales a la inoculación con cepas de *Rhizobium*, varió según las condiciones de cada ensayo. Las diferencias en el ensayo de laboratorio, se debieron a los efectos de cepas en la nodulación (1-9) y el número de nódulos, y al efecto de genotipo en la nodulación. En el invernadero, utilizando cilindros de suelo, las diferencias en nodulación se debieron al efecto de cepas, y las de pesos secos de follaje y raíces al efecto de genotipo. En el ensayo en camas, las diferencias en rendimiento se debieron a efectos de genotipo. Se recomienda validar el vivero de genotipos diferenciales de frijol en fincas de agricultores en diferentes épocas y localidades, para determinar su efectividad en el monitoreo de la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*.

**Palabras claves:** Nodulación, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici*.

**Abstract:** The common bean is one of the most important basic grains in Honduras and Latin America. Beans are cultivated in small farms with soil nutrient deficient, specially nitrogen, producers have to bear the high cost of fertilizers, but the majority have limited access due to lack of resources. Therefore, it is recommended to take advantage of the ability of this crop to fix atmospheric nitrogen through symbiotic relationship with *Rhizobium* strains. The Bean Research Program (PIF) is developing a bean differential nursery to characterize the response to inoculation resulting from the bean genotype x *Rhizobium* strain interaction. Twelve bean genotypes (6 Andean and 6 Mesoamerican) selected by Racancoj (2013) were evaluated under laboratory, greenhouse and soil beds (terraces), inoculated with three *Rhizobium* strains, CIAT 899 (*Rhizobium tropici*), CIAT 632 (*Rhizobium etli*) and UPR 2010 (*Rhizobium leguminosarum*). Nodulation with a 1-9 scale, number of nodules, shoot, root and nodule dry weight; and grain yield were evaluated. The response to inoculation with strains of *Rhizobium* of the differential genotypes varied according to the conditions of each trial. The differences in laboratory trial were due to the effects of strains in nodulation (1-9) and nodule number; and the effect of genotype in nodulation. In the greenhouse using soil cylinders, nodulation

differences were due to the effect of strains, and the differences in shoot and roots dry weight were due to the effect of genotype. In the study in terraces, the differences in seed yield were due to effects of genotype. It is recommended to validate the differential bean genotypes nursery in farmers' fields at different seasons and locations, to determine their effectiveness in monitoring the response to inoculation with strains of *Rhizobium*.

**Key words:** Nodulation, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici*.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>19</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Genotipos de frijol común utilizadas en el estudio de la respuesta a la inoculación con cepas de <i>Rhizobium</i> . Zamorano, Honduras, 2014.....	3
2. Resultados de análisis de los sustratos suelo: arena (2:1) de los ensayos de invernadero y bancales realizado por el Laboratorio de Suelos. Zamorano, Honduras 2014.....	7
3. Valores P del análisis estadístico de la nodulación (escala visual 1-9) y número de nódulos de genotipos de frijol inoculados con tres cepas de <i>Rhizobium</i> . Ensayo de Laboratorio, Zamorano, Honduras, 2014. ....	8
4. Efecto de las cepas de <i>Rhizobium</i> en la nodulación (escala 1-9) de 12 genotipos andinos y mesoamericanos. Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.....	9
5. Efecto de las cepas de <i>Rhizobium</i> en el número de nódulos de los 12 genotipos andinos y mesoamericanos de frijol común. Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.....	10
6. Efecto de los genotipos en la nodulación (escala 1-9) y el número de nódulos por planta de 12 genotipos de frijol común inoculados con cepas de <i>Rhizobium</i> . Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.....	11
7. Valores P del análisis estadístico de la nodulación (escala visual 1-9), peso seco del follaje (PSF) y peso seco de raíces (PSR) de genotipos de frijol común inoculados con tres cepas de <i>Rhizobium</i> . Ensayo de Invernadero, Zamorano, Honduras 2014.....	12
8. Efecto del factor Cepa de <i>Rhizobium</i> en la nodulación (escala 1-9) de 12 genotipos andinos y mesoamericanos de frijol común. Ensayo de Invernadero. Zamorano, Honduras, 2014.....	13
9. Efecto del factor genotipo de frijol común en la nodulación y los pesos secos de follaje (PSF) y raíces (PSR) por planta. Ensayo de Invernadero, Zamorano, Honduras, 2014.....	14
10. Valores P del análisis estadístico del rendimiento de grano, nodulación (escala visual 1-9), pesos secos del follaje (PSF), nódulos (PSN) y raíces (PSR) de genotipos de frijol común inoculados con un inoculante mezcla de las cepas de <i>Rhizobium</i> CIAT 632 y CIAT 899. Ensayo en Camas, Zamorano, Honduras 2014..	15
11. Diferencias en la nodulación (escala 1-9), pesos secos de follaje (PSF), raíces (PSR) y nódulos (PSN), y rendimiento de grano (RG) de 12 genotipos	

diferenciales inoculados con una mezcla de las cepas de *Rhizobium* CIAT 632 y CIAT 899. Ensayo en Camas, Zamorano, Honduras 2014. .... 15

Figura Página

1. Escala visual 1-9 (1= ausencia de nódulos; 9= >10 nódulos grandes) para determinar la nodulación en plantas de frijol común. .... 5

