



*Universidad Nacional de Loja*

*Área Agropecuaria y los Recursos Naturales Renovables*

**INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BACTERIAS  
DIAZOTRÓFICAS EN GENOTIPOS DE FRÉJOL COMÚN EN  
LA HOYA DE LOJA”.**

Tesis previa a la obtención del  
Título de Ingeniero Agrónomo

**AUTORES**

*María de los Angeles Ochoa Tapia*

*Enrique Vinicio Ruilova Vásquez*

**DIRECTOR**

*Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.*

Loja-Ecuador

2014

**“DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BACTERIAS  
DIAZOTRÓFICAS ENGENOTIPOS DE FRÉJOL COMÚN EN LA  
HOYA DE LOJA”**

**TESIS**


Presentada al Tribunal de Grado como requisito parcial para obtener el Título  
de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**


en el

ÁREA AGROPECUARIA DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

APROBADA:



Ing. Gilberto Álvarez Cajas  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Ing. Zoila Zaruma, Mg. Sc  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**



Ing. Paulina Fernández Guarnizo  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**

Loja-Ecuador

2014

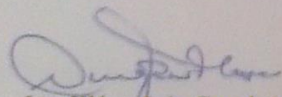
## CERTIFICACIÓN

Ing. Kléver Iván Granda Mora. Mg. Sc.  
DIRECTOR DE TESIS

### CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulado "DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN GENOTIPOS DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA", de autoría de los señores egresados de la Carrera de Ingeniería Agronómica: María de los Angeles Ochoa Tapia y Enrique Vinicio Ruilova Vásquez, ha sido desarrollado de acuerdo a las actividades de investigación previstas, las mismas que cumplen con la planificación, cronograma, metodologías y requisitos legales exigidos por el Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja. Por lo expuesto, queda autorizada la presentación para fines legales.

Loja, 10 de Junio de 2014



Ing. Kléver Iván Granda Mora. Mg. Sc.  
DIRECTOR DE TESIS

Loja-Ecuador  
2014

## AUTORIA

NOSOTROS, María de los Angeles Ochoa Tapia y Enrique Vinicio Ruilova Vásquez, declaramos ser autores del presente trabajo de Tesis y eximimos expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente aceptamos y autorizamos a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de nuestra Tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autor: María de los Angeles Ochoa Tapia

Firma: 

Cedula: 1104385230

Fecha: 30 de Junio de 2014

Autor: Enrique Vinicio Ruilova Vásquez

Firma: 

Cedula: 0705369056

Fecha: 30 de Junio de 2014

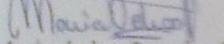
**CARTA DE AUTORIZACION DE TESIS POR PARTE DE OS AUTORES**  
**PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y**  
**PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Nosotros, Maria de los Angeles Ochoa Tapia y Enrique Vinicio Ruilova Vásquez, declaramos ser autores de la Tesis titulada "DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN GENOTIPOS DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA". Como requisito para obtener el grado de : Ingeniero Agrónomo, autorizamos al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Registro Digital Institucional:

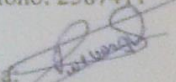
Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para la constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los treinta días del mes de junio del dos mil catorce, firman os autores.

Firma:   
Autor: Maria de los Angeles Ochoa Tapia  
Cedula: 1104385230  
Direccion: Tebaida baja  
Telefono: 2587411

Correo electrónico: maryjean8a@hotmail.com  
Celular 079208975

Firma:   
Autor: Enrique Vinicio Ruilova Vásquez  
Cedula: 0705369056  
Dirección: Tebaida baja  
Celular: 0982683215-0992866529

Correo electrónico: vruilova@hotmail.com

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

Director de tesis: Ing. Kléver Iván Granda Mora, Mg. Sc.  
Tribunal de grado: Ing. Gilberto Alvarez Cajas  
Ing. Zoila Zaruma, Mg. Sc  
Ing. Paulina Fernández Guarnizo

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestro sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja y de manera especial al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, Carrera de Ingeniería Agronómica, por habernos acogido durante la formación académica; de igual forma al Ing. Kléver Iván Granda Mora y Dr. Roldán Torres Gutiérrez por su valiosa orientación y desarrollo de la investigación para logro de los objetivos propuestos.

**Los Autores**



## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico con mucho cariño a mi familia por todo su apoyo durante mi formación profesional, a mis padres, hermanos y sobrinas por ser el pilar fundamental en cada momento de desarrollo y culminación del trabajo.

### **María de los Angeles Ochoa Tapia**

A Dios, por iluminarme siempre, a mi padre y gran amigo Gilbert, a mi querida madre Luya, por enseñarme que con sacrificio se cumplen las metas, a mis hermanos Silvana y Ronny por su apoyo incondicional, a mis sobrinos Ivanna y Sebastián, por ser el pilar fundamental en estos seis años de estudios, por el sacrificio, confianza y apoyo incondicional en esta ardua lucha por cumplir esta meta.

A toda mi familia y amigos por esas palabras de aliento constante, de forma especial a mis tíos y grandes amigos Luis Vásquez y Fernando Torres quienes creyeron en mí y armaron su hombro a mi favor, mil gracias por todo.

### **Enrique Vinicio Ruilova Vásquez**

## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con la finalidad de determinar la eficiencia de bacterias diazotróficas sobre parámetros de nodulación, características morfológicas, biomasa, componentes del rendimiento y rendimiento agrícola en fréjol rojo y fréjol negro. Se seleccionaron los mejores aislados de bacterias obtenidas en condiciones de laboratorio. El total de tratamientos empleados en la investigación fue de cinco: T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilización y T6-testigo. A nivel de campo se empleó un diseño de bloques al azar con 4 réplicas por tratamiento. Previamente a la siembra se elaboró el inóculo para posteriormente realizar la peletización de la semilla de los genotipos en estudio. Para cada uno de los parámetros a evaluar, se seleccionaron 5 plantas al azar de cada réplica de los tratamientos. Las evaluaciones realizadas inicialmente fueron altura de plantas y número de hojas a los 7, 14 y 21 días después de la siembra (DDS).

A los 30 y 60 DDS, se evaluaron los parámetros de nodulación (número de nódulos-NN, peso fresco de los nódulos-PFN y el peso seco de los nódulos-PSN) en fréjol rojo y fréjol negro. Del material recolectado para evaluar los parámetros de nodulación, se extrajo la raíz y la parte foliar para determinar el parámetro de biomasa (peso fresco del follaje-PFF, peso seco del follaje-PSF, peso fresco de la raíz-PFR y peso seco de la raíz-PSR).

Una vez obtenidos los parámetros de nodulación, se llevaron a laboratorio. Para la segunda evaluación realizada a los 60 DDS, se siguió el mismo procedimiento.

Los componentes del rendimiento se los obtuvo al final de la fase de campo, para lo cual fue necesario tomar 5 plantas al azar con el fin de evaluar: longitud de vainas por planta-LVP, número de granos por vaina-NGV, número de granos por planta-NGP, peso de vainas por planta-PVP, número de vainas por planta-NVP y peso de granos por planta-PGP. El rendimiento agrícola se lo obtuvo tomando 40 plantas por réplica de cada tratamiento, se extrajo el grano y se lo pesó; los valores obtenidos se los extrapolaron a  $\text{TM ha}^{-1}$ .

En cuanto al análisis físico, químico y microbiológico, se lo realizó al inicio y al final del experimento, en el cual se seleccionó 1 muestra de suelo de 1 kg por cada uno de los



tratamientos, al final se mezclaron para obtener una muestra homogénea de cada variedad. Los análisis físico-químico se lo realizó en el laboratorio de Suelo, Agua y Foliare de AGROCALIDAD y en el Laboratorio de Análisis Físico, Químico de Suelos, Aguas y Bromatología de la Universidad Nacional de Loja. El análisis microbiológico de bacterias, hongos y actinomicetos se lo desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Loja, en donde se realizaron diluciones cuantitativas de las muestras de suelo, y para la siembra de cada microorganismo se elaboraron medios de cultivo específicos para cada uno.

## SUMMARY

This research was conducted in order to determine efficiency of diazotrophic bacteria on nodulation parameters, morphological, biomass, yield components and crop yield in red beans and black beans. Best bacterial isolates obtained under laboratory conditions were selected. The total number of treatments used in the study was five: T1-*Rhizobium etli* bv *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilization and T6-control. A field-level block design with 4 replicates randomly per treatment was used. Before sowing the seed for later perform pelletizing seed genotypes under study was developed. For each of the parameters evaluated 5 randomly selected plants in each replicate were chosen treatments. Evaluations were performed initially plant height and number of leaves at 7, 14 and 21 days after sowing (DAS).

At 30 and 60 DAS, the parameters of nodulation (nodule number, NN, nodule fresh weight and dry-weight NFP lymph-PSN) red beans and black beans were evaluated. Collected to evaluate the parameters of item nodulation, root and leaf portion was extracted to determine the parameter of biomass (fresh weight-PFF foliage, foliage dry weight-PSF, fresh root weight and dry-weight PFR root-PSR). Once the parameters obtained nodulation is for all the laboratory will. For the second evaluation at 60 DDS, the same procedure was followed.

Yield components were obtained at the end of the field phase, it was necessary to take 5 random plants in order to assess: length-LVP pods per plant, number of grains per pod-NGV, number of grains by plant-NGP, weight of pods per plant-PVP, number of pods per plant and NVP-grain weight per plant-PGP. Agricultural output is obtained by taking the 40 plants per replicate of each treatment, the grain was removed and weighed it; the values obtained were extrapolated TM ha<sup>-1</sup>.

Regarding the physical, chemical and microbiological analysis, it was made at the beginning and end of the experiment, in which one sample of soil from 1 kg was selected for each of the treatments, eventually mixed to obtain a homogeneous sample of each variety. The physico-chemical analysis was conducted in the laboratory of Soil, Water and Foliar AGROCALIDAD and Physical Analysis Laboratory, Chemical Soil, Water and Food Science, National University of Loja. Microbiological testing of

bacteria, fungi and actinomycetes it developed in the Laboratory of Plant Protection, National University of Loja, where quantitative dilutions of soil samples were performed, and the planting of each organism specific culture media were prepared for each.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
APROBACION.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. GENERALIDADES DE LAS LEGUMINOSAS.....	3
2.1.1. Fréjol.....	3
2.1.1.1. <u>Clasificación taxonómica</u> .....	3
2.1.1.2. <u>Historia e importancia</u> .....	4
2.1.1.3. <u>Características agronómicas</u> .....	5
2.1.1.4. <u>Requerimientos edafo-climáticos</u> .....	5
2.1.1.5. <u>Fases fenológicas</u> .....	7
2.1.1.6. <u>Rendimiento</u> .....	7
2.2. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO.....	8
2.2.1. Ciclo del Nitrógeno.....	9
2.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN).....	11
2.3.1. Microorganismos diazotróficos simbióticos.....	12
2.4. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>RHIZOBIUM</i> .....	13
2.4.1. Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i> .....	14
2.4.2. Descripción microscópica y macroscópica.....	14
2.4.3. Metabolismo de <i>Rhizobium</i> .....	14
2.4.4. Ecología de <i>Rhizobium</i> .....	15
2.4.5. Simbiosis, infección y formación de nódulos.....	16
2.4.5.1. <u>Flavonoides</u> .....	17
2.4.5.2. <u>Ácido indol acético (AIA)</u> .....	17
2.4.5.3. <u>Papel de la Nitrogenasa</u> .....	18

2.5.	EFFECTO DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LA CALIDAD DE LOS SUELOS.....	19
2.5.1.	Efecto de <i>Rhizobium</i> en suelos agrícolas.....	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1.	DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	21
3.1.1.	Ubicación Política.....	21
3.1.2.	Ubicación Geográfica.....	22
3.1.3.	Ubicación Ecológica.....	22
3.2.	MATERIALES.....	22
3.2.1.	Materiales y equipos.....	22
3.3.	METODOLOGÍA.....	23
3.3.1.	METODOLOGÍA PARA EL PRIMER OBJETIVO.....	23
3.3.1.1.	<u>Montaje del Ensayo</u> .....	24
3.3.1.2.	<u>Elaboración del inóculo y peletización en las semillas de fréjol común</u> .....	25
3.3.1.3.	<u>Determinación de los parámetros de nodulación</u> .....	26
3.3.2.	METODOLOGÍA PARA EL SEGUNDO OBJETIVO.....	26
3.3.2.1.	<u>Evaluación de los parámetros morfológicos y biomasa</u> ...	26
3.3.2.2.	<u>Evaluación de los componentes del rendimiento, nitrógeno total y rendimiento agrícola de los genotipos de frejol común</u> .....	26
3.3.3.	METODOLOGÍA PARA EL TERCER OBJETIVO.....	27
3.3.3.1.	<u>Análisis químico</u> .....	27
3.3.3.2.	<u>Análisis físico</u> .....	33
3.3.3.3.	<u>Análisis microbiológico</u> .....	34
3.3.4.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
3.4.1.	Hipótesis Estadísticas.....	38
IV.	RESULTADOS.....	39
4.1.	DETERMINAR EL EFECTO DE AISLADOS DE <i>RHIZOBIUM</i> NATIVOS DE LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR SOBRE PARÁMETROS DE NODULACIÓN DE LOS GENOTIPOS FRÉJOL ROJO, NEGRO Y BLANCO BELÉN EN CONDICIONES DE CAMPO.....	39

