

Evaluación de la sobrevivencia y eficiencia en invernadero y en ensayos de campo de cepas aisladas localmente de rhizobia

Cristina Sierra¹, Edwin de León^{1,2}, Julio Rosales², Rolando Cifuentes¹, Ofelia Paniagua^{1,3}, Carlos Arias³, Roberto de León³ & Carlos Rolz¹

¹ Centro de Estudios Agronómicos y Forestales (CEAF), Instituto de Investigaciones

² Campus Altiplano, Aldea El Tablón, Sololá

³ Centro de Ingeniería Bioquímica (CIB), Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala
acsierponce@gmail.com

RESUMEN: Se aislaron dos cepas de *Rhizobium* de plantaciones comerciales de frijol. Estas cepas, más dos cepas de *Rhizobium* conocidas, se impregnaron en compost elaborado de residuos del procesamiento de la caña, y se almacenaron a diferentes temperaturas para observar su estabilidad. Luego se realizaron pruebas de infección de variedades comerciales de frijol, tanto a nivel de invernadero, como en pruebas de campo en donde se determinó la productividad del grano. El compost resultó ser un excelente soporte y las cepas sobrevivieron en las tres temperaturas ensayadas. En los ensayos de invernadero se encontró una diferencia significativa entre las variedades de frijol empleadas, respecto a la cantidad y el peso de los nódulos formados en la raíz, siendo la variedad de frijol Altense la que mostró mejores resultados. En los ensayos de campo se encontró un aumento en el rendimiento como efecto directo de la inoculación microbiana y se determinó una sinergia entre la inoculación y la adición de fertilizante inorgánico. Se recomienda el empleo de la inoculación con *Rhizobium* acompañada con la adición de 30 kg de N por ha con el objeto de maximizar el rendimiento del frijol cosechado.

PALABRAS CLAVE: Fijación biológica de nitrógeno, *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, frijol negro, soporte, compost

Altense variety showed the best performance. In the field studies a significant grain yield increase was associated to inoculation and synergy was observed between inoculation and fertilizer input. As a result a recommendation is given for maximizing black bean yield as rhizobia inoculation plus 30 kg of N per ha.

KEY WORDS: Biological nitrogen fixation, *Rhizobium*, *Phaseolus vulgaris*, black bean, Support, compost.

Introducción

El uso desmedido de los fertilizantes de síntesis química está provocando problemas ambientales entre los que destaca la eutrofización de cuerpos de agua, es decir, el aumento de la concentración de nitrógeno y fósforo en ríos y lagos lo que provoca un proceso de deterioro biológico que disminuye el oxígeno disuelto y por consiguiente afecta la vida acuática. Como respuesta a la situación planteada se ha propuesto el concepto de agricultura sostenible, la cual concretamente consiste en cultivar el suelo dañando lo menos posible al medio ambiente (Singh et al 2011). En este contexto una particular importancia se les ha dado a los microorganismos que al interactuar con las plantas estimulan el crecimiento y las mantienen sanas (Berg 2009, Singh et al 2011).

Con excepción del agua, el nitrógeno es considerado el nutriente más limitante para las plantas (Franco & Dobereiner 1994). El mismo es un constituyente de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y vitaminas. El nitrógeno molecular (N₂) es la única reserva accesible en la biosfera, la cual es relativamente ilimitada pero no es empleada por los vegetales. Para que el nitrógeno molecular pueda ser utilizado es necesario que sea reducido y los únicos capaces de hacerlo biológicamente son microorganismos procarióticos (bacterias) por el proceso denominado Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Algunas de ellas están asociadas a las plantas, *Rhizobium* con las legumbres y *Frankia* y *Azospirillum* con otras especies. Otras conforman las bacterias fijadoras de nitrógeno per se, entre ellas están las bacterias del azufre denominadas verdes o moradas y algunas de las cianobacterias.

Survival and efficiency under greenhouse and field trial conditions of locally isolated strains of rhizobia

ABSTRACT: Two *Rhizobium* strains were isolated from commercial black bean plantations. Both microbial strains plus two known *Rhizobium* from culture collections, were impregnated in compost previously prepared from sugarcane residues and then were stored at three different temperatures for stability studies. Impregnated compost was tested at greenhouse level and field experiments in order to obtain plant and grain productivity data. Compost was an excellent microbial support and the strains survived at all temperatures. A significant difference was found in the greenhouse experiments in the number and weight of nodules formed by the different black bean varieties tested. The

El sistema de FBN más importante es el conjunto simbiótico que conforman las bacterias rizobiáceas con las plantas leguminosas (Herridge et al 2008; Lindström et al 2010). En un sistema óptimo que asegure la presencia de densidades adecuadas de rizobia en el suelo específico para tal leguminosa, dicha planta puede llegar a satisfacer del 36 al 68 % del nitrógeno que necesita en su ciclo productivo a través de este mecanismo de FBN (Herridge et al 2008). La soya es la leguminosa cultivada que más se ha beneficiado del FBN, en donde se han aislado rizobia apropiados, los cuales se han reproducido industrialmente, colocado en soportes sólidos o en formulaciones líquidas en donde mantienen su estabilidad, y se agregan a la semilla en el momento de la siembra (Deaker et al 2004).