Anexos Página

1. Protocolo para la Esterilización de Semillas ..... 19
2. Protocolo Agar-Levadura-Manitol ..... 19
3. Protocolo para preparar la Solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dillworth 1971) (NifTAL) ..... 20
4. Protocolo para la Producción de Inoculante Líquido de *Rhizobium* ..... 20
5. Protocolo para preparar inoculante a base de turba con caldo de *Rhizobium*..... 20



## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los granos básicos con mayor importancia en Honduras y Latinoamérica. La producción y el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, ha incrementado los costos de la producción agrícola y los problemas ambientales por la contaminación del aire, el suelo y las aguas (Rojas *et al.* 2009). Algunos de los problemas que los pequeños productores suelen enfrentar con este cultivo son las deficiencias nutricionales, debido a las condiciones deficientes de los suelos. Una de las deficiencias más comunes que se observan debido a la falta de materia orgánica en ciertas regiones es la de nitrógeno.

Los productores se ven obligados a invertir en fertilizantes, pero la mayoría no cuentan con los recursos necesarios o no tienen fácil acceso a ellos. Debido a esto, el Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) de Zamorano, está desarrollando variedades de frijol común que poseen un mayor potencial de fijar nitrógeno en interacción con la bacteria *Rhizobium* (Rosas 2011).

Las bacterias del género *Rhizobium* son sumamente importantes en la producción de cultivos de la familia Leguminosae. Estas plantas forman una asociación simbiótica con especies del género *Rhizobium*, que consiste en que la bacteria fija nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) y lo cede a la planta. Esta bacteria habita en el suelo como un saprófito, de esta manera es capaz de infectar a la planta a través de los pelos radicales para así formar nódulos.

En los suelos existen diferentes cepas de *Rhizobium*, pero no todas logran infectar con éxito al cultivo, por lo tanto se han extraído algunas para aislarlas y de esta manera poder inocular las leguminosas que son cultivadas en suelos con bajo contenido de nitrógeno.

El frijol común es una leguminosa promiscua que puede ser infectada y formar nódulos efectivos con varias especies de *Rhizobium*, incluyendo *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium leguminosarum* y otras (Graham *et al.* 2003). Para poder estudiar las interacciones frijol común x *Rhizobium*, determinar las cepas y especies más efectivas en regiones específicas de producción de frijol y hacer recomendaciones de inoculación, se requieren herramientas prácticas y eficientes. Los viveros diferenciales son utilizados extensamente para estudiar las interacciones hospedero- patógeno y caracterizar las razas de los patógenos que causan enfermedades en el cultivo del frijol.

Mediante este estudio, el PIF pretende desarrollar un vivero diferencial que permita caracterizar la respuesta a la inoculación del frijol común con cepas de *Rhizobium*, y que facilite la determinación de la expresión de la fijación simbiótica de nitrógeno a nivel de campo. Esto permitiría ayudar a que los pequeños productores puedan utilizar los

genotipos que hayan manifestado mayor eficiencia en la interacción con cepas efectivas de *Rhizobium* que nodulan y fijan N<sub>2</sub> con frijol común, y beneficiarse con las contribuciones del nitrógeno fijado en sus cultivos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del estudio.** El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Invernadero #2 y camas (bancales) del Programa de Investigaciones de Frijol (PIF), en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano. La EAP está ubicada en el Valle del Yeguaré, Km 30 carretera a oriente, Francisco Morazán, Honduras, a 800 msnm y una precipitación anual de 1,100 mm. Los ensayos se llevaron a cabo a partir del mes de octubre 2013 hasta septiembre del 2014.

**Material Experimental.** Los genotipos de frijol que se utilizaron para la investigación provienen del estudio realizado por Racancoj (2013), en el cual se evaluaron 32 genotipos andinos y mesoamericanos de frijol, seleccionándose los 12 genotipos diferenciales de frijol que se utilizaron en este estudio. Este vivero de genotipos diferenciales de frijol común incluye a seis andinos y seis mesoamericanos (Cuadro 1).

Para este estudio se utilizaron tres cepas de tres diferentes especies de *Rhizobium*, incluyendo a CIAT 632 (*R. etli*), CIAT 899 (*R. tropici*) y UPR 2010 (*R. leguminosarum*).

**Cuadro 1.** Genotipos de frijol común utilizadas en el estudio de la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*. Zamorano, Honduras, 2014.

No.	Genotipos
<b>Andinos</b>	
1	G05686
2	Ervilha
3	Mantega
4	ICA Quimbaya
5	CAL 143
6	G21212
<b>Mesoamericanos</b>	
7	Bribri
8	Tío Canela 75
9	Tacaná
10	Dorado
11	Macuzalito
12	Carioca