4.1.1. Efecto de los aislados bacterianos sobre los parámetros de nodulación.....	40
4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS AISLADOS DE <i>RHIZOBIUM</i> SOBRE LOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS, BIOMASA, COMPONENTES DE RENDIMIENTO, CONTENIDO TOTAL DE N Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE LOS GENOTIPOS DE FREJOL, OBJETOS DE ESTUDIO.....	44
4.2.1. Características morfológicas.....	44
4.2.2. Biomasa.....	48
4.2.3. Componentes del rendimiento.....	52
4.2.4. Contenido total de nitrógeno.....	56
4.2.5. Rendimiento agrícola.....	57
4.3. EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE LOS AISLADOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO EN EL ÁREA DE EXPERIMENTACIÓN.....	61
4.3.1. Influencia de los aislados en las propiedades físicas del suelo.....	61
4.3.2. Influencia de los aislados en las propiedades químicas del suelo.....	62
4.3.3. Evaluación microbiológica.....	62
V. DISCUSIÓN.....	65
VI. CONCLUSIONES.....	72
VII. RECOMENDACIONES.....	74
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	75

## INDICE DE TABLAS

<b>Nro.</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Fases fenológicas del cultivo de fréjol.....	7
<b>2</b>	Cepas bacterianas utilizadas en el experimento en condiciones de campo.....	24
<b>3</b>	Requerimientos edafo-climáticos de los genotipos de fréjol empleados en la investigación en condiciones de campo.....	24
<b>4</b>	Parámetros evaluados en el análisis químico.....	28
<b>5</b>	Parámetros de interpretación de resultados de pH.....	29
<b>6</b>	Parámetros de interpretación de resultados de conductividad eléctrica Región Costa-Sierra.....	29
<b>7</b>	Parámetros de interpretación de resultados del porcentaje de materia orgánica.....	29
<b>8</b>	Parámetros de interpretación de resultados del porcentaje de nitrógeno total.....	30
<b>9</b>	Parámetros de interpretación de resultados de fósforo.....	31
<b>10</b>	Cuadro de calibración del espectrofotómetro.....	31
<b>11</b>	Parámetros de interpretación de resultados de potasio, calcio y magnesio.....	32
<b>12</b>	Condiciones y concentraciones para lecturas en espectrofotómetro.....	32
<b>13</b>	Parámetros de interpretación de resultados de hierro, cobre y manganeso.....	32
<b>14</b>	Parámetros de interpretación de resultados de clase textural.....	33
<b>15</b>	Cuadro de precipitación promedio en la hoya de Loja.....	39
<b>16</b>	Comparación de los genotipos frejol rojo y negro respecto a los parámetros morfológicos.....	47
<b>17</b>	Contenido de nitrógeno total en grano en los genotipos fréjol rojo y fréjol negro...	56
<b>18</b>	Contenido de proteína bruta en grano en genotipos fréjol rojo y fréjol negro.....	57
<b>19</b>	Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol rojo.....	59
<b>20</b>	Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol negro.....	60
<b>21</b>	Unidades formadoras de colonias en los análisis de suelo realizados en el lugar del experimento.....	63



## INDICE DE FIGURAS

Nro.	Página	
1	Mapa de ubicación del área de estudio. <b>A</b> Contexto de la República del Ecuador. <b>B.</b> Contexto de la Provincia de Loja. <b>C.</b> Contexto de la Universidad Nacional de Loja.....	21
2	Esquema para la siembra de microorganismos.....	35
3	Croquis del diseño experimental de la investigación.....	37
4	Número de nódulos totales a los 30 y 60 DDS del genotipo fréjol rojo. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	41
5	Número de nódulos totales a los 30 y 60 DDS del genotipo fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	41
6	Peso fresco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol rojo. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	42
7	Peso fresco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	43
8	Peso seco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol rojo. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	43
9	Peso seco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	44
10	Altura de plantas en el genotipo fréjol rojo a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos:	

	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	45
11	Altura de plantas en el genotipo fréjol negro a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	46
12	Número de hojas en fréjol rojo a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	46
13	Número de hojas en fréjol negro a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	47
14	Peso fresco del follaje en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	48
15	Peso fresco del follaje en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	49
16	Peso fresco de la raíz en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	49
17	Peso fresco de la raíz en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	50
18	Peso seco de follaje en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3),	

	Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	50
<b>19</b>	Peso seco de follaje en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	51
<b>20</b>	Peso seco de raíz en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	51
<b>21</b>	Peso seco de raíz en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	52
<b>22</b>	Longitud de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	53
<b>23</b>	Número de granos por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	53
<b>24</b>	Número de granos por vaina en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	54
<b>25</b>	Peso de granos por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$ Tukey.....	55
<b>26</b>	Peso de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para	

	p<0,05 Tukey.....	55
<b>27</b>	Número de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> <i>bv. mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para p<0,05 Tukey.....	56
<b>28</b>	Rendimiento agrícola en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: <i>Rhizobium etli</i> <i>bv. mimosae</i> (T1), <i>Rhizobium phaseoli</i> (T2), <i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3), Fertilización (T5), Testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para p<0,05 Tukey.....	57
<b>29</b>	Comparación de medias para rendimiento en fréjol rojo y fréjol negro. Letras desiguales en las columnas difieren para p<0,05 Tukey.....	58
<b>30</b>	Análisis de bacterias en fréjol rojo y fréjol negro en la hoya de Loja.....	63
<b>31</b>	Análisis de hongos en fréjol rojo y fréjol negro en la hoya de Loja.....	64
<b>32</b>	Análisis de actinomycetos en fréjol rojo y fréjol negro en la hoya de Loja.....	64

## INDICE DE ANEXOS

Nro.		Página
1	Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos del suelo.....	86
2	Preparación de soluciones para determinar el porcentaje de Materia Orgánica.....	87
3	Preparación de soluciones para determinar Nitrógeno Amoniacal en Suelos.....	88
4	Preparación de soluciones para determinar fósforo en Suelos.....	88
5	Preparación de soluciones para determinar potasio, calcio y magnesio en Suelos....	89
6	Identificación de colonias bacterianas en placa.....	89
7	Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol rojo.....	90
8	Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol negro.....	94
9	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	98
10	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	99
11	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol negro en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	100
12	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol negro en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	101
13	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso seco, con tratamientos, muestras y réplica.....	102
14	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	103
15	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol negro en peso seco, con tratamientos, muestras y réplica.....	104
16	Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol negro en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.....	105
17	Prueba de Tukey HSD para fréjol rojo con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de <i>Rhizobium</i> sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.....	106
18	Prueba de Tukey HSD para fréjol negro con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de <i>Rhizobium</i> sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.....	106

<b>19</b>	Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol rojo sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 30 DDS.....	107
<b>20</b>	Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 30 DDS.....	107
<b>21</b>	Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol rojo sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 60 DDS.....	108
<b>22</b>	Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 60 DDS.....	108
<b>23</b>	Prueba de Tukey HSD entre ambas variedades fréjol rojo y fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa.....	109
<b>24</b>	Tríptico de día de campo.....	110
<b>25</b>	Análisis del % de Nitrógeno y % de Proteína Bruta en fréjol rojo y fréjol negro...	112
<b>26</b>	Primer análisis físico-químico de suelo en el sector de Moraspamba “La Argelia”	116
<b>27</b>	Segundo análisis físico-químico de suelo en el sector de Moraspamba “La Argelia”	118
<b>28</b>	Evidencia fotográfica.....	119

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, un ecosistema saludable para las generaciones futuras y una producción sostenible de alimentos son cuestiones importantes para la sociedad mundial; por lo tanto es indispensable buscar alternativas para que el aumento de la producción agrícola esté garantizado así como la calidad ambiental, ya que la utilización masiva, a nivel mundial, de fertilizantes nitrogenados, no sólo afecta a la economía desde el punto de vista de su adquisición, sino que trae desequilibrios en el suelo perjudicando su fertilidad, por las grandes cantidades de nitrógeno aplicado (aproximadamente  $77 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno año<sup>-1</sup> como fertilizante).

En el Ecuador y particularmente en la provincia de Loja, la agricultura depende en gran medida del uso de fertilizantes químicos para mantener altas producciones agrícolas, es por ello, pertinente destacar la importancia de las leguminosas y principalmente del fréjol, ya que este constituye parte fundamental en la dieta humana de pequeños productores y familias ecuatorianas de escasos recursos económicos por ser fuente de proteínas y carbohidratos. Según el INEC (2011), del total del área de cultivos transitorios sembrada en el Ecuador, el fréjol tierno ocupa 5 748 ha con una producción de 11 429 TM; y en la provincia de Loja, la producción de fréjol en grano seco abarca 350 ha con un rendimiento de 177 TM y en vaina tierna 302 ha con un rendimiento de 249 TM.

Además de la importancia alimenticia destacada anteriormente, el beneficio ecológico que brinda este cultivo, es que forma parte esencial dentro de los agro-ecosistemas, debido a que reducen requerimientos de N químico, proveen N en rotación, asociación y cobertura, mejoran la calidad del suelo, contribuyen a recuperar suelos ácidos, mejoran el ciclo del fósforo, mejoran el control de plagas, controlan malezas (cobertura) y mejoran la captura de carbono.

Los beneficios mencionados anteriormente, se deben principalmente, a la característica que posee el fréjol en el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN), el mismo que consiste en establecer una simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* y captar N<sub>2</sub> de la atmósfera para transformarlo en formas asimilables para la planta (nitratos y nitritos). Dependiendo de la eficiencia en la interacción, se pueden alcanzar niveles promedio de fijación de 300 kg ha año<sup>-1</sup>; en el caso del fréjol la cantidad de nitrógeno fijado es de 25-100 kg ha año<sup>-1</sup>



Por otra parte, el papel que desempeña *Rhizobium* en el proceso de FBN trae consigo beneficios que están enmarcados en el mejoramiento de las características físicas y biológicas; en el primer aspecto desempeñan un papel importante en la descomposición de residuos orgánicos y en la formación de humus mejoran la estructura y la agregación de las partículas del suelo, reducen su compactación, incrementan los espacios porosos y mejoran la infiltración del agua y en el aspecto biológico, suprimen o controlan las poblaciones de microorganismos patógenos que se desarrollan en el suelo; incrementan la biodiversidad microbiana e inhiben el desarrollo de microorganismos inductores de enfermedades, lo que genera las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen.

Es por ello que el presente trabajo contribuirá con estudios de combinaciones eficientes bacteria-leguminosa en condiciones de campo y esto permita dilucidar el efecto de estas bacterias sobre el cultivo de fréjol, con el fin de en lo posterior producir bioinoculantes eficientes para estos cultivos. Todo esto se traduce en producciones sanas y accesibles al agricultor, buscando con ello una producción sostenible y amigable con el ambiente, pero sobre todo con bajos costos y mejores rendimientos.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, los objetivos que se cumplieron en la presente investigación fueron:

1. Determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* nativos de la región Sur del Ecuador sobre parámetros de nodulación de los genotipos fréjol rojo, fréjol negro y blanco belén en condiciones de campo.
2. Evaluar el efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos, biomasa, componentes de rendimiento, contenido total de N y rendimiento agrícola de los genotipos de fréjol, objetos de estudio.
3. Evaluar la influencia de la aplicación de los aislados sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. GENERALIDADES DE LAS LEGUMINOSAS

Las Leguminosas pertenecen a una gran familia de plantas que incluye una amplia variedad de especies y comprende tanto árboles, arbustos, hierbas y cultivos. El nombre "leguminosa" viene de su principal característica, que es su fruto en forma de una vaina, conocida como legumbre (Guerrero, 2010).

Las leguminosas de grano comestible (fréjol, arveja, haba, lenteja, chocho) constituyen el alimento básico en la canasta familiar ecuatoriana; pueden cubrir una parte considerable de las necesidades dietéticas, debido al alto contenido de proteínas, carbohidratos, minerales y fibra, lo que determina su valor e importancia en la alimentación humana; además este grupo de leguminosas juegan un papel importante en los sistemas de producción, seguridad y soberanía alimentaria (INIAP, 2010).

Ecuador es parte del centro de origen de las plantas cultivadas. En esta parte del mundo fueron domesticadas importantes especies como la papa, el maíz, el fréjol y otras innumerables especies, en las que se destacan los granos andinos: quinua, chocho y amaranto. El país, en la sierra dispone de aproximadamente cien mil hectáreas con condiciones de suelo y clima aptos para el cultivo de granos andinos, es decir sin limitaciones de suelo y clima (INIAP, 2007).

#### 2.1.1. Fréjol

##### 2.1.1.1. Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Embriobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Subfamilia:	Phaseolae

Familia: Fabaceae  
Tribu: Papilionoidae  
Género: *Phaseolus*  
Especie: *vulgaris*  
Nombre científico: *Phaseolus vulgaris* L

*Fuente:* Ulloa, Ramírez *et al.*, 2011.

#### **2.1.1.2. Historia e importancia**

Los estudios arqueológicos indican que el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es originario del continente americano. Se han encontrado evidencias, con antigüedad de 5000 a 8000 años, en algunas regiones de México, Estados Unidos y Perú (FENALCE, 2010).

El fréjol es, dentro de las leguminosas de grano, la especie más importante para el consumo humano. Se cultiva prácticamente en todo el mundo, en 129 países de los cinco continentes, se reporta la producción de fréjol, según la FAO. América Latina es la zona de mayor producción y consumo, se estima que más del 45% de la producción mundial proviene de esta región, donde es considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina (FENALCE, 2010).

En el Ecuador se cultivan dos tipos de fréjol común: arbustivos y volubles (asociados con maíz, en espalderas o tutores). Los dos tipos de fréjol son muy importantes en la alimentación tanto humana como animal, ya que contienen grandes cantidades de proteínas que sirven como alimento para toda la población, sobre todo la que cuenta con escasos recursos económicos y no tiene un fácil acceso a otras fuentes proteicas como es la alimentación animal. A más de ser parte del alimento diario en zonas productoras, el fréjol común es también comercializado en los mercados locales o exportado a Colombia. La forma de consumir y comercializar puede ser como grano fresco o seco (Peralta *et al.*, 2012).