Sin embargo no es la soya la leguminosa más importante para la dieta humana. El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa en países tropicales de Latinoamérica y África, entre ellos Guatemala, la mayor fuente de proteína vegetal para la población (Broughton et al 2003). Lamentablemente el mecanismo de FBN en el frijol es el menos eficiente entre las leguminosas (Herridge et al 2008). Se ha aceptado que el frijol es nativo de América existiendo tres núcleos de diversidad genética, el de México, Centroamérica y Colombia; el de Ecuador y el norte del Perú andinos; y el de los andes del Sur (Aguilar et al 2004). Se han identificado varias especies de rizobia asociadas simbióticamente con el frijol, *Rhizobium etli* bv. phaseoli, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum*, y *Rhizobium giardini* (Amarger 2001). Sin embargo es *Rhizobium etli* bv. phaseoli el predominante en los nódulos del frijol (Aguilar et al 2004) demostrándose que el proceso de formación de los nódulos es preferencial al núcleo específico, es decir, rizobia de Mesoamérica formaran nódulos efectivos en las variedades de frijol sembradas en dicha región, lo que indica que ha existido una co-evolución de planta y microorganismo (Aguilar et al 2004).

A nivel mundial se reportaron experimentos en el campo que mostraron que la inoculación del frijol con rizobia mostraba una formación de nódulos baja y pobres rendimientos en la cosecha, atribuyéndolo a varios factores, entre ellos la competencia con rizobia nativos presentes en el suelo, ciertas condiciones de estrés ambiental y a problemas genéticos de reconocimiento molecular entre planta y microorganismo. Sin embargo, se ha demostrado que empleando el rizobia adecuado a la variedad de frijol dada, en conjunto con un programa de fertilización con nitrógeno inorgánico en bajas dosis, produce aumentos significativos en el rendimiento (Hungria et al 2003).

A continuación se presentan los resultados de los experimentos llevados a cabo con los objetivos de, aislar cepas de rizobia capaces de nodular variedades de frijol comerciales, determinar la estabilidad de las cepas en un soporte sólido a base de compost y la evaluación de las cepas aisladas a nivel de invernadero y la determinación del rendimiento de frijol en ensayos en campo.

Metodología

Aislamiento del rhizobium

Con el fin de recolectar muestras de raíces de plantas de frijol con nódulos, se escogieron dos zonas productoras de frijol, Chimaltenango por ser lugar de cultivos de frijol desde hace siglos y Jutiapa donde se ha venido cultivando en los últimos

años. En total se obtuvieron 31 muestras las cuales fueron donadas por agricultores de las distintas zonas, gracias a la colaboración de personal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) quienes acompañaron en la recolección y sirvieron de contacto con los agricultores.

Las plantas completas trasladadas al laboratorio fueron cortadas para emplear solamente la raíz. Las raíces fueron lavadas para eliminar la tierra. De la raíz se tomaron los nódulos y se sumergieron por 1 minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Luego se lavaron en agua deionizada para ser aplastados y usados para sembrar la superficie de cajas de Petri conteniendo Agar Extracto de Levadura-Manitol (Somasegaran y Hoben, 1994, p337). Se procedió a incubar las cajas así sembradas a 30°C por 72 horas (*Incubadora Imperial III Lab-line*). Las colonias sospechosas (sin crecimiento diseminado) fueron transferidas a cajas de Petri con Agar Extracto de Levadura-Manitol-Rojo Congo (Somasegaran y Hoben, 1994, p338). Transcurridas 48 horas de una incubación a 30°C en la oscuridad, se aislaron las colonias incoloras y se sembraron tubos de Agar Extracto de Levadura-Manitol; también se prepararon frotis coloreados con la tinción de Gram para observación microscópica descartando las bacterias con apariencia de *Bacillus* sp.

De las muestras obtenidas se aislaron seis cepas potenciales de ser del género *rhizobium* y se hicieron las pruebas de crecimiento en medio líquido, usando caldo de Extracto de Levadura-Manitol (Somasegaran y Hoben, 1994, p.337). El caldo se preparó en Erlenmeyers para cultivo con agitación y se incubaron a 30°C en una incubadora agitadora a 100 rpm (*New Brunswick serie 25*). En las pruebas de identificación se escogieron solamente dos, una identificada como Jutiapa y la otra de Chimaltenango identificada como Altense por la variedad de frijol de la que fue aislada. Estas dos cepas locales se emplearon en los subsiguientes ensayos. En adición se obtuvieron dos cepas de *Rhizobium phaseoli* de la colección alemana de microorganismos y células (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellenkulturen-DSMZ*), la No 1979 (*Rhizobium phaseoli*) y la No 11541 (*Rhizobium etli*) como referencia.