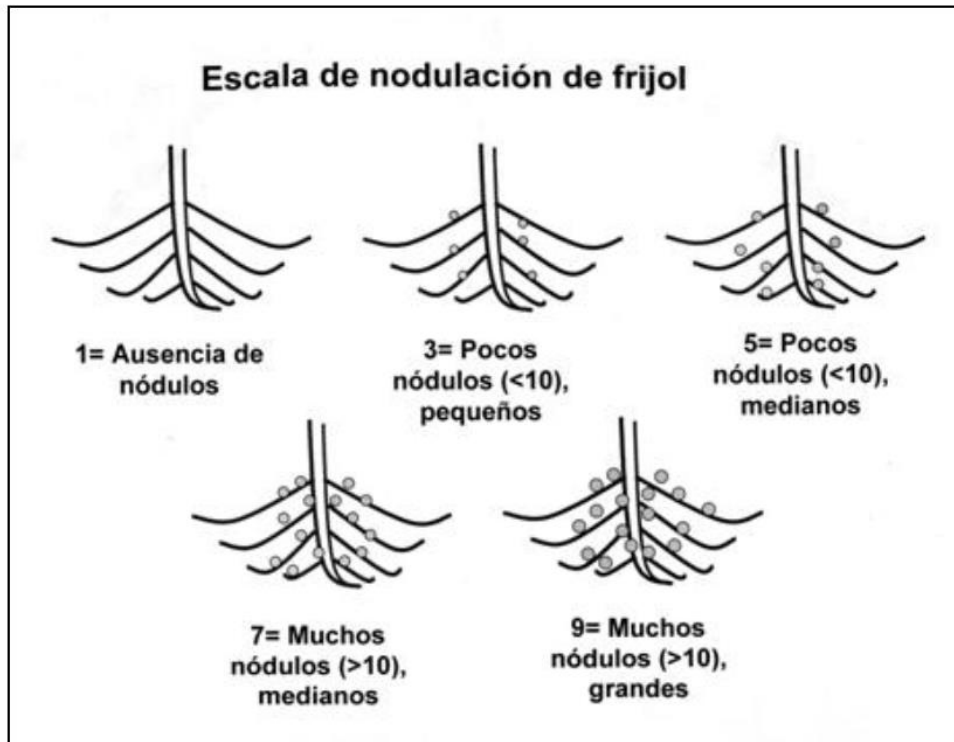
## **Ensayo de velocidad de nodulación en laboratorio**

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Se esterilizaron láminas de papel de pre-germinación por 20 minutos en una autoclave. Las láminas de papel se colocaron en bolsas plásticas (pouches), las cuales permiten la siembra de las semillas en la parte superior, sirven de sostén a las plantas en crecimiento, y facilitan la absorción de la solución nutritiva por las raíces en crecimiento. Las bolsas plásticas contenían una solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dillworth 1971).

Las bolsas fueron colocadas en cajas de plástico negro de 43 x 34 x 24 cm en las que se manejaron las repeticiones de cada cepa de *Rhizobium*. En cada bolsa se sembró una semilla pre-germinada de un genotipo. A los tres días después de la siembra (DDS), se procedió a inocular las plántulas en proceso de emergencia, con las cepas de *Rhizobium* que correspondieron según el tratamiento. Para evitar la penetración de la luz en las raíces, la parte superior de las cajas fueron parcialmente cubiertas con papel aluminio.

El ensayo se realizó utilizando un arreglo factorial de un diseño de bloques completos al azar (BCA). Las tres cepas de *Rhizobium* fueron distribuidas en las parcelas (cajas) y los 12 genotipos diferenciales en las sub-parcelas. Cada caja contenía una cepa y los genotipos de cada repetición se distribuyeron al azar en el interior de las cajas. Las cajas fueron colocadas en estantes que estuvieron cubiertos con papel manila para evitar el paso de la luz solar de manera des uniforme. Se utilizaron lámparas GE Ecolux de 20 W para proveer luz blanca de forma artificial y controlada durante 10 horas diarias. Cada caja estuvo etiquetada con la información de la fecha de siembra, fecha de inoculación y la cepa con la que se inoculó.

Toma de datos. La velocidad de nodulación se evaluó a los 20 DDS, retirando las bolsas de las cajas y observando la presencia de nódulos formados en las raíces usando la escala de nodulación 1-9 (1= ausencia de nódulos; 9= >10 nódulos grandes) (Fig. 1), y el número de nódulos formados.



**Figura 1.** Escala visual 1-9 (1= ausencia de nódulos; 9= >10 nódulos grandes) para determinar la nodulación en plantas de frijol común.

### **Ensayo de invernadero de genotipos diferenciales**

Para este ensayo de invernadero se utilizaron tubos de PVC (80 cm de largo x 7.6 cm de diámetro), en cuyo interior se colocaron bolsas plásticas transparentes de 80 cm de largo x 7 cm de diámetro, conteniendo 4.4 kg de un sustrato suelo: arena (2:1) bajo en nitrógeno (Cuadro 2) (Vargas, 2008). El sustrato fue esterilizado a 100°C x 2 horas para reducir la incidencia de micro-organismos patógenos que pudieran interferir en el estudio. Se sembraron dos semillas en cada bolsa de crecimiento, para luego dejar una planta establecida por bolsa.

El ensayo se realizó utilizando un arreglo factorial de un diseño de bloques completos al azar (BCA). Las cepas de *Rhizobium* fueron distribuidas en las parcelas y los genotipos en las sub-parcelas, y se emplearon cuatro repeticiones.

A los 4 DDS, se inocularon las plantas de los genotipos diferenciales con las cepas de *Rhizobium*, de acuerdo a la distribución de las cepas en cada repetición. Cada dos días hasta los 33 DDS, se aplicó 50 ml de una solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dillworth 1971) y 50 ml de agua. Las plantas fueron tutoradas con varillas de bambú de 91 cm de largo para su mejor crecimiento.