Aproximadamente el 90 % del área sembrada con fréjol, se encuentra a cargo de los pequeños productores, especialmente de la sierra ecuatoriana; además el 40 % del área cultivada constituye un sistema de producción en asocio con maíz (Voysest, 2000).

### 2.1.1.3. Características agronómicas

Es una planta anual perteneciente a la familia de las leguminosas.

- **Raíz:** Sistema radical superficial, pero hay variaciones dentro de una misma variedad. En las raíces encontramos los nódulos de bacterias que fijan nitrógeno.

- **Tallo:** Herbáceo, tierno y ramificado. Puede ser de crecimiento determinado o indeterminado. Cuando es de crecimiento determinado las plantas son enanas y de tallos erectos de 20 a 60 cm de alto, y cuando son de crecimiento indeterminado, las plantas tienen un tutor y alcanzan de 2 a 3 metros de longitud.

- **Hojas:** Compuestas, alternas, trifoliadas, de color verde o morado, con o sin pubescencia o vellos.

- **Flores:** Están dispuestas en racimos terminales o axilares, según su crecimiento (determinado o indeterminado), de color blanco rosado o de tonalidad morada.

- **Fruto:** Es una vaina con dos valvas (una dorsal y la otra placentar) indehiscentes, en ella se encuentran las semillas, que en estado maduro se abre para dejarlas libres (FAO, 2006).

### 2.1.1.4. Requerimientos edafo-climáticos

Según el INIAP (2009) en el Ecuador las zonas productoras de *fréjol arbustivo* se localizan tanto en valles, como en las estribaciones de la cordillera, a alturas que oscilan entre los 1 000 y 2 500 msnm en valles y entre los 800 y 1200 msnm.

En cuanto al *fréjol voluble o trepador*, está localizado en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar y Loja, el requerimiento en cuanto a la altitud es 2 000-2 900 msnm. El suelo apto para el desarrollo de este cultivo es el franco, suelto, permeable con buen drenaje con un pH entre 5.5-6.8. Se desarrolla en zonas con temperaturas que van de 13 a 26 °C con una pluviometría de 800-2 000 mm anuales (Quishpe, 2012).

➤ *Características del fréjol blanco belén (INIAP 422)*

Presenta un hábito de crecimiento determinado arbustivo, es decir, florece de arriba hacia abajo. El rango de adaptabilidad es de 1000a 2500 msnm en áreas de valle como El Chota, Mira y Salinas (Carchi, Imbabura), Guayllabamba y Tumbaco (Pichincha), Patate (Tungurahua), Gualaceo y Yunguilla (Azuay), Vilcabamba, Catamayo, Malacatos (Loja) y 800 a 1 200 msnm en estribaciones como: Intag (Imbabura), Noroccidente de Pichincha, El Corazón (Cotopaxi), Chanchán y Huigra (Chimborazo), Pallatanga (Chimborazo y Bolívar) y Chillanes (Bolívar), Javin y Chontamarca (Cañar).. El clima apto para su desarrollo son zonas con precipitaciones de 300 a 700 mm en el ciclo, temperaturas de 16-20 °C y suelos francos, arenosos, con pH de 5.5-7.5 (INIAP, 2010).

➤ *Características del fréjol rojo*

Esta variedad presenta un hábito de crecimiento indeterminado tipo II con guía pequeña. La maduración es uniforme. En cuanto a las características morfológicas en cuanto al color, forma y tamaño del grano es rojo-moteado, arriñonado, grande. La época adecuada para la siembra es en los meses de febrero a marzo y septiembre a octubre. El rango de adaptabilidad a los ambientes de valles y estribaciones es de 1400 a 2400 msnm (INIAP, 2012).

➤ *Características del fréjol negro afroandino (INIAP 482)*

Presenta un hábito de crecimiento indeterminado arbustivo tipo II, con una guía pequeña, florece de abajo hacia arriba. Tiene una maduración uniforme, tolera la falta de agua y suelos pobres. Se adapta a los valles de: El Chota, Mira y Salinas (Carchi, Imbabura), Guayllabamba y Tumbaco (Pichincha), Patate (Tungurahua), Gualaceo y Yunguilla (Azuay), Vilcabamba, Catamayo, Malacatos (Loja), y estribaciones de Intag (Imbabura), Noroccidente de Pichincha, El Corazón (Cotopaxi), Chanchán y Huigra (Chimborazo), Pallatanga (Chimborazo y Bolívar) y Chillanes (Bolívar), Javin y Chontamarca (Cañar). El rango altitudinal varía entre 1200 a 2500 msnm (áreas de valle) 1000 a 2200 msnm (estribaciones), con precipitaciones de 300 a 700 mm, temperatura de 16 a 20° C y suelos francos-arenosos, con pH de 5.5 a 7.5 (INIAP, 2010).

### 2.1.1.5. Fases fenológicas

Las etapas de desarrollo del cultivo son diez, cinco de desarrollo vegetativo y cinco de desarrollo reproductivo. La primera fase culmina entre los 16 y 23 días y la segunda fase concluye con la maduración a los 62 y 77 días después de la siembra.

En el siguiente cuadro se muestran las fases, etapas y periodos de crecimiento.

**Tabla 1.** Fases fenológicas del cultivo de fréjol.

<b>FASE</b>	<b>ETAPA</b>	<b>DIAS</b>
<b><i>Vegetativa</i></b>	Germinación	0-5
	Emergencia	5-7
	Hojas primarias	7-11
	Primera hoja trifoliada	11-16
	Tercera hoja trifoliada	16-23
<b><i>Reproductiva</i></b>	Prefloración	23-32
	Floración	32-26
	Formación de vainas	36-44
	Llenado de vainas	44-62
	Maduración	62-77

*Fuente: García et al., 2009.*

### 2.1.1.6. Rendimiento

Según INEC (2010), la superficie sembrada de fréjol en cultivo solo fue de 5 748 ha de las cuales se cosecharon 5 388 ha equivalentes a 11 439 TM; mientras que en asocio la superficie sembrada fue de 39 218 ha y la cosechada de 37 476 lo que equivalen a 8 017 TM. El promedio nacional de producción por hectárea de frejol seco es de 18 qqha<sup>-1</sup>(0.0018 TM ha<sup>-1</sup>), mientras que en tierno es de 38 qq ha<sup>-1</sup>(0.0038 TM ha<sup>-1</sup>) (INEC, 2012).

En la provincia de Loja la superficie sembrada de fréjol es de 4 282 ha, de las cuales 302 ha son en cultivo solo con una producción de 249 TM, y en asocio 4 282 ha con una producción de 1 017 TM de fréjol tierno (INEC, 2011).

El cultivo de fréjol constituye actualmente el 0.84% del total de superficie arable en el Ecuador, según el Tercer Censo Nacional Agropecuario (2000), los rendimientos promedio estuvieron en el orden de los 0.2 TM ha<sup>-1</sup> en lo que a grano seco se refiere, mientras que en verde los rendimientos alcanzaron los 0.62 TM ha<sup>-1</sup> (SICA, 2006).

➤ *Rendimiento de fréjol blanco belén*

Produce aproximadamente 15 vainas por planta. Su rendimiento en vaina verde es de 5 y 8 TM ha<sup>-1</sup>, mientras que en grano seco es de 2,193 kg ha<sup>-1</sup>. El elevado rendimiento depende también del buen manejo agronómico que se le dé a esta variedad, en cuanto a irrigación, fertilización, aporques, manejo de plagas y enfermedades (INIAP-PROMSA, 2003).

➤ *Rendimiento de fréjol rojo*

Es una variedad de alta calidad, además de la buena cantidad de vainas que produce (10 a 12) por planta, presenta buenos rendimientos en grano seco: 1,437 TM ha<sup>-1</sup> en promedio. Con buen manejo agronómico, es decir, seleccionar semilla de buena calidad, fertilización, control de malezas, deshierba, aporque oportuno, control de plagas y enfermedades y buena humedad en el suelo, los rendimientos en grano seco son de 1,072 TM ha<sup>-1</sup> a 1 802 TM ha<sup>-1</sup> (INIAP, 2010).

➤ *Rendimiento de fréjol negro afroandino*

Esta variedad posee alto rendimiento en grano seco 1,894 TM ha<sup>-1</sup>(41.7 qq ha<sup>-1</sup>) en promedio. Con buen manejo agronómico, es decir, seleccionar semilla de buena calidad, fertilización, control de malezas, deshierba, aporque oportuno, control de plagas y enfermedades y buena humedad en el suelo, los rendimientos en grano seco son de 1,26 TM ha<sup>-1</sup> a 2,52 TM ha<sup>-1</sup> (2 865 qq ha<sup>-1</sup>)

## **2.2. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO**

El nitrógeno molecular es el principal constituyente de la atmósfera. La concentración de nitrógeno es resultado del balance entre la fijación del nitrógeno atmosférico por acción bacteriana, eléctrica y química, y su liberación se realiza a través de la descomposición de



materias orgánicas por bacterias o por combustión. Es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. En estado combinado, el nitrógeno se presenta en diversas formas. Para que el nitrógeno pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido, los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las *Eubacteria* y *Archaea*, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Baca *et al.*, 2000).

### 2.2.1. Ciclo del Nitrógeno

El ciclo del nitrógeno en el suelo representa solamente una parte del ciclo total del nitrógeno en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es de gran importancia para las plantas, ya que el 78 % del N se encuentra en el aire, presentándose en forma molecular ( $N_2$ ) (Paredes, 2013), pero es difícil que los organismos lo asimilen, ya que primero debe ser desdoblado y empezar así la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para el metabolismo (Salazar y Ordóñez, 2013), ya que, según Castillo *et al.* (2005), En la naturaleza, la mayor parte del nitrógeno disponible se encuentra en forma inorgánica, como amoníaco ( $NH_3$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ), o dinitrógeno ( $N_2$ ).

Los microorganismos, particularmente las bacterias, juegan un importante papel en todas las principales transformaciones del nitrógeno. El ciclo del nitrógeno consta de las siguientes etapas:

➤ *Fijación*: Consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico a las plantas, gracias a algunos microorganismos, como bacterias y cianobacterias que se encuentran presentes en el suelo y en ambientes acuáticos. Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ) por medio de la enzima *nitrogenasa*. La relación entre *Rhizobium* y su huésped es mutualista: las bacterias reciben carbohidratos elaborados por la planta, y la planta recibe nitrógeno en una forma asimilable (CICEANA, 2007).

➤ *Nitrificación*: Según Pelczar *et al* (1993), la oxidación del amoníaco a nitritos se llama nitrificación. Esta fase se da en los siguientes pasos: Un grupo de bacterias (*Nitrosomonas* sp. y *Nitrococcus* sp.) oxidan el amoníaco a nitrito ( $NO_2^-$ ); luego otra bacteria del suelo (*Nitrobacter* sp.) oxida el nitrito en nitrato, por este motivo no se encuentra nitrito en el suelo,

que además es tóxico para las plantas. La modificación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  depende de la temperatura del suelo; la conversión se da más rápida cuando la temperatura está sobre los  $10^\circ\text{C}$  y el pH está entre los 5.5-6.5 (CICEANA, 2007).

➤ *Asimilación:* La asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego, estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como a los ácidos nucleicos de las plantas (Salazar y Ordóñez, 2013).

➤ *Amonificación:* La amonificación comienza cuando organismos producen desechos que contienen nitrógeno como la urea (orina) y desechos de aves u organismos muertos (Salazar y Ordóñez, 2013) y son degradados a compuestos simples por los organismos que viven en el suelo (bacterias y hongos), llevando a cabo la digestión enzimática por lo que el amonio se degrada a compuestos aminados, como proteasas, peptonas y al final, en aminoácidos. Una vez concluida la etapa, las bacterias fijadoras liberan el exceso de nitrógeno como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) o amonio ( $\text{NH}_4$ ) (Pelczar *et al.*, 1993; Baca *et al.*, 2000).

➤ *Desnitrificación:* El proceso de desnitrificación consiste en la transformación de los nitratos a nitrógeno gas, en ausencia de oxígeno (Arriechi *et al.*, 2011). Este proceso se denomina desnitrificación y conlleva a pérdidas de nitrógeno en el suelo. Algunos de los microorganismos relacionados en la reacción son *Thiobacillus denitrificans* (autótrofo), *Micrococcus denitrificans* (heterótrofo) y algunas especies de heterótrofos más comunes perteneciente a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, y *Achromobacter*. La desnitrificación se disminuye en suelos aireados con cantidades moderadas de materia orgánica y nitratos, suelos saturados de agua (anaerobios) y ricos en sustancias orgánicas (Pelczar *et al.*, 1993; Baca *et al.*, 2000).

El hombre también interviene en este ciclo y lo desequilibra a través de la fijación industrial del nitrógeno, por medio de la síntesis de abonos y fertilizantes (Seoáñez *et al.*, 2000).

### 2.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

El hecho de que el cultivo de leguminosas enriquece el terreno es conocido desde hace mucho tiempo, habiéndose derivado del mismo la técnica de alternar cultivos de año en año siguiendo rotaciones en las que obligadamente interviene una leguminosa (Cerdeira, 2008).

Hasta la primera mitad del siglo pasado no se conocía que la acción fertilizante de las leguminosas se debía principalmente al incremento de nitrógeno en el suelo. La demostración de que la asimilación del nitrógeno atmosférico es realizado por ciertas bacterias *Rhizobium* que viven en simbiosis con las leguminosas formando nódulos en sus raíces, fue realizado a la mitad del siglo XX (Nadal *et al.*, 2004).