Sobrevivencia del rhizobium en compost

El compost de residuos de caña de azúcar utilizado se obtuvo de la planta piloto del Campus Sur de la UVG en Santa Lucía Cotzumalguapa. Se realizaron análisis del contenido de humedad (*Balanza de humedad OHAUS MB45*) y se esterilizaron frascos conteniendo 100 g con la humedad ajustada a 30% (*Autoclave NAPCO, modelo 8000 DSE*). Luego, se preparó cultivo líquido en caldo Manitol Extracto de Levadura de las cuatro cepas disponibles para impregnarlas manualmente en el compost. Luego se llevaron a cabo recuentos en placa con el objetivo de verificar la sobrevivencia de las cepas a 25, 30 y 35°C. por un periodo de seis semanas, realizando recuentos cada dos semanas. El recuento fue realizado con medio de Agar Manitol Extracto de Levadura, diluciones en solución de peptona al 0.1% y siembra por mezcla con el agar en cajas de Petri con una incubación de tres días a 30°C.

Evaluación de las cepas aisladas a nivel de invernadero

Las variedades de frijol utilizadas fueron la ICTA Ligero y la ICTA Altense obtenidas de un distribuidor local de semillas. Las macetas de material plástico y de 1 L de capacidad fueron lavadas y esterilizadas con alcohol al 95 %. Como substrato se usó una

mezcla de arena (2/3) y turba (1/3). La turba fue añadida para aumentar la retención de humedad. El sustrato fue esterilizado en autoclave a 121°C por una hora en bolsas plásticas para reducir la existencia de cepas nativas de *Rhizobium*. Como aporte de nutrientes se utilizó una solución nutritiva (Somasegaran & Hoben 1994, p.339) que se aplicó con los riegos. La misma no llevaba nitrógeno. Se incluyó un control que llevó todos los nutrientes, incluyendo nitrógeno. Como parte del diseño experimental se utilizó cada cepa y una serie de controles como arreglo de tratamientos con una distribución al azar. En cada tratamiento se utilizaron 3 repeticiones. Previo a la siembra, las semillas se sumergieron en una solución de sacarosa al 10 % durante 20 segundos, luego se sacaron y se pusieron en contacto con el inóculo de *Rhizobium* para su impregnación sobre la superficie de la semilla. Las semillas se colocaron a 5 cm de profundidad, luego se colocó el inoculante en el lugar justo en donde se colocaron las semillas con el objeto de que al germinar las raíces quedaran en contacto íntimo con el *Rhizobium*. La cantidad de inóculo que se aplicó fue de al menos 10^9 microorganismos por g de compost. El primer riego se hizo con 600 ml de agua filtrada con el fin de que las sales de la solución nutritiva previamente preparada no afectaran la germinación. Los siguientes riegos se realizaron con la solución nutritiva basándose en la diferencia de pesos de las macetas de frijol con relación al peso inicial de la maceta húmeda. Las variables de respuesta analizadas fueron: cantidad de nódulos por planta, peso seco de los nódulos, producción de biomasa aérea y acumulación de nitrógeno por planta. Los nódulos fueron separados manualmente de cada raíz, se contaron, se deshidrataron hasta peso constante en un horno a 65° C (Fisher Scientific Isotemp Incubator) y finalmente se pesaron en una balanza analítica (OHAUS modelo Pioneer).

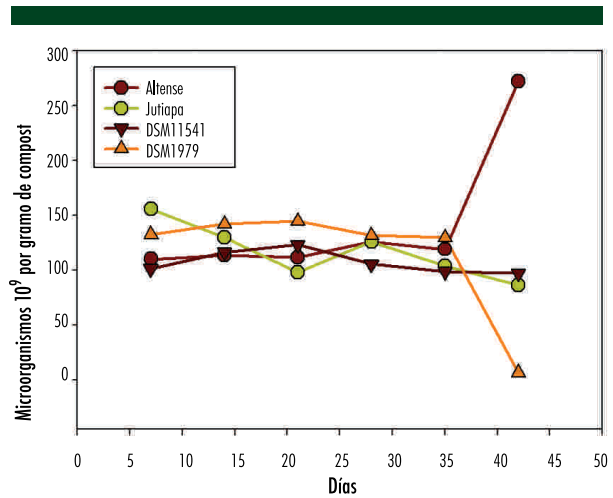
Ensayos de campo

Se llevaron a cabo en las estaciones experimentales de UVG ubicadas en los campus que UVG tienen en Sololá (Campus Altiplano) en campo abierto y Santa Lucía Cotzumalguapa (Campus Sur) en cultivo protegido en casa de malla. Se utilizó la variedad de frijol ICTA Hunapú en Altiplano y la variedad ICTA Ligero en Campus Sur. La unidad experimental consistió de 4 surcos de frijol de 3 m de largo. La variable de respuesta medida fue el rendimiento de frijol (kg/ha). La semilla se sembró a una distancia de 0.65 m entre surcos y 0.30 m entre plantas en Altiplano en tanto que en el Campus Sur a 0.50 m entre surcos y 0.30 m entre plantas, colocando dos semillas por postura. La inoculación con las cepas de *rhizobia* se llevó a cabo durante la siembra, en tanto que el nitrógeno inorgánico se aplicó dos semanas después de la siembra. Los factores evaluados incluyeron la cepa de *Rhizobium* y el nivel de nitrógeno (0, 30 y 60 kg N/ha). Se utilizó un arreglo en parcelas divididas en donde la parcela grande fue la cepa de *Rhizobium* y la sub-parcela fue el nivel de N, en un diseño en bloques al azar con cuatro repeticiones en Campus Altiplano y tres repeticiones en Campus Sur. En los ensayos se incluyeron en el diseño los controles respectivos.