Toma de datos. Las plantas fueron cosechadas en la etapa de floración, a los 35 DDS, cortándolas en la base del tallo, y colocando el follaje en bolsas de papel para ser secadas

en estufa a 70°C x 72 h y determinar el peso seco de follaje. Las raíces fueron extraídas de las bolsas plásticas y lavadas cuidadosamente con agua y detergente, antes de ser evaluadas según su nodulación usando la escala visual 1 a 9, y luego ser secadas en estufa para determinar el peso seco de raíces.

### **Ensayo en camas (bancales) con genotipos diferenciales**

Este ensayo fue conducido en camas de crecimiento (bancales) al aire libre, las cuales permiten un crecimiento y desarrollo de las plantas de frijol comparado a las condiciones de campo. Estas camas contenían un sustrato suelo: arena (2:1) bajo en N (Cuadro 2). Las camas tuvieron surcos de 1.20 m de largo, sembrándose 10 semillas por surco; los surcos estuvieron separados a 0.5 m de distancia y las plantas en los surcos a 0.1 m. El ensayo se manejó sin limitaciones de agua (total de lluvia y riego, aprox. 300 mm), control manual de malezas, y control de plagas y enfermedades hasta la etapa de desarrollo R8 (llenado de vainas).

Los genotipos de frijol se sembraron utilizando un diseño BCA con seis repeticiones. El inoculante utilizado fue una mezcla de dos cepas de *Rhizobium* (CIAT 632 y CIAT 899), preparado en un medio de turba y aplicado a la semilla al momento de la siembra.

Toma de datos. Cinco plantas de cada unidad experimental y de tres repeticiones fueron cosechadas en la etapa de floración, a los 39 DDS, para la evaluación de la nodulación con la escala visual 1-9, y los pesos secos de nódulos, follaje y raíces después de secadas las muestras en una estufa a 70°C x 72 h. Las plantas de las otras tres repeticiones fueron cosechadas a la madurez fisiológica, a los 73 DDS, para estimar el rendimiento de grano al 14% de humedad.

**Análisis estadístico.** Los datos de las variables evaluadas en los ensayos fueron analizados mediante análisis de varianza y separación de medias (DMS 0.05), utilizando el programa Statistix<sup>®</sup> 8.1.

**Cuadro 2.** Resultados de análisis de los sustratos suelo: arena (2:1) de los ensayos de invernadero y bancales realizado por el Laboratorio de Suelos. Zamorano, Honduras 2014.

Ensayo	g/100 g (%)			mg/Kg (extractable)				
	pH	M.O.	N total	P	K	Ca	Mg	Na
Invernadero		Bajo	bajo	bajo	alto	medio	alto	
	5.90	1.49	0.07	3	214	655	122	ND
Bancales		Bajo	bajo	medio	alto	alto	bajo	normal
	5.65	1.51	0.08	23	204	1005	105	7

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Ensayo de la velocidad de nodulación en laboratorio

En el ensayo de laboratorio solo se encontraron diferencias significativas para los tratamientos de las cepas en las variables de nodulación usando la escala visual (1-9) y en el número de nódulos (Cuadro 3). Adicionalmente, se observaron efectos significativos de los genotipos en el número de nódulos. No se presentaron diferencias debido al efecto de la interacción cepa x genotipo.

**Cuadro 3.** Valores P del análisis estadístico de la nodulación (escala visual 1-9) y número de nódulos de genotipos de frijol inoculados con tres cepas de *Rhizobium*. Ensayo de Laboratorio, Zamorano, Honduras, 2014.

Factores	Valores P	
	Nodulación	No. Nódulos
Cepa (C)	0.0080 <sup>**</sup>	0.0038 <sup>**</sup>
Genotipo (G)	0.1185 <sup>ns</sup>	0.0307 <sup>**</sup>
Interacción (C x G)	0.3368 <sup>ns</sup>	0.1895 <sup>ns</sup>

<sup>\*\*</sup>, <sup>ns</sup> Diferencias altamente significativa (P<0.01) y no significativa.

Los resultados indican que la cepa CIAT 899 fue superior en nodulación (escala 1-9) que las cepas CIAT 632 y UPR 2010 (Cuadro 4) y el número de nódulos (Cuadro 5), sugiriendo su mayor eficiencia en nodular a un grupo diverso de genotipos de los dos reservorios primarios (andino y mesoamericano) del frijol común.

CIAT 899 es una cepa de *R. tropici*, lo que falta conocer es si en general *R. tropici* es superior a *R. etli* (CIAT 632) en las condiciones del estudio, y como se comportarían estas cepas y cual sería los efectos de la diversidad de cepas de cada especie en interacción con genotipos andinos y mesoamericanos en la región de Centro América. El vivero de genotipos diferenciales usado en este estudio, se presenta como una herramienta útil para resolver las preguntas señaladas. Por otro lado, es definitivo que la cepa UPR 2010 de *R. leguminosarum* no es efectiva al menos bajo las condiciones del estudio, aunque con algunos genotipos andinos formó un buen número de nódulos. Para *R. leguminosarum* también sería importante evaluar un número más representativo de cepas de esta especie, usando el vivero diferencial.