El proceso global microbiano de fijación del nitrógeno, es realmente un proceso complicado que es objeto de una amplia investigación. La fijación biológica del nitrógeno es un proceso bioquímico importante en el medio ambiente y esencial para el crecimiento de las plantas en ausencia de fertilizantes sintéticos (Manahan, 2007).

Todos los organismos pueden convertir el amoníaco en nitrógeno orgánico, pero pocos tienen la capacidad de sintetizar  $\text{NH}_3$  y compuestos orgánicos nitrogenados a partir del  $\text{N}_2$ . La reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$ , denominada *fijación biológica del nitrógeno*, es realizada por algunas especies procariontas, a veces en relación simbiótica con las plantas. Otras formas inorgánicas del nitrógeno, como el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pueden ser reducidas e incorporadas a la materia orgánica por la mayoría de los microorganismos y plantas. Entre las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$ , hay algunas que viven en los suelos como *Azotobacter*, otras son cianobacterias (algas verde-azuladas) Oliveira *et al.* (2006) y hay otras que viven en simbiosis con las leguminosas e inducen a la formación de nódulos radicales como es el caso de *Rhizobium* (Peretó *et al.*, 2007).

La fijación efectuada por microorganismos de vida libre (viven independientemente en el suelo y en el agua) se llama fijación asimbiótica, y las que se asocian a especies leguminosas se denomina fijación simbiótica (género *Rhizobium*-leguminosa). Todos los microorganismos fijadores tienen una enzima común, la *nitrogenasa*, que regula el proceso de fijación transformando el nitrógeno atmosférico en amoníaco (Oliveira *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la fijación biológica del nitrógeno, Pedraza *et al.* (2010) menciona que, además de su importancia en la fertilidad del suelo, es uno de los mecanismos de reposición del nitrógeno que se pierde mediante la desnitrificación, absorción de los cultivos, percolación y erosión; por lo tanto es un proceso básico para que la vida continúe en la tierra. Este proceso biológico es considerado el segundo más importante en el planeta después de la fotosíntesis, junto con la descomposición de la materia orgánica.

### **2.3.1. Microorganismos diazotróficos simbióticos**

Las bacterias diazotróficas simbióticas son aquellas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas. Estas raíces presentan nódulos en cuyas células se alojan las bacterias fijadoras de nitrógeno; toman ácidos orgánicos de las plantas y contribuyen con compuestos nitrogenados y amidas de reserva. Este tipo de fijación de nitrógeno es muy eficiente al recibir las plantas los compuestos nitrogenados directamente de los microorganismos nitro-fijadores que viven en simbiosis (Espín, 2002).

Se han descrito 40 especies en nueve géneros de bacterias que forman nódulos en leguminosas, no obstante, existen bacterias simbióticas que pueden colonizar otras plantas; por ejemplo: *Rhizobium leguminosarum* y cepas fotosintéticas de *Bradyrhizobium* sp encontradas en raíces de arroz (Yanni *et al.*, 2001); y *Rhizobium etli* en raíces de maíz (Gutierrez y Martinez, 2001).

Las asociaciones fijadoras de nitrógeno entre *rizobios* y leguminosas tienen importancia en el ciclo global del nitrógeno en la agricultura. Según Ronald y Bartha (2006), mencionan que hasta hace poco todas las bacterias fijadoras de nitrógeno que producen nódulos en leguminosas se clasificaban en un único género, *Rhizobium*, según Taiz y Zenger (2006), la simbiosis se produce entre los miembros de la familia Leguminosae y las bacterias del suelo del género: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (León, 2013).

Las bacterias que viven libres en el suelo o en simbiosis son esenciales para fijar el nitrógeno atmosférico originan compuestos solubles por las plantas, como amoníaco. Con posterioridad, el amoníaco entra en la cadena alimenticia mediante su incorporación a los aminoácidos y proteínas y así formar parte de la composición del suelo o de los seres vivos (Calvo, 2011).

Según Calvo (2011), el complejo enzimático *nitrogenasa* que es la enzima implicada en el proceso de fijación del nitrógeno en la transformación en amoníaco del nitrógeno presente en la atmósfera, se inactiva irreversiblemente en presencia de oxígeno. Por lo tanto, la presencia de grandes cantidades de oxígeno en el nódulo radicular restringe la fijación de nitrógeno; es por ello que este proceso tiene lugar en condiciones anaeróbicas. Según Rivera (2012), aproximadamente el 80 % del nitrógeno fijado biológicamente en la agricultura proviene de la simbiosis entre las leguminosas y las especies anteriormente señaladas.

Si tenemos en cuenta que la familia *leguminosae* incluye numerosas plantas de gran interés agronómico y ecológico, queda claro el valor económico de la FBN en el cultivo de leguminosas es muy importante, ya que enriquecen en nitrógeno los suelos, recuperándolos para la práctica agrícola (la FBN incorpora a la biosfera  $180 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno al año) (León, 2013).

Se estima que los sistemas simbióticos fijan entre 75 y 300 kg de N ha año<sup>-1</sup>, mientras que los no simbióticos no superarían los 15 kg de N ha<sup>-1</sup>. A pesar de estas diferencias, la fijación libre, sola, representa a nivel global algo menos de la mitad de los 200-250 millones de toneladas de N<sub>2</sub> fijado por año, ya que la simbiótica (aunque sea más eficiente) está limitada a unas pocas especies vegetales, entre ellas las leguminosas (Abela, 2012).

#### **2.4. GENERALIDADES DEL GÉNERO RHIZOBIUM**

Nombre genérico con el que se designa a las bacterias formadoras de nódulos fijadoras de nitrógeno atmosférico principalmente en las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas. Son bacterias de tipo Gram negativas y aerobias obligadas dotadas de flagelos para facilitar su movilización en el suelo (Nadal *et al.*, 2004).

Según Silva y Vinuesa (2007), las bacterias que ocupan los nódulos de las plantas leguminosas son un grupo polifilético colectivamente llamado rizobios, la característica fenotípica que las distingue de otras bacterias es desarrollar órganos llamados nódulos.

#### 2.4.1. Clasificación taxonómica de *Rhizobium*

Madigan, *et al.* (2009), señala que *Rhizobium* se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Filum:	Proteobacteria
Clase:	Alphaproteobacteria
Orden:	Rhizobiales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	<i>Rhizobium</i>
Especies:	<i>alamii, alkalisoli, cellulosityticum, daejeonense, endophyticum, etli, galegae, gallicum, giardinii, hainanense, herbae, huautlense, indigoferae, leguminosarum, loessense, lusitanum, mesosinicum, miluonense, mongolense, multihospitium, oryzae, phaseoli, pisi, tibeticum, sullae, tropici, tubonense, undicola, vignae, yanglingense.</i> ( <a href="http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia">http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia</a> ).

#### 2.4.2. Descripción microscópica y macroscópica

Son bacilos de 0.5-1.0 x 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ , Gram negativos, móviles por flagelos peritricos (varios alrededor). Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en medio YMA (Yeast-Mannitol-Agar) o LMA (Levadura-Manitol-Agar) (Rivera, 2012).

#### 2.4.3. Metabolismo de *Rhizobium*

El género *Rhizobium* es aerobio, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30 °C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40 °C. El pH varía dependiendo de la especie, así *R. lupini* y *R. japonicum* se adaptan a pH que van desde 3.2 a 4.2, mientras que la mayoría de las especies se desarrolla mejor en suelos próximos a la neutralidad (Gomez, 2005). El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* sp está entre 1.5-5.0 horas (Rivera, 2012).

Es quimiorganoheterótrofo (obtienen energía, carbono y equivalentes reductores para las reacciones biosintéticas de compuestos orgánicos), utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción ácida en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno (Rivera, 2012).

#### 2.4.4. Ecología de *Rhizobium*

Beijerinck (1888), obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Basada en la especificidad de los huéspedes para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. En esta clasificación, cada especie se componía de cepas que compartían un grupo de leguminosas huésped. Más tarde, en 1974, Jordan y Allen dividieron estas especies en dos grupos (Carranza, 2004):

- **Grupo I:** de crecimiento rápido, productoras de ácido, con dos a seis flagelos, A este grupo pertenecen *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. meliloti*.
- **Grupo II:** de crecimiento lento, productores de bases, con flagelos. Aquí se encuentra *Bradyrhizobium japonicum*, *Microvirga lupini* (Weir, 2013).

Según Hernández (2004), indica que las bacterias del grupo *Rhizobium*, pueden desarrollarse como organismos de vida libre y son capaces de formar asociaciones con plantas de la familia de las leguminosas, a la vez que conecta la capacidad fotosintética de la planta con la capacidad de las bacterias de reducir el nitrógeno atmosférico, en donde, posteriormente se desarrolla un intercambio de señales químicas entre ambas partes que permite el reconocimiento e invasión de la leguminosa apropiada por el rizobio, seguido por la proliferación y diferenciación de una estructura altamente especializada denominada “nódulo”, en la cual las bacterias son transformadas en bacteroides.

Los rizobios cubren un espectro ecológico muy amplio: se les encuentra como saprófitos en el suelo, viven como rizobacterias en la zona radical de las leguminosas y otras plantas, y pueden colonizar el nicho ecológico único de los nódulos (Silva *et al.*, 2007).

#### 2.4.5. Simbiosis, infección y formación de nódulos

La capacidad de fijación nitrógeno, está limitada por un grupo de microorganismos con estructura celular procariota (bacterias y cianobacterias), de vida libre o simbióticas. Los rizobios son de gran importancia porque establecen interacciones simbióticas con las raíces de las plantas, esta interacción se lleva a cabo en los nódulos (Anaya, 2003).

El intercambio de señales moleculares entre los rizobios y la leguminosa, puede ser ejemplificado por medio de las relaciones simbióticas, como la de las bacterias fijadoras de nitrógeno Gram negativas del género *Rhizobium* y las plantas de la familia *leguminosae* (Anaya, 2003).

El grado de especificidad de los rizobios hacia sus plantas hospederas particulares varía mucho. Cierta clase de *Rhizobium* es capaz de producir nódulos en 35 géneros diferentes de leguminosas, mientras que hay rizobios que están restringidos solamente a una especie vegetal o, incluso, a ciertas variedades de especies cultivadas (Thompson, 2003). A continuación se detalla cada uno de los pasos en el proceso de simbiosis de rizobios-leguminosas, infección y formación de los módulos:

➤ La bacteria *Rhizobium* migra hacia la zona radicular, por medio de una respuesta quimiotáctica (Anaya, 2003). Según Thompson (2003), este proceso se inicia debido a que las raíces de la planta exudan flavonoides, que son compuestos fenólicos no nitrogenados que sirven de atrayentes para las bacterias (Rocha *et al.*, 2006). Los genes *nod* dirigen básicamente todas las etapas de la nodulación, en los rizobios que se encuentran en el suelo cerca de la planta (Castillo *et al.*, 2005).

➤ Los exudados (flavonoides), son usados como un indicio de la disponibilidad de un hospedero y para activar los genes *nod* de la simbiosis, que deben responder a la presencia de los flavonoides apropiados (Castillo *et al.*, 2005).

➤ Ciertas proteínas producidas por la bacteria, como la ricadesina o las lectinas sintetizadas por las plantas, participan en el proceso de adhesión de las bacterias a la raíz; produciéndose la colonización de los pelos radiculares (Rocha *et al.*, 2006).



➤ Se piensa que la bacteria infecciosa secreta ciertos factores que estimulan las divisiones celulares subepidérmicas en la raíz. Estas células en división, determinan la formación de pelos radicales que se convierten en blanco para la infección (Anaya, 2003).

Según Rocha *et al.*, (2006), las bacterias hidrolizan la pared celular, y por invaginación de la membrana celular, penetran en la raíz. Como respuesta, la planta deposita alrededor de la lesión compuestos de pared celular, formando el llamado hilo de infección, en donde las bacterias se dividen para luego ingresar a las células del córtex.

➤ A partir de una señal no determinada desde la planta, rápidamente, las bacterias cesan su división y empiezan a aumentar de tamaño y a diferenciarse en orgánulos endosimbóticos fijadores de nitrógeno llamados bacteroides. La membrana que rodea a los bacteroides se llama membrana peribacteroidal (Taiz *et al.*, 2006).

➤ Debido a que la fijación de nitrógeno es un proceso sensible al oxígeno, las células vegetales sintetizan una proteína llamada leghemoglobina, que tienen la función de transportar oxígeno a través de los tejidos vegetales, liberando el oxígeno suficiente para mantener el proceso respiratorio de las bacterias (Rocha *et al.*, 2006).

#### **2.4.5.1. Flavonoides**

La formación del nódulo radicular es un proceso coordinado mediante una serie de etapas, que implican señalización por parte de la planta y por parte del microsimbionte. En el caso de la planta, esta pasa por una serie de fases o etapas. La primera etapa consiste en un proceso de reconocimiento en donde la planta lanza señales, principalmente quimioattractantes, como son los flavonoides (Calvo, 2011). Entre estos elementos los flavonoides (por ejemplo: luteolina, narigenina y genisteína) que específicamente interactúan con proteínas bacteriana NodD activando la expresión de los genes (nod), dando lugar a la formación y secreción de los factores de nodulación (Rivera, 2012).