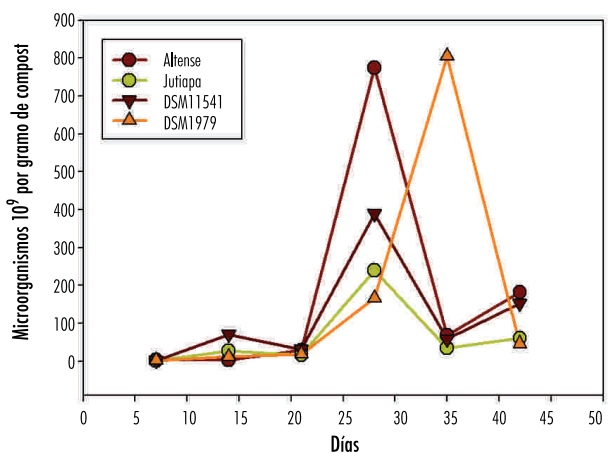
Resultados y discusión

Sobrevivencia de las cepas de rhizobia en compost

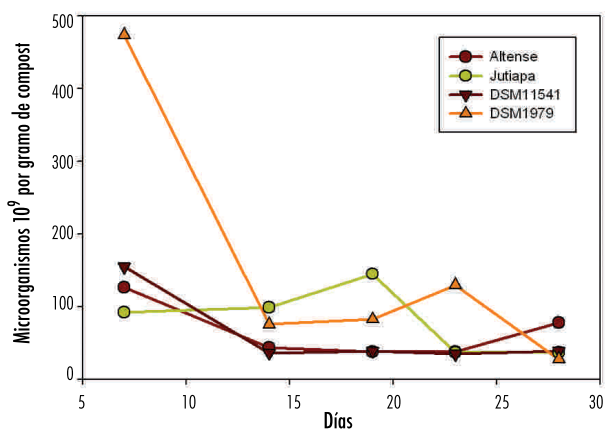
Los resultados se presentan en las Gráficas 1, 2 y 3 para tres diferentes temperaturas de almacenamiento.



Gráfica 1. Sobrevivencia a 25 °C



Gráfica 2. Sobrevivencia a 30 °C



Gráfica 3. Sobrevivencia a 35 °C

Se observa que la población se mantiene en todas las cepas. El aumento en la cepa Altense y la disminución en la cepa DSM1979 al final de la incubación a los 42 días no eran esperados y pudieran deberse a heterogeneidad en la muestra analizada. La diferencia entre cepas observada se debe a variaciones en los volúmenes y concentraciones durante la impregnación del soporte.

A la temperatura de 30 °C se observaron incrementos de la población microbiana entre los 30 a los 35 días para luego decrecer. Los valores mostrados para la cepa Altense y la DSM1979, de nuevo parecen puntos extremos causados por la heterogeneidad en la muestra analizada. Las concentraciones iniciales en esta prueba fueron menores que a 25 °C, sin embargo al finalizar el almacenamiento a los 42 días dichas concentraciones se encontraron en el mismo orden de magnitud.

A esta temperatura se notó una disminución paulatina hasta llegar a valores menores de 100×10^9 microorganismos por gramo de compost. Lo anterior indica un efecto de la temperatura sobre el crecimiento y estabilidad de las bacterias.

Algunos investigadores han publicado datos sobre la sobrevivencia de rhizobia en compost como soporte. *R. leguminosarum* var. *phaseoli* ISP23 e ISP42 sobrevivieron a 28 °C mejor en perlita un soporte mineral que en turba durante 180 días (Daza et al 2000). *R. etli* ISP42 sobrevivió adecuadamente por 180 días tanto en turba como en compost de residuos industriales de madera de corcho, manteniendo una concentración microbiana de 1×10^9 por gramo de soporte. En ambos soportes la sobrevivencia fue mejor que en perlita (Albareda et al 2008). *R. meliloti* Rmd 201 sobrevivió mejor en vermicompost del residuo lignocelulósico de la destilación del geranio por 180 días a 28 y 32 °C, que en carbón. A 36 °C la tasa de mortalidad microbiana fue muy alta (Kaira et al 2010).

Evaluación de las cepas aisladas a nivel de invernadero

A continuación se ilustran y comentan los resultados sobre la cantidad de nódulos formados, el peso seco de los mismos, el peso de la biomasa aérea y la cantidad de nitrógeno acumulado por planta.