Se pudo observar en este ensayo de laboratorio, que debido a la corta duración del mismo, los tamaños de los nódulos fueron inferiores a los observados cuando se muestrea en la



etapa de floración, como regularmente se hace en ensayos de invernadero o de campo. Esto podría explicar los valores bajos presentados al aplicar la escala 1-9, que fue desarrollada para evaluar nodulación en plantas muestreadas a la floración. Según lo observado, no se debería usar esta escala 1-9 en los ensayos de laboratorio de muestreo temprano, o en todo caso desarrollar una escala que sea más apropiada para la evaluación de nódulos en estos ensayos.

**Cuadro 4.** Efecto de las cepas de *Rhizobium* en la nodulación (escala 1-9) de 12 genotipos andinos y mesoamericanos. Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.

Genotipo	Cepas de <i>Rhizobium</i>		
	CIAT 899	CIAT 632	UPR 2010
	<b>Andinos</b>		
ICA Quimbaya	5.00	2.50	1.00
G05686	4.00	3.00	2.00
Ervilha	3.50	2.50	1.50
CAL 143	3.00	2.50	1.50
G212112	3.00	2.50	2.00
Mantega	3.00	3.00	2.00
	<b>Mesoamericanos</b>		
Macuzalito	3.00	4.00	2.00
Tío Canela 75	3.00	4.00	1.00
Bribri	3.50	2.25	1.50
Dorado	3.50	3.00	2.00
Tacaná	2.50	3.50	1.00
Carioca	2.00	2.00	1.00
Promedio Cepas	3.25	2.90	1.38
Valor P Cepas		0.008**	

\*\* Diferencia altamente significativa al  $P < 0.01$ .

**Cuadro 5.** Efecto de las cepas de *Rhizobium* en el número de nódulos de los 12 genotipos andinos y mesoamericanos de frijol común. Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.

Genotipo	Cepas de <i>Rhizobium</i>		
	CIAT 899	CIAT 632	UPR 2010
	<b>Andinos</b>		
ICA Quimbaya	41.6	9.8	0.0
G05686	20.8	19.3	5.3
Ervilha	30.4	20.6	1.4
CAL 143	28.3	20.4	4.3
G212112	15.8	10.3	8.3
Mantega	20.9	10.3	12.5
	<b>Mesoamericanos</b>		
Macuzalito	8.4	10.5	3.3
Tío Canela 75	24.1	29.0	0.0
Bribri	24.5	3.9	1.0
Dorado	32.5	20.8	4.6
Tacaná	12.8	14.5	0.0
Carioca	2.5	7.0	0.0
Promedio Cepas	21.9	14.7	3.4
Valor P Cepas		0.0038**	

\*\* Diferencia altamente significativa al  $P < 0.01$ .

Se pudieron observar diferencias significativas debidas a efectos del factor genotipo en el número de nódulos (Cuadro 6). Las variaciones en número de nódulos se presentan en ambos grupos de genotipos diferenciales, andino y mesoamericano; aunque los mayores valores (con la excepción de los genotipos mesoamericanos Dorado y Tío Canela 75) se presentan en los andinos. Esto último no se puede explicar estadísticamente debido a que no se observaron efectos debidos a la interacción cepa x genotipo (Cuadro 3).

Las variaciones en el número de nódulos sugieren una variación en la expresión fenotípica de la respuesta a la inoculación de estos genotipos diferenciales, que es una de los requisitos que se espera tener en un vivero diferencial enunciada en los objetivos del estudio. Por el contrario, la escala de nodulación no fue efectiva en determinar las diferencias en nodulación de los genotipos diferenciales evaluados en el sistema de bolsas (pouches) utilizado en este ensayo de laboratorio. Nuevamente los valores bajos observados al usar la escala 1-9 de nodulación, no fueron efectivos en determinar diferencias entre genotipos.

**Cuadro 6.** Efecto de los genotipos en la nodulación (escala 1-9) y el número de nódulos por planta de 12 genotipos de frijol común inoculados con cepas de *Rhizobium*. Ensayo de Laboratorio. Zamorano, Honduras, 2014.

<b>Genotipos</b>	<b>Nodulación (1-9)</b>	<b>No. Nódulos por planta</b>
G05686	3.00	15.1
Macuzalito	3.00	7.4
ICA Quimbaya	2.83	17.1
Dorado	2.83	19.3
Mantega	2.67	14.5
Tío Canela 75	2.67	17.7
Ervilha	2.50	17.5
G21212	2.50	11.4
Bribri	2.42	2.9
Tacaná	2.33	9.1
CAL 143	2.33	17.6
Amadeus 77	1.83	7.5
Carioca	1.67	3.2
Seda	1.67	3.3
Promedio Genotipos	2.45	11.7
Valor P Genotipos	0.1185 <sup>ns</sup>	0.0307*

<sup>ns</sup> y \* No significativo y significativo al P<0.05.

## Ensayo de invernadero de genotipos diferenciales

En el ensayo conducido en cilindros de suelo en invernadero, se encontraron efectos significativos en la nodulación (escala visual 1-9) debido al factor Cepa, y en los pesos secos de follaje y de raíces debidos al factor Genotipo (Cuadro 7). No se observaron efectos debidos a la interacción cepa x genotipo en ninguna de las variables.