#### **2.4.5.2. Ácido indol acético (AIA)**

El ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada debido a su clara acción en la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos. La

síntesis de AIA en rizobacterias, está ligada principalmente a tres rutas metabólicas ampliamente conocidas por tener como precursor al triptófano. La primera ruta es la del ácido indol-3-piruvico (IP y A), presente en plantas y en varios microorganismos como en el caso de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp. En la segunda ruta la formación de la triptamina (alternativa para la producción de AIA). La producción de AIA en algunas cepas fitopatógenas, como *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Erwinia herbicola*, presenta en común la síntesis de AIA vía indol-3-acetamida (IAM). Sin embargo, esta ruta metabólica también ha sido estudiada en bacterias simbióticas como *Rhizobium* spp (Camelo *et al*, 2011).

#### **2.4.6. Papel de la Nitrogenasa**

Todos los microorganismos que convierten el N<sub>2</sub> en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático *Nasa*; la enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores de la naturaleza *Nasa*. Para el funcionamiento de este complejo enzimático, es importante la presencia de un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de Adenina Trifosfato (ATP) y de un ambiente anaerobio (Baca *et al.*, 2000). Según Tortora *et al.* (2007), todas las bacterias responsables de la fijación del nitrógeno, utilizan la misma enzima, nitrogenasa, la característica principal de esta enzima es que el oxígeno la inactiva.

El complejo enzimático nitrogenasa puede separarse en dos componentes, la proteína Fe y la proteína Mo-Fe, ninguna de las cuales tiene actividad catalítica por sí sola. La reductasa de la nitrogenasa, o proteína Fe (componente II), es la más pequeña de los dos componentes, es muy sensible al O<sub>2</sub> y se inactiva de manera irreversible en su presencia, con una vida media de 30-45 segundos; mientras que la proteína Mo-Fe es inactivada por el oxígeno con una vida media en aire de 10 minutos (Taiz *et al.*, 2006).

La presencia de molibdeno en esta enzima nitrato reductora explica el requerimiento de molibdeno para la asimilación de N<sub>2</sub> y NO. La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, razón por la cual los organismos fijadores de nitrógeno que son aerobios, han desarrollado adaptaciones específicas para proveerse de oxígeno, a la vez que protegen la enzima del oxígeno libre. Los nódulos de las leguminosas contienen leghemoglobina, la cual cumple esta función (Sierra 2005).

## **2.5. EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LA CALIDAD DE LOS SUELOS**

Los fertilizantes minerales usados indiscriminadamente llegan a generar serios desequilibrios en los agroecosistemas por contaminación del suelo, el agua, el aire y los alimentos, pudiendo provocar la degradación de los suelos y la resistencia a plagas, la destrucción de los controles naturales y hasta poner en peligro la salud humana; por ello es de gran interés restaurar la microflora del suelo mediante estrategias que permitan mejorarlo en relación a la productividad agrícola y de una manera no contaminante (Neyra *et al.*, 2013).

En los suelos agrícolas naturalmente existe rizobios pero la población resulta siempre insuficiente para fijar nitrógeno atmosférico y suplir las cantidades necesarias para el cultivo (Castro, 2012). El uso de microorganismos en la agricultura constituye una alternativa promisoría frente a los fertilizantes minerales, para satisfacer las necesidades nutrimentales de los cultivos y obtener elevados niveles de rendimiento y calidad de los productos así como también posibilita el ahorro de fertilizantes minerales, incrementando los procesos biológicos en el suelo como índice de sostenibilidad del proceso agrícola (Corbera y Nápoles, 2000).

### **2.5.1. Efecto de *Rhizobium* en suelos agrícolas**

Los suelos de Latinoamérica se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y tener, en términos generales, niveles bajos de fósforo y pH ácido, lo cual, además de constituirse como factores limitantes de la productividad de las plantas, afectarían el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Cuadrado, 2009).

El uso de cepas nativas de *Rhizobium* inoculadas representa una posibilidad de fertilización biológica, con la finalidad de suplementar el nitrógeno, así como, activar procesos bioquímicos adicionales asociados con otros microorganismos presentes en el suelo (Rodríguez y López 2009). Con lo mencionado anteriormente, se hace necesario emplear técnicas que permitan incorporar al suelo microorganismos que fijen nitrógeno, para ello, se inocula la bacteria (*Rhizobium*) en la semilla de las leguminosas antes de la siembra y asegurar la fijación biológica de nitrógeno (Castro, 2012).

Sin embargo, para lograr resultados eficientes de *Rhizobium* en la calidad del suelo, se debe tomar en cuenta los diversos factores pueden afectar la simbiosis impidiendo la aparición de nódulos, salvo que el suelo sea muy rico en derivados nitrogenados. Dentro de estos se encuentran: 1) factores químicos: concentración de cloruro de sodio, metales, temperatura, pH, niveles tóxicos de aluminio o manganeso y bajos niveles de calcio, magnesio, potasio y molibdeno; 2) factores físicos: la erosión, presencia de malezas, compactación, hidromorfismo, entre otros y 3) factores biológicos: presencia de virus y bacterias que inhiben la nodulación (Cuadrado, 2009).

Por lo mencionado con respecto a las limitantes señaladas, se justifica el beneficio sobre el uso de estos microorganismos en el suelo, ya que el objetivo fundamental es incrementar el número de estos rizobios en el medio y acelerar los procesos microbianos, de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas o se hagan más rápidos los procesos fisiológicos que influyen en el desarrollo y el rendimiento de los cultivos (Sánchez *et al.*, 2011).

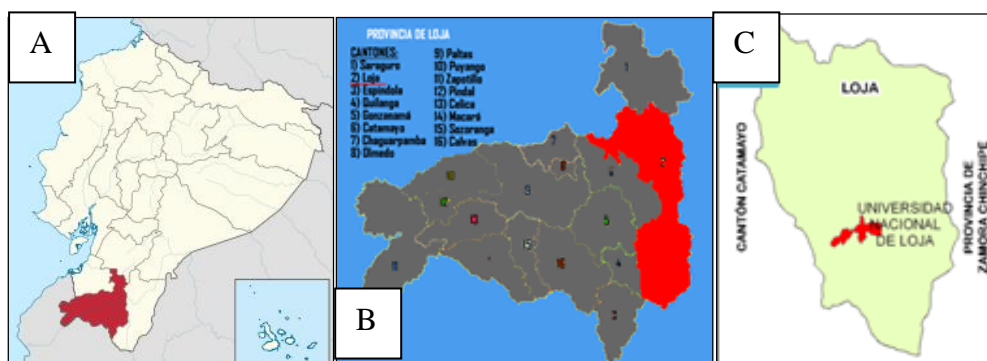
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental “La Argelia” en el sector Moraspamba de la Universidad Nacional de Loja y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Biotecnología de la misma entidad, en el periodo comprendido de junio de 2013 a enero de 2014, y es parte del proyecto **“POTENCIACIÓN DE INOCULANTES BIOLÓGICOS NATIVOS PARA LEGUMINOSAS, GRAMÍNEAS Y SOLANÁCEAS A PARTIR DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES”**, la misma que se encuentra enmarcada dentro del Programa de Investigaciones de la Universidad Nacional de Loja, denominado “Biodiversidad de plantas, animales y microorganismos promisorios”.

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

##### 3.1.1. Ubicación Política

Este trabajo se llevó a cabo en dos fases experimentales: la primera fase de campo se realizó en el sector de Moraspamba de la Estación Experimental “La Argelia”, donde se evaluó el efecto de aislados de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, fisiológicos y fijación de nitrógeno en tres variedades de frejol común y la segunda fase de laboratorio en el Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Loja, donde se realizó el análisis microbiológico (conteo de bacterias, hongos y actinomicetos) antes y después de los suelos de la zona de experimentación.



**Figura 1.** Mapa de ubicación del área de estudio. **A** Contexto de la República del Ecuador. **B.** Contexto de la Provincia de Loja. **C.** Contexto de la Universidad Nacional de Loja.

### 3.1.2. Ubicación Geográfica

- ✓ La Quinta Experimental “La Argelia” presenta la siguiente ubicación geográfica:

Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud
04°57'20''	79°12'47''	2 138 msnm

- ✓ El Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja presenta la siguiente ubicación geográfica:

Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud
04°23'35''	79°11'55''	2 138 msnm

### 3.1.3. Ubicación Ecológica

Según la clasificación de Holdridge, la zona de vida es Bosque seco Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura anual promedio de 15,62 °C, precipitación de 812,6 mm año<sup>-1</sup>, humedad relativa de 71,96 %; evaporación media de 111,33 mm y una velocidad máxima del viento de 5,44 ms<sup>-1</sup> y mínima de 3,64 ms<sup>-1</sup>. Se ubica en el área de clima templado andino.

## 3.2. MATERIALES

Los materiales, equipos y reactivos que se emplearon para el desarrollo del presente trabajo, todos estuvieron a disposición en el Centro de Biotecnología y con recursos del Proyecto Bioinoculantes.

### 3.2.1. Materiales y equipos

- × Destilador de agua
- × Agitador calentador
- × Autoclave
- × Flujo laminar
- × Incubadora
- × Estufa
- × Balanza analítica y precisión
- × Contador de colonias

- × Probeta
- × Erlenmeyer
- × Vaso de precipitación
- × Micropipetas (2, 10, 20, 100, 200 y 1000 ul)
- × Cajas Petri
- × Tubos de ensayo
- × Agar Nutriente
- × Peptona
- × Cloruro de sodio
- × Agar-Agar
- × Extracto de levadura
- × Semilla (fréjol blanco, fréjol rojo y fréjol negro)
- × Lampas
- × Machetes
- × Flexómetro
- × Baldes plásticos
- × Turba

### **3.3. METODOLOGÍA**

#### **3.3.1. METODOLOGÍA PARA EL PRIMER OBJETIVO**

*“Determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* nativos de la región Sur del Ecuador sobre parámetros de nodulación de los genotipos fréjol rojo, fréjol negro y blanco belén en condiciones de campo”.*

Dando cumplimiento a la primera fase de la investigación se diseñó un experimento en condiciones de campo en el sector Moraspamba de la Estación Experimental “La Argelia”, de la Universidad Nacional de Loja, donde se evaluó el efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, fisiológicos y fijación de nitrógeno en tres variedades de fréjol común.

### 3.3.1.1. Montaje del Ensayo

El experimento se desarrolló utilizando un diseño experimental de bloques al azar con 4 réplicas por tratamiento; cada unidad experimental ocupó un área de 9 m<sup>2</sup>, con una distancia de 1 m entre parcelas y tratamientos y 2 m entre variedades (fréjol rojo, negro y blanco belén).

Las cepas bacterianas utilizadas como tratamientos fueron las de mejores resultados obtenidas a nivel de condiciones controladas de la tesis “Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en genotipos de fréjol común en diferentes zonas agroecológicas de la provincia de Loja”, un tratamiento con fertilización química (urea) y el tratamiento sin fertilización ni inoculación. La tabla 2 muestra las cepas utilizadas en el experimento en condiciones de campo, así como las zonas de procedencia de donde se aislaron estas bacterias.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas en el experimento en condiciones de campo

No	IDENTIFICACIÓN	PROCEDENCIA	
	GENÉTICA	CANTÓN	LOCALIDAD
1	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i>	Loja	Virgenpamba
2	<i>Rhizobium phaseoli</i>	Loja	Virgenpamba
3	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Loja	Reina del Cisne (Zalapa)

**Tabla 3.** Requerimientos edafo-climáticos de los genotipos de fréjol empleados en la investigación en condiciones de campo.

VARIEDAD	HÁBITO DE CRECIM.	ALTITUD (msnm)	TEMP	PRECIPIT. (mm/ciclo)	pH	TIPO DE SUELO
<b>BLANCO BELÉN (INIAP 422)</b>	Arbustivo	1 000-2 500	16-20 °C	300-700	5.5-7.5	suelos francos, arenosos
<b>FRÉJOL ROJO</b>	Indeterminado tipo II con guía pequeña	1 400-2 400	16-20 °C	300-700	5.5-7.5	suelos francos, arenosos



<b>VARIEDAD</b>	<b>HÁBITO DE CRECIM.</b>	<b>ALTITUD (msnm)</b>	<b>TEMP</b>	<b>PRECIPIT. (mm/ciclo)</b>	<b>pH</b>	<b>TIPO DE SUELO</b>
<b>NEGRO</b>	Arbustivo tipo	1 200-2	16 a 20°	300-700	5.5 a	suelos
<b>AFROANDINO (INIAP 482)</b>	II, con una guía pequeña	500	C		7.5	francos-arenosos

Fuente: INIAP, 2010.

### **3.3.1.2. Elaboración del inóculo y peletización en las semillas de fréjol común**

Para el efecto se procedió a la preparación del pre-inoculo, el cual se dispuso de 10 ml en tubos de ensayo con medio extracto de levadura y malta (YM) líquido por cada una de las cepas objeto de estudio (T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum*). Ajustado el pH a 7, los tubos se incubaron a 30 °C por 24 horas en incubadora giratoria. Transcurrido el tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias, cada una de las cepas del pre-inoculo se inocularon en 250 ml con medio de cultivo (YM) líquido para así obtener el inoculo final, el cual se incubó a 30 °C durante 48 horas en incubadora giratoria a 230 rpm. Pasado este tiempo del inóculo final se cuantificó por espectrofotometría las células viables por cada una de las cepas objeto de estudio, ajustándose las densidades ópticas para contar con títulos de  $10^8$  -  $10^9$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC ml<sup>-1</sup>). Seguidamente del inóculo final para cada cepa se tomaron las cantidades resultantes de la calibración y se completaron con cultivo de medio YM para contar en cada una de las bolsas con 62,5 ml de medio bacteriano para depositarlo en fundas aluminadas que contenían 250 gramos (g) de turba previamente esterilizada. De esta forma se obtuvo el bioinoculante para la peletización en las semillas de fréjol. Tanto la fundas como la turba fueron esterilizadas en rayos UV y autoclave respectivamente. Al cabo de una semana se cuantificó la población de bacterias viables dentro del inóculo mediante el método de diluciones cuantitativas, esto con el fin de asegurar la cantidad necesaria de bacterias al momento de la inoculación por peletización y posterior siembra de las semillas en el campo de experimentación (Torres-Gutiérrez, 2008).