• **Cantidad de nódulos:** los resultados se presentan en el Cuadro 1 en donde se ha anotado el número de nódulos por planta causado por las dos cepas de rhizobia aisladas y las dos cepas de referencia en las raíces de dos variedades de frijol.

Se observa que prácticamente no hubo formación de nódulos en los dos controles, lo cual se esperaba. En aquellos casos en donde hubo formación de nódulos posiblemente se debió a la presencia de rhizobia en la semilla, hecho comprobado previamente (Pérez-Ramírez et al 1988). Por otro lado, el análisis de variancia para las pruebas con inoculación encontró una diferencia significativa con respecto a la variedad de frijol ($F=7.63$, $p=0.0139$); la ICTA Altense igual a 191, como valor promedio de nódulos por planta, comparado con la ICTA ligero

igual a 103. Las diferencias para la cepa y la interacción entre ambos factores no fueron significativas.

• **Peso de nódulos:** los resultados se presentan en el Cuadro 1 entre paréntesis. El análisis de variancia para las pruebas con inoculación encontró una diferencia significativa con respecto a la variedad de frijol ($F=3.84$, $p=0.0678$); la ICTA Altense igual a 0.11 como valor promedio de gramos de nódulos por planta, comparado con la ICTA ligero igual a 0.08. Las diferencias para la cepa y la interacción entre ambos factores no fueron significativas. Las cifras obtenidas experimentalmente de la cantidad de nódulos y el peso seco de los mismos se encuentran en el orden de magnitud de estudios previos: 101 nódulos por planta empleando el *R. tropici* CIAT 899 y 15 diferentes variedades de frijol (Franco et al 2001); 78 nódulos por planta y 104 mg de peso seco del nódulo empleando seis cepas de rhizobia y cinco variedades de frijol (Kyei-Boahen et al 2005); 114 a 206 nódulos por planta empleando *R. tropici* CIAT 899 y PFR 81 y 120 a 170 mg de peso seco del nódulo (Mostasso et al 2002). También se encontró una interacción significativa entre variedad de frijol y la cepa empleadas en los ensayos (Kyei-Boahen et al 2005).

• **Biomasa aérea seca:** los resultados se encuentran en la Gráfica 4. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) en la variable de respuesta por parte de los efectos principales de los factores en estudio (variedad de frijol y cepa de *Rhizobium*) así como en su interacción al considerar en el análisis de variancia las pruebas con inoculación y los dos controles. Los resultados experimentales se encuentran dentro del mismo orden de magnitud reportados previamente, por ejemplo al emplear como inóculo diferentes mezclas de bacterias promotoras de crecimiento y el *R. tropici* CIAT 899 se obtuvo un valor medio de 2.16 g de biomasa aérea seca (Figuereido et al 2008).

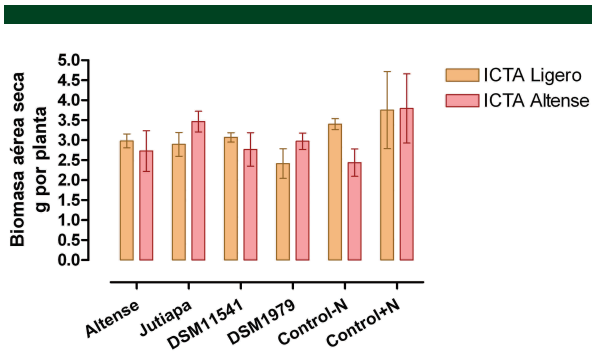
• **Acumulación de nitrógeno:** los resultados se encuentran en la Gráfica 5. El análisis de variancia para todas las pruebas encontró una diferencia significativa con respecto a los resultados del control con adición de nitrógeno inorgánico ($F=3.19$, $p=0.024$). El control que no recibió una aplicación de N produjo menor cantidad de biomasa y acumuló una menor cantidad de N con relación a los tratamientos inoculados y el tratamiento fertilizado con N cuando se utilizó la variedad ICTA Altense. Los resultados experimentales se encuentran dentro del mismo orden de magnitud reportados previamente, por ejemplo, al emplear como inóculo diferentes mezclas de bacterias promotoras de crecimiento y el *R. tropici* CIAT 899 se obtuvo un valor medio de 88.6 mg de N por planta (Figuereido et al 2008); y al utilizar seis cepas de rhizobia y cinco variedades de frijol se obtuvieron cifras entre 34.9 y 79.8 mg N por planta (Kyei-Boahen et al 2005).