En este ensayo se pudo observar que las tres cepas de *Rhizobium* fueron superiores al testigo sin inoculación (Cuadro 8). El promedio más alto de nodulación se observó en la cepa CIAT 632 de *R. etli*, la cual bajo esta condición de cilindros de suelo en invernadero, y con un muestreo más tardío que en el ensayo en bolsas en el laboratorio, pudo producir una mayor nodulación. La nodulación en general con las tres cepas fue mayor que en el ensayo de laboratorio en bolsas por su mayor duración.

La presencia de nódulos en el testigo no inoculado (sin cepa), se debe a que este presentó nódulos producidos por el rizobio presente en el suelo utilizado para producir el sustrato suelo: arena (2:1), que aunque fue sometido a pasteurización a vapor, este proceso parece que no fue efectivo en eliminar todos los microorganismos. Sin embargo, esta situación es aceptable en el sentido que cuando se usa los inoculantes en la agricultura las cepas que los constituyen deben competir con los rizobios presentes en los suelos.

**Cuadro 7.** Valores P del análisis estadístico de la nodulación (escala visual 1-9), peso seco del follaje (PSF) y peso seco de raíces (PSR) de genotipos de frijol común inoculados con tres cepas de *Rhizobium*. Ensayo de Invernadero, Zamorano, Honduras 2014.

Factores	Valores P		
	Nodulación	PSF	PSR
Cepa (C)	0.0001 <sup>**</sup>	0.4294 <sup>ns</sup>	0.1662 <sup>ns</sup>
Genotipo (G)	0.1164 <sup>ns</sup>	0.0009 <sup>**</sup>	0.0003 <sup>**</sup>
Interacción (C x G)	0.8817 <sup>ns</sup>	0.4295 <sup>ns</sup>	0.5579 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> y <sup>\*\*</sup> No significativo y altamente significativo al P<0.01.

**Cuadro 8.** Efecto del factor Cepa de *Rhizobium* en la nodulación (escala 1-9) de 12 genotipos andinos y mesoamericanos de frijol común. Ensayo de Invernadero. Zamorano, Honduras, 2014.

Genotipo	Cepas de <i>Rhizobium</i>			
	CIAT 899	CIAT 632	UPR 2010	Sin cepa
<b>Andinos</b>				
ICA Quimbaya	4.50	5.50	4.00	2.00
G05686	5.50	6.50	5.50	4.50
Ervilha	4.50	5.00	3.00	2.00
CAL 143	3.50	6.00	5.00	3.00
G21212	3.50	7.00	5.50	2.95
Mantega	4.50	6.00	6.50	2.50
<b>Mesoamericanos</b>				
Macuzalito	3.50	5.00	4.50	3.05
Tío Canela 75	5.00	6.50	4.50	3.00
Bribri	3.00	6.50	6.00	3.00
Dorado	3.50	6.00	4.50	3.00
Tacaná	4.50	5.50	4.50	2.50
Carioca	4.00	6.50	4.50	3.50
Promedio Cepas	4.13	6.00	4.83	2.92
Valor P Cepas	0.0001**			

\*\* Altamente significativo al  $P < 0.01$ .

Los efectos debidos al factor genotipo en el ensayo de cilindros de suelo en invernadero, fueron significativos en los pesos secos de follaje y raíces pero no en la nodulación (Cuadro 9), sugiriendo un comportamiento relativamente similar de estos genotipos diferenciales a través de los tratamientos de cepas, y por ende la falta de efectos de interacción cepa x genotipo observada. Esta respuesta de los genotipos es factible de ocurrir, ya que estos fueron seleccionados como los superiores en nodulación en un ensayo en condiciones similares (Racancoj 2013).

Las diferencias en los pesos secos de follaje y raíces entre los genotipos sugieren diferencias en crecimiento y desarrollo debidas a sus características genéticas y expresiones fenotípicas bajo las condiciones del ensayo, independientes de los efectos de cepa o de la interacción cepa x genotipo.

**Cuadro 9.** Efecto del factor genotipo de frijol común en la nodulación y los pesos secos de follaje (PSF) y raíces (PSR) por planta. Ensayo de Invernadero, Zamorano, Honduras, 2014.

<b>Genotipo</b>	<b>Nodulación (1-9)</b>	<b>PSF (g/pl)</b>	<b>PSR (g/pl)</b>
G05686	5.5	3.5	0.62
Mantega	4.9	3.0	0.43
Tío Canela 75	4.8	2.9	0.43
Bribri	4.6	3.1	0.48
Carioca	4.6	2.8	0.45
G21212	4.5	2.5	0.42
CAL 143	4.4	2.6	0.41
Dorado	4.3	2.9	0.43
Tacaná	4.3	2.7	0.40
Macuzalito	4.0	3.3	0.45
ICA Quimbaya	4.0	3.0	0.51
Ervilha	3.6	2.5	0.38
Promedio Genotipo	4.5	2.9	0.45
Valor P Genotipo	0.1164 <sup>ns</sup>	0.0009 <sup>**</sup>	0.0003 <sup>**</sup>

<sup>ns</sup> y <sup>\*\*</sup> No significativo y altamente significativo al P<0.01.