### **3.3.1.3. Determinación de los parámetros de nodulación**

A los 30 y 60 días después de la siembra (DDS), se determinó los parámetros de nodulación en cada una de las variedades, para el efecto se tomó 5 plantas al azar de cada una de las réplicas de los diferentes tratamientos, las mismas que fueron identificadas en campo (M1, M2, M3, M4, M5) para posteriormente llevarlas al laboratorio del Centro de Biotecnología y evaluar las variables: número de nódulos totales (NN) y peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN en gramos).

Una vez obtenido el PFN, se colocaron las muestras en fundas de papel con la identificación (variedad, tratamiento y réplica) para posteriormente llevarlas a la estufa por 72 horas a una temperatura de 70° C.

### **3.3.2. METODOLOGÍA PARA EL SEGUNDO OBJETIVO**

*“Evaluar el efecto de los aislados de Rhizobium sobre las características morfológicas, biomasa, componentes de rendimiento, contenido total de N y rendimiento agrícola de los genotipos de frejol, objetos de estudio”.*

#### **3.3.2.1. Evaluación de los parámetros morfológicos y biomasa**

La evaluación de los parámetros morfológicos se realizó a partir de los 7, 15 y 21 días después de la siembra (DDS). Para el efecto se analizaron las variables altura y número de hojas. En cuanto a la evaluación de los parámetros de biomasa esta se realizó a partir de los 30 y 60 (DDS) analizando las variables peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR en gramos) y peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF en gramos). Tanto para evaluar los parámetros morfológicos y biomasa se dispuso de 5 plantas al azar de cada réplica en cada uno de los tratamientos y variedad.

#### **3.3.2.2. Evaluación de los componentes del rendimiento, nitrógeno total y rendimiento agrícola de los genotipos de frejol común.**

Para determinar los componentes del rendimiento se tomaron como muestras 5 plantas por réplica y por tratamiento, en las cuales las variables a evaluar fueron: número de vainas, peso

de vainas por planta, longitud de vainas por planta, número de granos por vaina y peso de 100 semillas.

El análisis del porcentaje de N total se lo realizó a partir de la semilla de fréjol por cada uno de los tratamientos y variedades. Para dichos análisis se dispuso de 200 g de semilla y se envió a un laboratorio particular acreditado (SEIDLABORATORY Cía. Ltda.) Para esta determinación se utilizó el método nitrógeno total, Kjeldahl, citado por Herrera *et al.*, (1980). Para determinar el rendimiento agrícola se seleccionaron 40 plantas por réplica y por tratamiento (Torres-Gutiérrez, 2008).

### **3.3.3. METODOLOGÍA PARA EL TERCER OBJETIVO**

*“Evaluar la influencia de la aplicación de los aislados sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación”.*

Para el desarrollo del presente objetivo, se realizó el análisis del suelo antes y después de la investigación. Para ello, se tomó 1 muestra de suelo a una profundidad de 20 cm de cada una de las réplicas, seguidamente se mezclaron todas las muestras de la misma variedad con el fin de obtener 1 muestra homogénea de 1 kg. Se realizó el mismo procedimiento de recolección de las muestras en los dos análisis.

Las muestras recolectadas se las secó por un período de 72 horas para posteriormente tamizarlas; este procedimiento consistió en pasar la muestra por dos tamices de (0.25 mm), el material recolectado del primer tamiz nos sirvió para determinar el porcentaje de materia orgánica mientras que el material del segundo tamiz se usó para realizar el análisis de macro y micro elementos, conductividad eléctrica, pH, y clase textural.

#### **3.3.3.1. Análisis químico**

Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron: pH, conductividad eléctrica (CE), porcentaje de materia orgánica (% MO), porcentaje de nitrógeno (% N), fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso y zinc. Este análisis que se lo realizó en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) y en el Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Bromatológico de la Universidad Nacional de Loja.

**Tabla 4.** Parámetros evaluados en el análisis químico.

MA	Pot*	Cond*	Vol*		Col*	AA*						
	pH	CE	Mo	N	P	K*	Ca*	Mg*	Fe*	Mn*	Cu*	Zn*
		(ds/m)	%	%	ppm	(cmd/kg)			ppm			
MA: metodo aplicado, Pot*:Potenciometrico, Cond*:conductimetrico, Vol*: volumetrico, Col*: colorimetrico, AA*: absorcion atomica, CE: conductividad electrica,												
MO: Materia organica, N: Nitrogeno, P: Fosforo, K: Potasio, Ca: Calcio, Mg: Magnesio, Fe: Hierro, Mn: Manganeso, Cu: Cobre, Zn: Zinc, cmol/Kg: centimoles por												
kilogramo, dm/m: deciSiemens por metro												

Fuente: AGROCALIDAD, 2013

➤ *Potencial hidrógeno (pH)*

Se tomaron 20 g de suelo y se agregaron 50 ml de agua destilada, se colocaron en el agitador magnético por un tiempo de 5 min a 400 revoluciones por minuto (rpm), se dejó en reposo por 30 minutos para luego con el potenciómetro previamente estandarizado medir el pH de cada muestra.

La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 5.** Parámetros de interpretación de resultados de pH.

<b>INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. REGIÓN COSTA-SIERRA</b>					
	Ácido	Ligeramente ácido	Prácticamente neutro	Ligeramente alcalino	Alcalino
pH	5.5	5.6-6.4	6.5-7.5	7.6-8.0	8.1

Fuente: AGROCALIDAD, 2013.

➤ *Conductividad Eléctrica (CE)*

Se tomaron 100 g de suelo del tamiz de 2 mm, se agregó aproximadamente 25 a 30 ml de agua destilada agitando constantemente con una varilla de vidrio hasta que el suelo forme una pasta brillante a la reflexión de la luz y se dejó reposar las muestras por 24 horas.

Para la obtención del extracto de suelo, se colocó papel filtro sobre el embudo buchner, seguidamente se colocó la pasta de suelo y se conectó el sistema de filtración al vacío para obtener un aproximado de 20 ml de extracto. El producto obtenido de la extracción se lo colocó en tubos de ensayo, previo a la utilización del medidor de conductividad se calibró el

conductímetro con solución estándar. La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 6.** Parámetros de interpretación de resultados de conductividad eléctrica Región Costa-Sierra.

<b>INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. REGIÓN COSTA-SIERRA</b>				
	No salino	Ligeramente salino (LS)	Salino (S)	Muy salino (MS)
CE* (ds/m)	< 2.0	2.0-3.0	3.0-4.0	4.0-8.0

*Fuente:* AGROCALIDAD, 2013.

➤ *Materia Orgánica (MO)*

El suelo que se utilizó para la obtención de la materia orgánica, fue el obtenido del tamiz de 0.25 mm. Se pesó 0.5 g de suelo, agregando 5 ml de dicromato de potasio 1 normal (ver anexo 2) y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado al 97 % a cada una de las muestras. Se agitó suavemente durante 1 min a fin de homogenizar la muestra, se dejó en reposo durante 30 min para posteriormente agregar 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico al 85 % y 10-15 gotas de difelamina (ver anexo 2), siguiendo el orden indicado. Al disminuir el exceso de dicromato de potasio por medio de la solución de sal de Morh de concentración 0.5 normal (ver anexo 2) se consiguió el viraje del color de azul hasta verde.

La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 7.** Parámetros de interpretación de resultados del porcentaje de materia orgánica.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MO (%)</b>
Bajo	< 1.0
Medio	1-2.0
Alto	> 2.0

*Fuente:* AGROCALIDAD, 2013.

➤ *Porcentaje de nitrógeno total (% N)*

Se tomó 2.5 g de suelo, se agregó 25 ml de solución extractante (OLSEN modificado), se agitó por 10 minutos y se filtró, se tomó 2 ml de la muestra filtrada a esta se le agregó 8 ml de fenol básico (ver anexo 3) (100 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 500 ml agua destilada), 138 g de fenol en cristales o 130 ml de fenol líquido al 92 % para 1 litro y 10 ml de hipoclorito de sodio (NaClO); sin exponerlo a la luz directa, se lo dejó reposar por 3 horas con el fin de mantener el color estable por más tiempo.

La curva de calibración se la realizó tomando en cuenta las concentraciones: 0-62.5-125-187.5 y 250 partes por millón (ppm). La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 8.** Parámetros de interpretación de resultados del porcentaje de nitrógeno total.

PARÁMETRO	N (%)
Bajo	0-0.15
Medio	0.16-0.3
Alto	>0.31

*Fuente:* AGROCALIDAD, 2013.

➤ *Determinación de fósforo*

Se colocó 2.5 g de suelo y 25 ml de la solución extractante, se agitó por 10 minutos a 400 rpm y se filtró. Se tomó 2 ml de alícuota del filtrado, añadiendo 8 ml de agua destilada y 10 ml del reactivo B de molibdato de amonio (ver anexo 4), se dejó reposar por un periodo de 1 hora hasta hacer la curva de calibrado en el espectrofotómetro AA con las concentraciones 0-30-60-90 y 20 ppm, para lo cual se tomó como punto alto la solución de 12  $\mu\text{gml}^{-1}$  de fósforo y como cero la solución extractante.

La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 9.** Parámetros de interpretación de resultados de fósforo.

PARÁMETRO	P (ppm)
Bajo	0-10
Medio	11-20
Alto	>21

*Fuente: AGROCALIDAD, 2013.*

➤ *Determinación de potasio, calcio, y magnesio*

Se tomó 2.5 g de suelo, se adicionó 25 ml de solución extractante (ver anexo 5), se agitó y se filtró; del producto filtrado se tomó 1 ml al cual se agregó 9 ml de agua destilada y 15 ml de óxido de lantano al 1 %. Se realizó las mismas diluciones para cada una de las muestras.

Seguidamente se realizó la curva de calibrado tomando como punto alto las soluciones patrones de 50-250-50 micro gramos por mililitro ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de K, Ca y Mg respectivamente y como cero la solución extractora. Las lecturas se las realizó en el espectrofotometro de absorción atómica utilizando las condiciones y concentraciones que se presentan a continuación.

**Tabla 10.** Cuadro de calibración del espectrofotómetro.

Elemento	No. Lámpara	Long. Onda (nm)	Corr. Lamp. (mA)	Ancho Rendija (nm)	Tipo de Llama	Curva Calibración (meq/100m)
K	1	766.5	5	0.5	Air-C2 H2	0-0321-0641-0.962-1.282
Ca	2	422.7	6	0.5	Air-C2 H2	0-3.122-6.25-9.375-12.5
Mg	3	285.2	4	0.5	Air-C2 H2	0-1.042-2.083-3.125-4.167

La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 11.** Parámetros de interpretación de resultados de potasio, calcio y magnesio.

PARÁMETRO	K (cmol/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)
Bajo	<0.2	<1	<0.33
Medio	0.2-0.38	1-3	0.34-0.66
Alto	>0.4	>3	>0.66

Fuente: AGROCALIDAD, 2013.

➤ *Determinación de hierro, cobre, manganeso*

Se colocó 2.5 g de suelo y 25 ml de la solución extractante, se agitó por 10 min a una velocidad de 400 rpm y se filtró. Se realizó la curva de calibrado utilizando como punto alto la solución de 3-10-2  $\mu\text{gml}^{-1}$  de cobre-hierro, manganeso y cero la solución extractante. Se realizó las lecturas en el espectrofotómetro AA (absorción atómica) directamente del filtrado, utilizando las condiciones y concentraciones de la siguiente tabla:

**Tabla 12.** Condiciones y concentraciones para lecturas en espectrofotómetro.

Elemento	No. Lámpara	Long. Onda (nm)	Corr. Lamp. (mA)	Ancho Rendija (nm)	Tipo de Llama	Curva Calibración (meq/100m)
Cu	6	324.8	3	0.5	Air-C2 H2	0-7.5-15-22.5-30
Fe	7	248.3	8	0.2	Air-C2 H2	0-25-50-75-100
Mn	8	279.5	5	0.4	Air-C2 H2	0-7.5-15-22.5-30

La interpretación de los resultados se la realizó en base a la tabla que se muestra a continuación:

**Tabla 13.** Parámetros de interpretación de resultados de hierro, cobre y manganeso.

PARÁMETRO	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
Bajo	0-20	0-1	0-5
Medio	21-40	1.1-4	6-15
Alto	>41	>4.1	>16

Fuente: AGROCALIDAD, 2013.



### 3.3.3.2. Análisis físico

Para el análisis físico del suelo, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: textura (% arena, % limo y % arcilla) y clase textural:

➤ *Textura*

Se pesaron 50 g de suelo seco en vasos de precipitación plásticos, a los cuales se les añadió 40 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y se los dejó en reposo por 24 horas. Luego se licuó la muestra durante 10 min y se trasvasó a una probeta de 1 000 ml procurando no dejar restos de suelo. Se agitó durante 20 segundos, se colocó en densímetro en la probeta y se realizó la primera lectura a los 40 segundos, la muestra se mantuvo en reposo durante 2 horas para realizar la segunda lectura.