Rendimiento obtenido en ensayos de campo

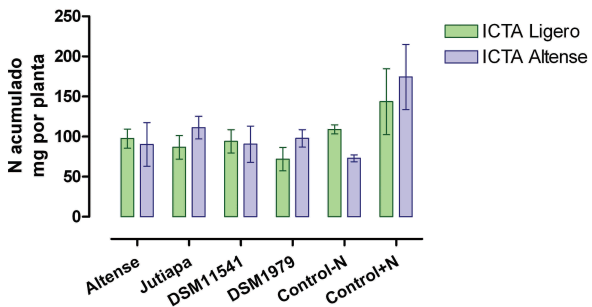
Los resultados se presentan en una secuencia que permite observar el rendimiento frijol en los dos sitios ensayados; primero, una comparación entre el control y el ensayo con la adición de 60 kg de N por ha; segundo, una comparación entre el control y las pruebas con las diferentes cepas de *Rhizobium*; y tercero, una comparación entre la equivalencia entre la fertilización con nitrógeno inorgánico y las pruebas con BNF más adición de nitrógeno inorgánico.

Cuadro 1. Cantidad de nódulos formados y peso seco de los nódulos en mg (entre paréntesis) por planta en variedades de frijol

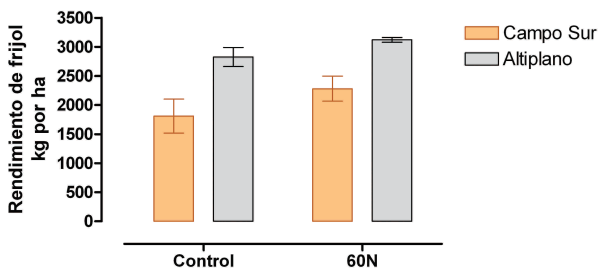
Cepa	Variedad	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Altense	ICTA ligero	181(112.4)	105(73.2)	85(106.0)
Altense	ICTA Altense	179(64.0)	90(55.0)	136(95.1)
Jutiapa	ICTA ligero	109(100.3)	90(87.7)	96(53.6)
Jutiapa	ICTA Altense	207(123.9)	140(70.4)	410(191.0)
DSM11541	ICTA ligero	132(104.4)	127(89.1)	69(36.5)
DSM11541	ICTA Altense	52(58.5)	308(119.3)	297(180.0)
DSM1979	ICTA ligero	56(82.2)	75(71.0)	115(50.8)
DSM1979	ICTA Altense	140(137.5)	194(91.0)	140(138.5)
Control-N	ICTA ligero	3(2.0)	0(0)	0(0)
Control-N	ICTA Altense	7(4.3)	0(0)	0(0)
Control+N	ICTA ligero	0(0)	8(5.0)	8(5.0)
Control+N	ICTA Altense	0(0)	5(3.1)	0(0)



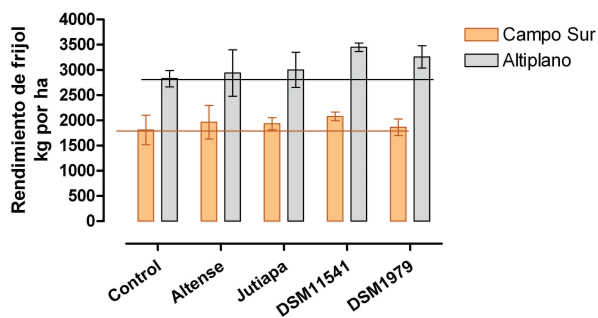
Gráfica 4. Peso seco de la biomasa aérea por planta



Gráfica 5. Nitrógeno en mg acumulado por planta



Gráfica 6. Efecto de la fertilización sobre el rendimiento de frijol en kg por ha



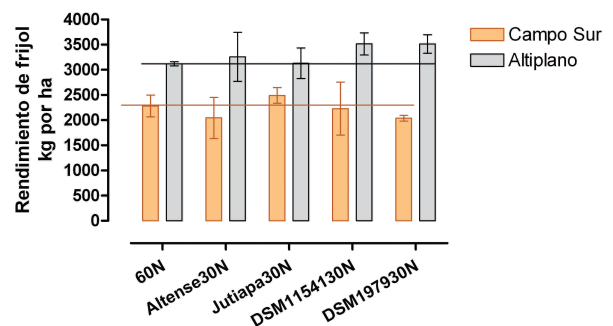
Gráfica 7. Efecto de la inoculación con *rhizobia* sobre el rendimiento de frijol en kg por ha

especies de *Rhizobium* y que definitivamente existe una interacción selectiva entre planta y microorganismo (Martínez-Romero 2003). Por otro lado, las dos variedades de frijol empleadas poseían distintos ciclos de producción, 75 días para el ICTA Ligerio y 180 días para el ICTA Altense, bajo diferentes condiciones de cultivo.

• **Efecto sobre el rendimiento por la adición de 60 kg de N por ha:** los resultados se ilustran en la Gráfica 6. El análisis de variancia indicó que los rendimientos en Altiplano fueron significativamente superiores a los de Campo Sur ($F=21.54$, $p=0.0017$). Por otro lado, el efecto de la fertilización considerado por sitio fue significativo respecto al control ($t: 3.596$, $t: 2.967$, $p<0.05$, $p<0.05$, Altiplano, Campo Sur respectivamente).