### **Ensayo en camas (bancales) con genotipos diferenciales**

En el ensayo de los bancales solo se encontraron diferencias significativas entre los genotipos en el rendimiento de grano, pero no se encontraron diferencias en las variables de la nodulación y los pesos secos de follaje, nódulos y raíces (Cuadro 10). La falta de diferencias en nodulación, se debió a que bajo las condiciones del ensayo, la expresión de nodulación como respuesta a la inoculación fue efectiva en la mayoría de los genotipos, ya que estos crecieron en un suelo bajo en nitrógeno, en condiciones similares a las de campo, y sin problemas de estrés hídrico y de enfermedades. Los valores de nodulación de la escala 1-9, variaron de 4.3 a 8.3 con un promedio de 6.1, lo que sugiere una nodulación muy buena por las condiciones explicadas anteriormente. Las diferencias en rendimiento de grano se debieron a las diferencias de los genotipos, encontrándose algunos genotipos tanto andinos como mesoamericanos con rendimiento superior a otros. Parte de la explicación de los bajos rendimientos de algunos andinos es su menor adaptación a condiciones de Zamorano que los de la región de Mesoamérica. En general los genotipos tuvieron un crecimiento normal bajo este sistema de camas, y aunque no es posible explicarlo esto se vio reflejado en el rendimiento de la mayoría de los genotipos diferenciales.

**Cuadro 10.** Valores P del análisis estadístico del rendimiento de grano, nodulación (escala visual 1-9), pesos secos del follaje (PSF), nódulos (PSN) y raíces (PSR) de genotipos de frijol común inoculados con un inoculante mezcla de las cepas de *Rhizobium* CIAT 632 y CIAT 899. Ensayo en Camas, Zamorano, Honduras 2014.

Factor	Valor P				
	Nodulación	PSF	PSN	PSR	Rendimiento
Genotipo	0.1566 <sup>ns</sup>	0.0657 <sup>ns</sup>	0.2942 <sup>ns</sup>	0.0917 <sup>ns</sup>	0.0005 <sup>**</sup>

<sup>ns</sup> y <sup>\*\*</sup> No significativo y altamente significativo al P<0.01.

**Cuadro 11.** Diferencias en la nodulación (escala 1-9), pesos secos de follaje (PSF), raíces (PSR) y nódulos (PSN), y rendimiento de grano (RG) de 12 genotipos diferenciales inoculados con una mezcla de las cepas de *Rhizobium* CIAT 632 y CIAT 899. Ensayo en Camas, Zamorano, Honduras 2014.

Genotipo	Nodulación (escala 1-9)	PSF (g/planta)	PSR (g/planta)	PSN (g/planta)	RG (kg/ha)
<b>Andinos</b>					
ICA Quimbaya	6.33	22.06	1.00	0.61	1380
G05686	7.00	23.33	2.00	1.10	562
Ervilha	6.33	21.85	1.50	0.70	1909
CAL 143	6.33	20.93	1.50	0.69	794
G21212	8.33	27.55	2.00	1.21	2358
Mantega	7.00	18.46	2.00	0.77	3697
<b>Mesoamericanos</b>					
Macuzalito	6.33	18.36	2.00	0.50	1337
Tio Canela 75	7.00	19.56	1.00	0.55	2254
Bribri	7.00	28.99	1.50	0.90	2320
Dorado	4.33	21.55	2.00	0.52	2688
Tacaná	5.67	20.10	1.00	0.73	2964
Carioca	6.33	23.85	1.00	0.62	3071
Promedio	6.50	22.22	1.54	0.74	2439
Valor P	0.1566 <sup>ns</sup>	0.0657 <sup>ns</sup>	0.0917 <sup>ns</sup>	0.2942 <sup>ns</sup>	0.0005 <sup>**</sup>

<sup>ns</sup>, <sup>\*\*</sup> No significativo y altamente significativo al P<0.01.

#### 4. CONCLUSIONES

- La respuesta de los genotipos diferenciales de frijol a la inoculación con cepas de *Rhizobium*, varió según las condiciones de cada ensayo en que fueron evaluados.
- Las diferencias en el ensayo de laboratorio, se debieron al efecto de cepas en la nodulación (1-9) y el número de nódulos; y el efecto de genotipo en la variable de número de nódulos.
- En el ensayo de invernadero en cilindros de suelo, las diferencias en nodulación se debieron al efecto del factor cepa y la de los pesos secos de follaje y raíces fueron debidos al genotipo.
- En el ensayo en camas, las diferencias en rendimiento de grano se debieron al factor genotipo. Este sistema demostró ser el más eficiente para este tipo de estudio, ya que las plantas crecen normalmente, contrario a los ambientes de laboratorio e invernadero.



## 5. RECOMENDACIONES

- Conducir ensayos en fincas de agricultores en diferentes épocas y localidades, para determinar la efectividad del vivero de genotipos diferenciales en el monitoreo de la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*.
- En los ensayos de inoculación en fincas utilizar las cepas CIAT 632 y CIAT 899, y monitorear las variaciones en características de suelo, ambientes y manejo del cultivo, para explicar los resultados.
- Ampliar la colección de cepas de *R. etli* y *R. tropici*, para estudiar la variabilidad genética de estas especies.

## 6. LITERATURA CITADA

Broughton B.J., M.J. Dilworth. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemistry Journal* 125: 1075-1080.

Graham, P.H., J.C. Rosas, C. Estévez de Jensen, E. Peralta, B. Tlustý y J.A. Acosta-Gallegos. 2003. Addressing edaphic constraints to bean production: Bean/Cowpea CRSP perspective. *Field Crops Research* 82: 179-192.