Fórmula

$$\% \text{ ARENA} = 100 - (\text{primera lectura} * 2)$$

$$\% \text{ ARCILLA} = \text{segunda lectura} * 2$$

$$\% \text{ LIMO} = 100 - (\% \text{ ARENA} + \% \text{ ARCILLA})$$

**Tabla 14.** Parámetros de interpretación de resultados de clase textural.

<b>Método aplicado</b>		<b>Bouyoucos</b>		
No. Muestra	% Ao*	Textura		Clase textural
		% Lo*	% Ac*	
V1				
V2				
V3				

**Ao**=arena; **Lo**=limo; **Ac**=arcilla

*Fuente:* AGROCALIDAD, 2013.

La clase textural de las muestras de suelo, se la obtiene ubicando los valores obtenidos de la fórmula antes descrita en la siguiente figura:

### 3.3.3.3. Análisis microbiológico

El análisis se realizó al inicio y al final del ensayo, en el cual se determinó la cantidad de colonias de bacterias, hongos y actinomicetos:

➤ *Análisis de bacterias, hongos y actinomicetos*

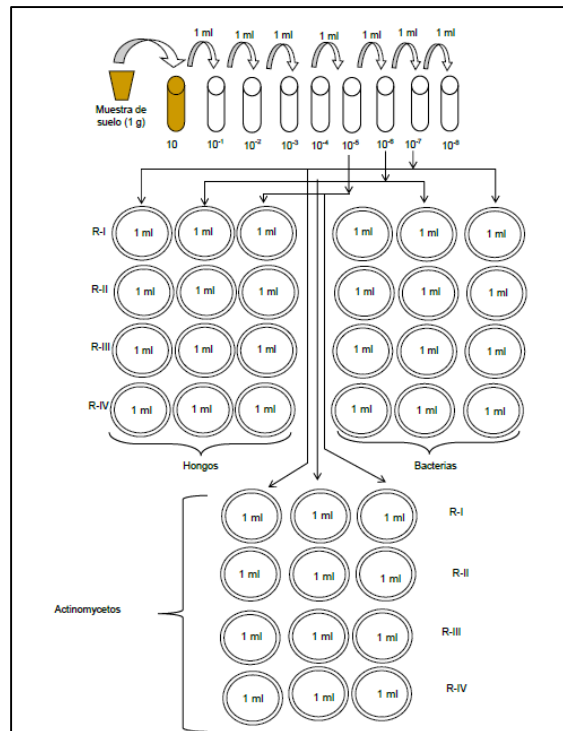
1. *Preparación del medio de cultivo*

Los medios de cultivos generales utilizados en los ensayos fueron Agar Nutriente para el crecimiento de bacterias, PDA (papa-dextrosa-agar) para hongos y Caseína para actinomicetos.

2. *Preparación de diluciones cuantitativas*

Este procedimiento se lo llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Mayea *et al.* (1998). Se realizaron diluciones cuantitativas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  en condiciones estériles (cámara de flujo laminar). Para cada muestra se utilizaron tubos de ensayo estériles que contenían 9 ml de agua destilada en cada uno. Al primer tubo de ensayo se le adicionó 1 g de suelo, constituyendo este la muestra inicial para la realización de las diluciones cuantitativas.

Desde el tubo que contenía la solución de suelo (dilución  $10^{-1}$ ) se transfirió 1 ml de esta con la ayuda de una micropipeta al tubo 2 (dilución  $10^{-2}$ ), se procedió a cambiar la punta y se extrajo la misma cantidad de esta dilución ( $10^{-2}$ ) para transferirla a la tercera dilución ( $10^{-3}$ ). Sucesivamente se realizaron las restantes diluciones hasta  $10^{-6}$ , asegurándose de agitar cada tubo y utilizar una punta estéril diferente en cada paso (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema para la siembra de microorganismos.

### 3. Siembra en cajas Petri y cuantificación de colonias bacterianas, fúngicas y de actinomicetos

Las diluciones que se emplearon para la determinación de bacterias y actinomicetos fueron  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , mientras que para hongos se sembraron las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , considerándose estas como un estándar para la determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC  $gs^{-1}$ ) para cada grupo microbiano.

La siembra consistió en tomar de cada dilución 1 ml de la solución, para luego ser depositados uniformemente en cajas Petri y posteriormente adicionando el medio de cultivo respectivo para bacterias, hongos o actinomicetos en una relación de 20 ml por caja. Depositado el medio de cultivo se realizó movimientos en dirección a los 4 cuadrantes con la finalidad de conseguir un crecimiento homogéneo puntiforme de las colonias. Para la siembra se realizaron 4 réplicas por dilución. Inoculadas las cajas Petri con cada dilución, estas fueron incubadas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  para bacterias y actinomicetos y a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  para hongos, durante 72 horas para la cuantificación de la UFC  $gs^{-1}$ .

La cuantificación de las colonias tanto para bacterias, hongos y actinomicetos se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$UFC/gS = \frac{(\sum N^{\circ}CpC)}{N^{\circ}C} * \frac{1}{FD}$$

Donde:

$\sum N^{\circ}CpC$ : Sumatoria del número de colonias por cada caja Petri (número probable de microorganismos).

$N^{\circ}C$ : número de cajas Petri

$V$ : Volumen inoculado en la caja Petri

$F.D$ : Factor de dilución

### 3.3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento de campo se lo realizó utilizando un diseño experimental de bloques al azar con 3 variedades, 5 tratamientos y 4 réplicas por cada uno de los tratamientos. Se utilizó la prueba de Tukey HSD (Method: 95,0 percent).

#### a. Modelo Matemático

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  => Observación en la unidad experimental sometida al i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición.

$\mu$  => Media de las  $\mu_i$

$\alpha_i$  => Efecto del i-ésimo tratamiento.

$\beta_j$  => Efecto del j-ésimo bloque o replica.

$e_{ij}$  => Componente aleatorio (error experimental) valores de VAI  $\sim(0, \sigma^2)$

## b. Esquema del Ensayo

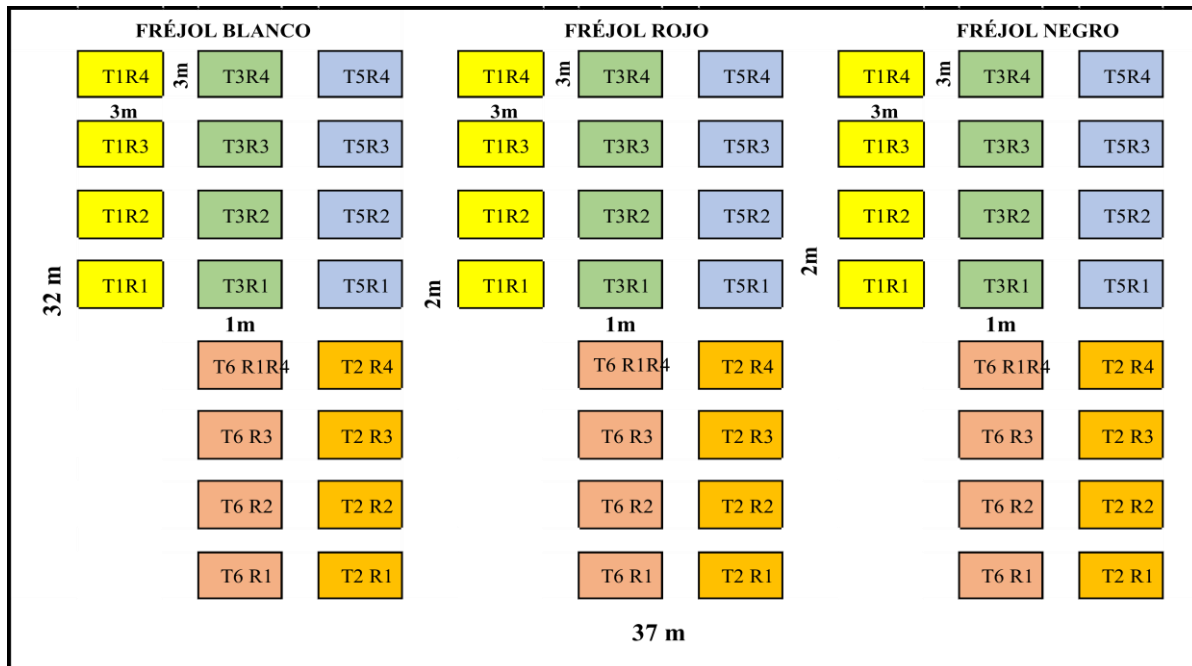


Figura 3. Croquis del diseño experimental de la investigación

### Detalle del esquema:

#### Fréjol blanco belén

V1T1	→ blanco belén + <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i>	4 repeticiones
V1T2	→ blanco belén + <i>Rhizobium phaseoli</i>	4 repeticiones
V1T3	→ blanco belén + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	4 repeticiones
V1T5	→ blanco belén + urea	4 repeticiones
V1T6	→ blanco belén (testigo)	4 repeticiones

#### Fréjol rojo

V2T1	→ Fréjol rojo + <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i>	4 repeticiones
V2T2	→ Fréjol rojo + <i>Rhizobium phaseoli</i>	4 repeticiones
V2T3	→ Fréjol rojo + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	4 repeticiones
V2T5	→ Fréjol rojo + urea	4 repeticiones
V2T6	→ Fréjol rojo (testigo)	4 repeticiones

## Fréjol negro

V3T1→Fréjol negro + <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i>	4 repeticiones
V3T2→Fréjol negro + <i>Rhizobium phaseoli</i>	4 repeticiones
V3T3→Fréjol negro + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	4 repeticiones
V3T5→Fréjol negro + urea	4 repeticiones
V3T6→Fréjol negro (Testigo)	4 repeticiones

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se lo realizó utilizando el paquete STATGRAPHIC® Plus ver. 5.0 para el sistema operativo Windows. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos, las variedades y la interacción de estos factores en los parámetros de nodulación (NN, PFN, PSN) y la biomasa de las plantas (PFR, PSR, PFF, PSF), se la obtuvo realizando un análisis de varianza multifactorial (Multifactor ANOVA). Para las evaluaciones de la fijación de N no se realizó análisis estadístico ya que se analizó el porcentaje de N total y no las proporciones de fijación de N.

Para determinar las diferencias entre variedades por tratamientos y factores se realizó un análisis de varianza por un vía (One-Way ANOVA) con nivel de significación  $p < 0.05$ .

Para correlacionar los parámetros de nodulación, biomasa y rendimiento de las plantas se realizó un análisis de correlación de Pearson (Pearson Linear Correlation) teniendo niveles de significación  $p < 0.05$  en el programa STATGRAPHIC® Centurión.

#### 3.4.1. Hipótesis Estadísticas

**H0:** La eficiencia de bacterias diazotróficas en interacción simbiótica con fréjol no difiere estadísticamente entre los tratamientos aplicados, al nivel del 5 % de significancia.

**H1:** La eficiencia de bacterias diazotróficas en interacción simbiótica con fréjol de al menos un tratamiento difiere estadísticamente a un nivel del 5 % de significancia.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. DETERMINAR EL EFECTO DE AISLADOS DE *RHIZOBIUM* NATIVOS DE LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR SOBRE PARÁMETROS DE NODULACIÓN DE LOS GENOTIPOS FRÉJOL ROJO, NEGRO Y BLANCO BELÉN EN CONDICIONES DE CAMPO.

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron 3 genotipos de fréjol (rojo, negro y blanco belén), en los cuales se evaluaron parámetros de nodulación, biomasa, componentes de rendimiento, contenido total de nitrógeno y rendimiento agrícola con el fin de determinar la eficiencia de aislados *Rhizobium* en las condiciones edafo-climáticas de la hoya de Loja.

Según Peralta, *et al.* (2012) el requerimiento hídrico promedio del cultivo del fréjol blanco belén es de 300 a 700 mm por ciclo (90-110 días); lo que corresponde a un aproximado de 4,54 milímetros por días ( $\text{mm día}^{-1}$ ) equivalente a  $136,2 \text{ mm mes}^{-1}$ . El total de precipitaciones en la hoya de Loja durante el mes de junio en que se realizó la siembra fue de 137 mm con un máximo de  $39,2 \text{ mm día}^{-1}$  (Tabla 15); si bien es cierto el requerimiento hídrico del cultivo de fréjol blanco es igual a las precipitaciones de dicho mes, se debe señalar que las precipitaciones se concentraron en un número determinado de días contribuyendo a la saturación y encharcamiento del suelo, dando como resultado la pérdida de la variedad blanco belén por lo cual en la presente investigación no presentan resultados para esta variedad.