• **Efecto sobre el rendimiento por la inoculación con *rhizobia*:** los resultados se ilustran en la Gráfica 7. En la gráfica se observa el trazo de dos líneas que permiten comparar los controles con barras del mismo color, las cuales identifica el rendimiento obtenido con las diferentes cepas de *rhizobia*. El análisis de variancia indicó que los rendimientos en Altiplano fueron significativamente superiores a los de Campo Sur ($F=51.58$, $p<0.001$). Por otro lado, el efecto de la inoculación considerado por sitio fue significativo respecto al control para las cepas Jutiapa y DSM 11541 y DSM 1979 ($t: 2.942$, $t: 3.777$, $t: 3.846$, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.01$).

• **Rendimiento obtenido al comparar equivalentes entre fertilización e inoculación:** los resultados se observan en la Gráfica 8. Al comparar el rendimiento control con los rendimientos logrados con ensayos con inoculación y adición de nitrógeno, se observa, por lo menos para Altiplano, que se logran rendimientos similares o superiores. El análisis de variancia indicó que los rendimientos en Altiplano fueron significativamente superiores a los de Campo Sur ($F=31.78$, $p<0.001$). Por otro lado, el efecto de la inoculación más 30 kg de N por ha para el Altiplano fue significativo respecto al rendimiento con 60 kg de N por ha. para las cepas DSM 11541 y DSM 1979 ($t: 2.972$, $t: 3.411$, $p<0.05$, $p<0.05$, respectivamente).



Gráfica 8. Rendimiento de frijol en kg por ha para ensayos con inoculación y adición de nitrógeno

Es pertinente indicar que en todos los casos el rendimiento observado con la variedad de frijol seleccionada para el Altiplano resultó con rendimientos superiores a los obtenidos en Campo Sur con la variedad de frijol allí empleada. Lo anterior no debe ser causa de ansiedades ya que es ampliamente conocido que el frijol es un hospedero promiscuo para un gran número de

Los datos de rendimiento obtenidos en los experimentos están en el orden de magnitud de resultados previos. Por ejemplo, Hungria et al (2000) empleando la variedad de frijol Carioca y un inóculo de *R. tropici* PRF 81, en dos cosechas en años consecutivos lograron aumentar el rendimiento del control que fue de 2,772 kg por ha en un 19 %, comparado con el aumento



Gráfica 9. Ensayo en el Campo de Altiplano, Aldea El Tablón, Sololá

logrado por fertilización con 60 kg N por ha que fue de 23 %. Daba y Haile (2002) empleando como inoculante una mezcla de las cepas CIAT 274, 384 y 632 en un soporte de turba obtuvieron el rendimiento de cinco variedades de frijol, incluyendo en el ensayo un control y una prueba con la adición de 23 kg N por ha. No todas las variedades de frijol respondieron de igual forma, pero en algunas de ellas el incremento en el rendimiento fue significativo ya que la inoculación aumentó el rendimiento del control que fue de 1,636 kg por ha en un 78 %; en cambio la adición de nitrógeno solo lo aumentó en un 40 %. Tajini et al (2008) encontraron una interacción significativa entre la cepa de *Rhizobium* y la variedad de frijol empleados en el rendimiento logrado de dos variedades de frijol y el *R. tropici* CIAT 899 y el *R. etli* 12a3. Elcock et al (2010) reportaron un aumento del 7% al emplear *rhizobia* en turba con una variedad de frijol productiva ya que el rendimiento del control fue de 2,980 kg por ha.

El efecto de sinergia sobre el rendimiento entre la inoculación y la adición de menores cantidades de fertilizante inorgánico ya se había informado previamente (Hungria et al 2003) y los resultados encontrados lo corroboran.

La gráfica 9 muestra una vista parcial del ensayo en Altiplano y la gráfica 10 el desarrollo de la planta en Campo Sur.

Conclusiones

El compost elaborado a partir de desechos de caña de azúcar demostró ser un soporte adecuado para la biomasa de cepas de *Rhizobium*.

Los ensayos de sobrevivencia demostraron que las cepas de *Rhizobium* ensayadas sobre el compost fueron capaces de sobrevivir a tres temperaturas diferentes 25, 30 y 35°C por 42 días y manteniendo una densidad microbiana adecuada.

A nivel de invernadero se encontró una diferencia significativa entre las variedades de frijol empleadas respecto a la cantidad y el peso de los nódulos formados, siendo la variedad de frijol Altense en donde se obtuvieron los mayores valores. Por otro lado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos de biomasa aérea seca. El control que no recibió una aplicación de N produjo menor cantidad de biomasa y acumuló una menor cantidad de N con relación a



Gráfica 10. Detalle del desarrollo de la planta en Campo Sur, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla

los tratamientos inoculados y el tratamiento fertilizado con N cuando se utilizó la variedad ICTA Altense.

A nivel de campo en todos los casos el rendimiento observado con la variedad de frijol seleccionada para el Altiplano resultó con rendimientos superiores a los obtenidos en Campo Sur con la variedad de frijol ahí empleada. Se determinó un efecto positivo significativo sobre el rendimiento como efecto de la inoculación con cualquier cepa de *Rhizobium* acompañados o no de la aplicación de fertilizante inorgánico. Se encontró un efecto de sinergia entre la inoculación y la adición de fertilizante inorgánico.