Somasegaran, P., H.J. Hoben. 1994. *Handbook for Rhizobia Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Ed. Robert C. Garber, Springer-Verlag New York, Inc., 450 p.

Rojas T., D.F., M.F. Garrido, R.R. Bonilla. 2009. Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp (en línea). Consultado 24 de septiembre de 2014. Disponible en <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/8.Estandarizacindeunmediodecultivo.pdf>

Rosas, J.C., Fredrick A. Bliss. 1985. Principios y Prácticas para la conducción de Ensayos sobre Fijación Biológica de Nitrógeno en Condiciones de Campo. *Ceiba* 27 (1): 23-39.

Rosas, J.C. 2011. Contribuciones del Programa de Investigaciones en Frijol en Centro América y el Caribe. *Ceiba* 52 (1): 65-73.

Racancoj C., Astrid J., 2013. Desarrollo de un vivero diferencial para identificar interacciones de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium*. Tesis Ing. Agrónomo Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 26 p.

Vargas P., Ana G., 2008. Selección de genotipos de frijol común tolerantes a bajo contenido de nitrógeno en el suelo. Tesis Ing. Agrónomo Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 12 p.

## 7. ANEXOS

### **Anexo 1.** Protocolo para la Esterilización de Semillas

1. Sumergir las semillas en Cloro al 5% de 3-5 minutos
2. Enjuagar con agua destilada
3. Sumergir las semillas en Etanol al 30% de 3-5 minutos
4. Enjuagar con agua destilada

### **Anexo 2.** Protocolo Agar-Levadura-Manitol

Medio más utilizado para el crecimiento de *Rhizobium*.

#### Composición:

Fosfato de Potasio Monobásico ( $K_2HPO_4$ )	0.5g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2g
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.1g
Manitol	10.0g
Extracto de levadura	0.5g
Agua destilada	1000.0ml

#### Preparación:

Caldo Levadura-Manitol. En un frasco Erlenmeyer de 2000 ml, mezclar todos los ingredientes con el agua y agitar hasta su completa dilución (líquido color amarillo). Medir el pH y normalizarlo a 6.8-7.3 si es necesario. Proceder a esterilizar.

Esterilización del medio. La pureza del medio de cultivo es muy importante para el crecimiento de la bacteria libre de competencia con otros microorganismos.

- Esta pureza se obtiene al esterilizar el medio en un autoclave a 120°C con una presión de 15 PSI (libras/pulgada cuadrada) durante 20 minutos.
- El frasco donde se esteriliza el medio debe ser autoclavable y llenado hasta la mitad para evitar que se derrame el líquido. Se aconseja que este sea cubierto por un tapón de algodón y gasa para que permita el intercambio de gases.
- Si la presión, temperatura y tiempo de la esterilización son variados pueden resultar en problemas de crecimiento ya que al elevarlos se incurre en la desnaturalización de los componentes del medio y al reducirlos se incurre en la eliminación incompleta de los microorganismos no deseables.

Una vez esterilizado, el medio debe ser enfriado para su uso, recordando siempre de manejarlo bajo condiciones estériles para conservar su pureza.

Una vez que el caldo ha sido preparado y esterilizado según lo descrito, debe incubarse a 30°C por 24 horas para comprobar su absoluta esterilidad.

**Anexo 3.** Protocolo para preparar la Solución nutritiva libre de nitrógeno (Broughton y Dillworth 1971) (NifTAL)

Solución STOCK 1: a 1.0 L de agua destilada, agregar 294.1 g de Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Solución STOCK 2: a 1.0 L de agua destilada, agregar 136.1 g de Fosfato de potasio di básico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Solución STOCK 3: A 1.0 L de agua destilada, agregar 6.7 g de citrato de hierro, 123.3 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Mezclar bien todos estos ingredientes.

Solución STOCK 4: a 1.0 L de agua destilada agregar 0.25 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 0.29 g de sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{NaMoO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Mezclar bien todos estos ingredientes.

Para preparar 10 litros de solución nutritiva, tomar 5 ml de cada solución STOCK y agregar 9,980 ml de agua destilada estéril. Ajustar el pH a un rango de 6.6-6.8, usando NaOH 1N.

Las cuatro soluciones STOCK deben ser almacenadas en recipientes oscuros de 1 litro de capacidad para su uso continuo.

**Anexo 4.** Protocolo para la Producción de Inoculante Líquido de *Rhizobium*

En una cámara de flujo laminar, el caldo Levadura-Manitol es inoculado introduciendo la bacteria mediante un asa estéril del medio sólido. Una vez inoculado, el caldo se coloca en la máquina vibradora para acelerar el crecimiento de la cepa; cuando este ocurre el caldo se satura de bacterias adquiriendo una coloración opaca (turbidez) con olor a levadura. El tiempo que se toma aproximadamente es de 24-72 horas. En este punto el medio está listo para ser utilizado; si no se utiliza inmediatamente, puede ser refrigerado a 4°C por 3-4 días.

**Anexo 5.** Protocolo para preparar inoculante a base de turba con caldo de *Rhizobium*

La turba seca es molida a través de una malla de 100-200 mesh, y se neutraliza a un pH de 6.5-7.0 con carbonato de calcio precipitado. Puede emplearse estéril y no estéril.