Se recomienda la inoculación de cepas de *Rhizobium* y la adición de 30 kg de N por ha con el objeto de maximizar el rendimiento del frijol cosechado.

Agradecimiento

La experimentación se llevó a cabo por el financiamiento parcial del Programa *Food for Progress 10* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América y del Proyecto FODECYT 43-2008 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT).

Bibliografía

- Aguilar OM, O Riva, E Peltzer (2004) *Analysis of Rhizobium etli and of its symbiosis with wild Phaseolus vulgaris supports coevolution in centers of host diversification* PNAS **101**: 13548-13553
- Albareda M, DN Rodríguez-Navarro, M Camacho, FJ Temprano (2008) *Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations* Soil Biol Biochem **40**: 2771-2779
- Amarger N (2001) *Rhizobia in the field* Adv Agron **73**: 109-168
- Berg G (2009) *Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture* Appl Microbiol Biotechnol **84**: 11-18
- Broughton WJ, G Hernández, M Blair, S Beebe, Gepts P, Vanderleyden J (2003) *Beans (Phaseolus spp.) - model food legumes* Plant Soil **252**: 55-128
- Daba S, M Haile (2002) *Effects of rhizobial inoculant and nitrogen fertilizer on yield and nodulation of common bean under intercropped conditions* J Plant Nutr **25**: 1443-1455
- Daza A, C Santamaría, DN Rodríguez-Navarro, M Camacho, R Orive, FJ Temprano (2000) *Perlite as a carrier for bacterial inoculants* Soil Biol Biochem **32**: 567-572
- Deaker R, RJ Roughley, IR Kennedy (2004) *Legume seed inoculation technology-a review* Soil Biol Biochem **36**: 1275-1288

- Elkoca E, M Turan, MF Donmez (2010) *Effects of single, dual and triple inoculations with Bacillus subtilis, Bacillus megaterium and rhizobium leguminosarum bv phaseoli on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (Phaseolus vulgaris L. cv. Elcocka-05)* J Plant Nutr **33**: 2104-2119
- Figueiredo M, C Martinez, H Burity, C Chanway (2008) *Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (Phaseolus vulgaris L.)* World J Microbiol Biotechnol **24**: 1187-1193
- Franco A, Döbereiner JA (1994) *Biologia do solo e sustentabilidade dos solos tropicais* Summa Phytopathol **20**: 68-74.
- Franco MC, Cassini ST, V Rodrigues-Oliveira, C Vieira, SM Tsai, CD Cruz (2001) *Combining ability for nodulation in common bean (Phaseolus vulgaris L.) genotypes from Andean and Middle American gene pools* Euphytica **118**: 265-270
- Herridge DF, MB Peoples, RM Boddey (2008) *Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems* Plant Soil **311**: 1-18
- Hungria M, DdS Andrade, LMdO Chueire, A Probanza, FJ Gutierrez-Mañero, M Megías (2000) *Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobia from Brazil* Soil Biology & Biochemistry **32**: 1515-1528
- Hungria M, RJ Campo, IC Mendes (2003) *Benefits of inoculation of the common bean (Phaseolus vulgaris) crop with efficient and competitive Rhizobium tropici strains* Biol Fertil Soils **39**: 88-93
- Kaira A, M Chandra, A Awasthi, A Singh, S Khanuja (2010) *Natural compounds enhancing growth and survival of rhizobial inoculants in vermicompost-based formulations* Biol Fertil Soils **46**: 521-524
- Kyei-Boahen S, T. Nleya, R Hynes, FL Walley (2005) *Single and Multistrain Rhizobial Inocula for Pinto and Black Bean Cultivars* J Plant Nutr **28**: 1679-1692
- Lindström K, M Murwira, A Willems, N Altier (2010) *The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia* Res Microbiol **161**: 453-463
- Martínez-Romero, E (2003) *Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives* Plant Soil **252**: 11-23
- Mostasso L, FL Mostasso, BG Dias, MAT Vargas, M Hungria (2002) *Selection of bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerradas* Field Crops Res **73**: 121-132
- Pérez-Ramírez, NO, MA Rogel, E Wang, JZ Castellanos, E Martínez-Romero (1998) *Seeds of Phaseolus vulgaris bean carry Rhizobium etli FEMS* Microbiol Ecol **26**: 289-296
- Singh JS, VC Pandey, DP Singh (2011) *Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development* Agric Ecosys Environ **140**: 339-353
- Somasegaran P, HJ Hoben (1994) *Handbook for Rhizobia* Springer-Verlag
- Tajini F, JJ Drevon, L Lamouchi, M Aouani, M Trabelsi (2008) *Response of common bean lines to inoculation: comparison between the Rhizobium tropici CIAT899 and the native Rhizobium etli 12a3 and their persistence in Tunisian soils* World J Microbiol Biotechnol **24**: 407-417