**Tabla 15.** Cuadro de precipitación promedio en la hoya de Loja.

Año	PRECIPITACIÓN (mm)					Promedio de 6 meses
	Jun.	Jul.	Agos.	Sept.	Octu.	
2008	75,2	89,5	89,7	20,6	136,4	77,12
2009	43,3	55,7	61,9	55,2	69,7	52,6
2010	70,7	31,1	46,2	60,6	34,4	53,42
2011	72,6	100,6	39,7	90,2	80,7	73,4
2012	82,1	16,8	32	32,8	116,4	60,38

Año	PRECIPITACIÓN (mm)					Promedio de 6 meses
	Jun.	Jul.	Agos.	Sept.	Octu.	
<b>Promedio mensual (mm)</b>	68,78	58,74	53,9	51,88	87,52	
2013	137*	93,5	36,3	63,4	87,52	89,03
<b>Días max. (mm)</b>	39,2*	12,1	23,5	15,9	31,3	

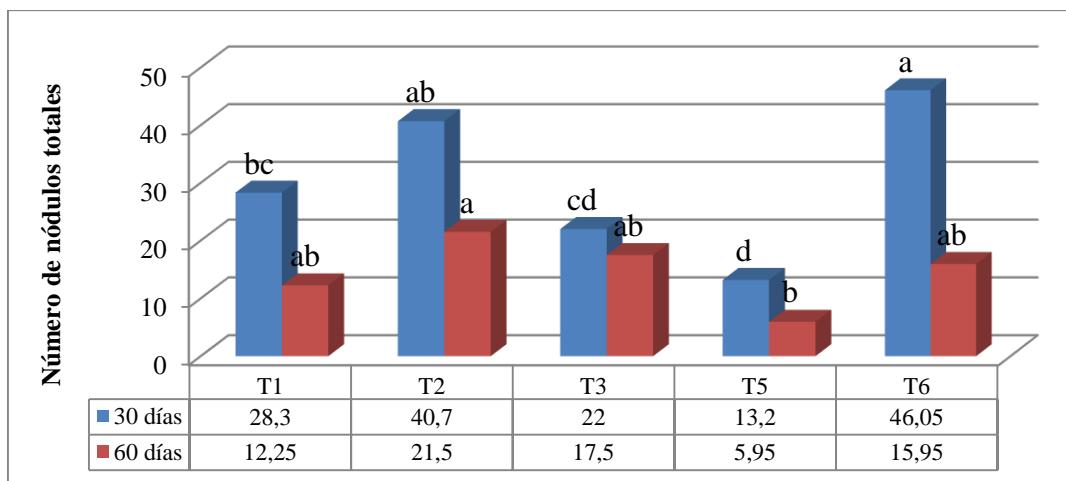
Fuente: Estación Meteorológica “La Argelia”, 2013.

#### 4.1.1. Efecto de los aislados bacterianos sobre los parámetros de nodulación

En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados de los parámetros de nodulación, correspondientes a número de nódulos totales (NN), PFN y PSN para cada uno de los tratamientos y genotipos analizados y la comparación entre tratamientos y genotipos para cada variable evaluada a los 30 y 60 DDS.

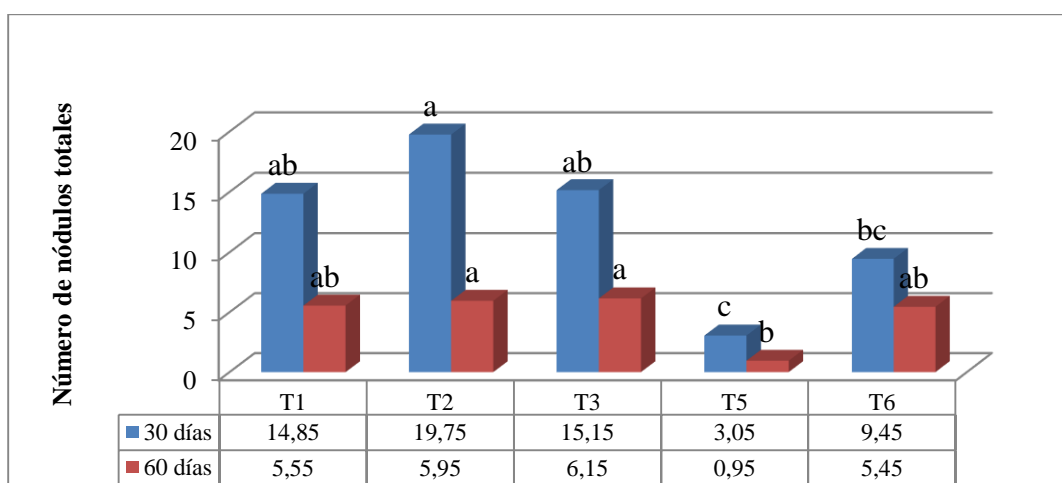
Tanto en el genotipo rojo y negro se evidenció presencia de nódulos en sus raíces, indicando que hubo compatibilidad en la interacción *Rhizobium*-leguminosa. En la figura 4 se muestra el número de nódulos totales para fréjol rojo a los 30 y 60 DDS, en la primera evaluación los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo ejercen una mayor acción de nodulación en las raíces para esta variedad, aunque no difieren estadísticamente entre ellos, a diferencia de los demás tratamientos (T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización) se evidencia una gran diferencia significativa entre tratamientos. Con respecto a la segunda evaluación (60 DDS) se observa una disminución progresiva de la nodulación con respecto a la primera. El T2-*Rhizobium phaseoli* presenta un mayor número de nódulos totales frente a los demás tratamientos con los cuales difiere significativamente, no así con el tratamiento T6-testigo.





**Figura 4.** Número de nódulos totales a los 30 y 60 DDS del genotipo fréjol rojo. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

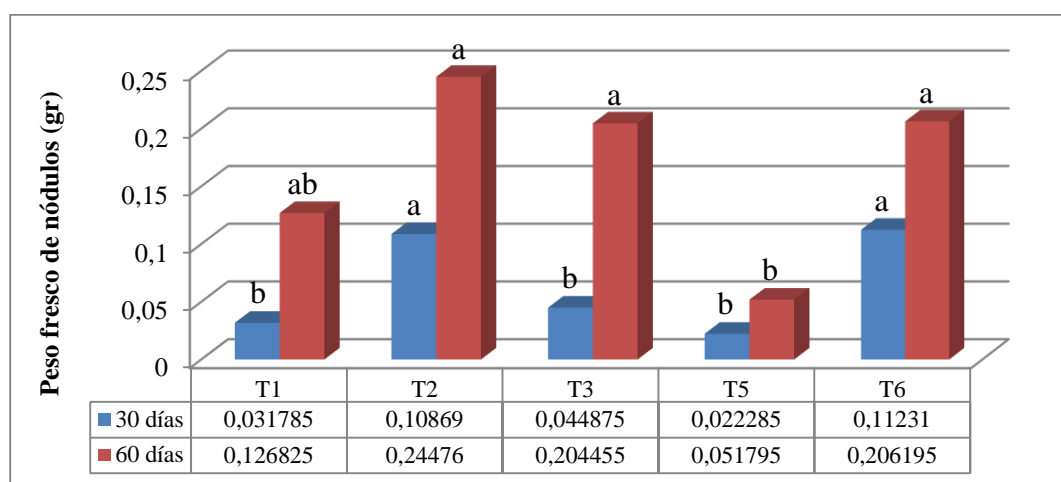
En la figura 5, se muestra el número de nódulos totales para fréjol negro a los 30 y 60 DDS, en la cual se puede observar que existe un menor número de nódulos con respecto a la variedad fréjol rojo. En la primera evaluación el T2-*Rhizobium phaseoli* presenta un mayor número de nódulos totales pero no difiere estadísticamente con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* y T3-*Rhizobium leguminosarum* respectivamente, no así con el T5-fertilización y T6-testigo donde hay diferencias estadísticas significativas para esta variable evaluada. En la segunda evaluación, los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T6-testigo presentan los mejores resultados en cuanto al número de nódulos, pero no difieren estadísticamente entre sí, mientras que la diferencia con el T5-fertilización es significativa.



**Figura 5.** Número de nódulos totales a los 30 y 60 DDS del genotipo fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey

Los resultados del peso fresco de nódulos (PFN) a los 30 y 60 DDS, se muestran en las figuras 6 y 7, tanto para fréjol rojo como para fréjol negro respectivamente. Este parámetro es de gran importancia ya que sirve como indicador para estimar las tasas de fijación de N<sub>2</sub> atmosférico en el cultivo de leguminosas en condiciones de bajos insumos (Urquiaga y Zapata, 2000).

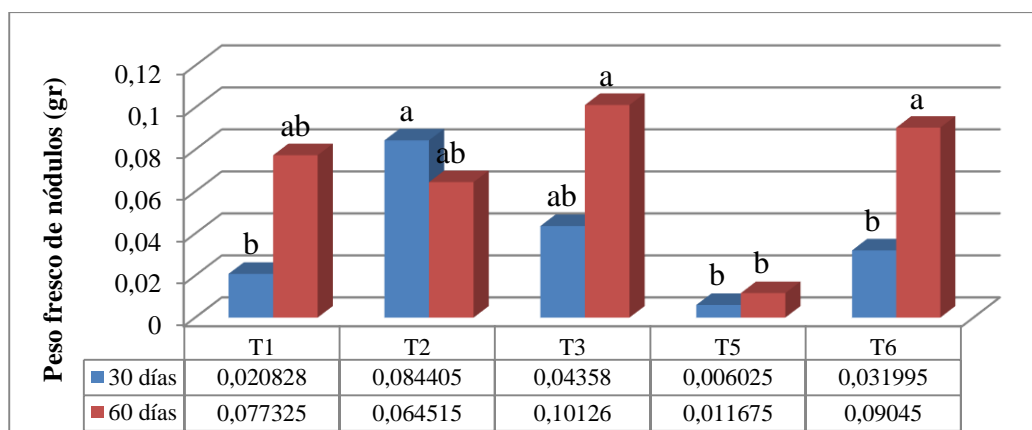
En la figura 6 se muestran los resultados del peso fresco de nódulos en fréjol rojo, donde se observa que en la primera evaluación (30 DDS) el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo presentaron los mejores resultados, pero no difieren significativamente entre sí; caso que no ocurre con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización en los cuales existe una diferencia significativa con los tratamientos T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo. Los resultados obtenidos en la segunda evaluación (60 DDS), muestran un incremento en el PFN con respecto a la primera evaluación. El T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T6-testigo presentaron los mejores resultados, pero sólo difieren significativamente con el T5-fertilización, mientras que no se observa una diferencia significativa con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*.



**Figura 6.** Peso fresco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol rojo. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

El PFN en el fréjol negro, como se muestra en la figura 7, los mejores resultados obtenidos a los 30 DDS, se presentan con la inoculación de las cepas el T2-*Rhizobium phaseoli* seguido del T3-*Rhizobium leguminosarum* pero estos no difieren significativamente entre sí, mientras que los resultados más bajos se presentan con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T5-fertilización y T6-testigo que difieren significativa con el T2-*Rhizobium phaseoli*. A los 60

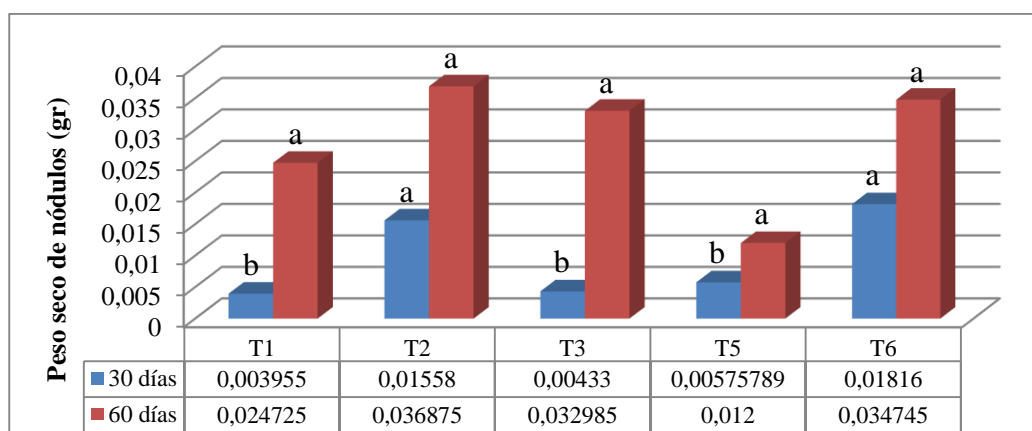
DDS se observa un aumento en el PFN con respecto al primer análisis, solo el T3-*Rhizobium leguminosarum* y T6-testigo difieren significativamente sobre el T5-fertilización que es el que presenta menor valor en PFN, mientras que el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* y T2-*Rhizobium phaseoli* no muestran diferencias significativas con los tratamientos restantes.



**Figura 7.** Peso fresco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

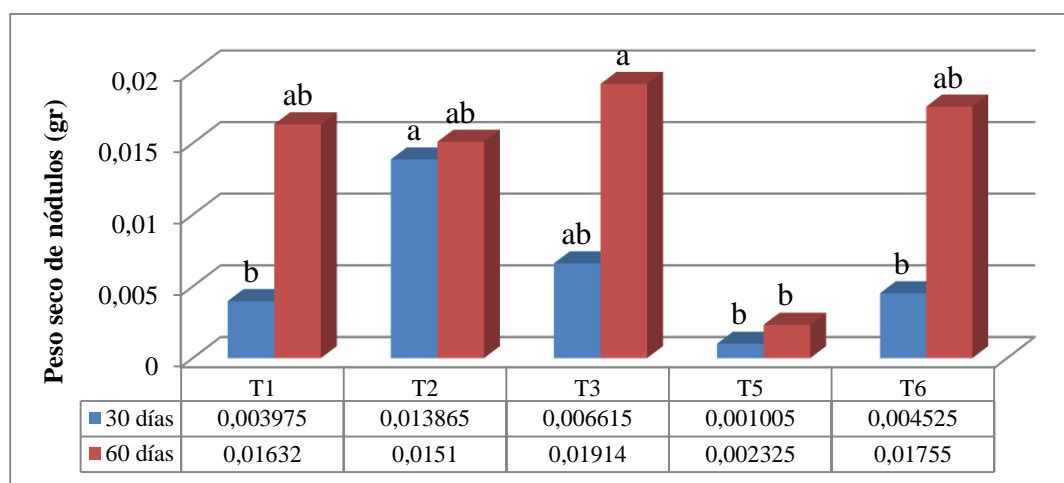
Los resultados obtenidos en la variable peso seco de nódulos (PSN) a los 30 y 60 DDS, se presentan en las figuras 8 y 9 correspondientes a cada una de la variedades.

En la figura 8 se puede observar que los tratamientos T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo difieren significativamente sobre los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización, conservando los mismos grados de significancia que en el PFN, mientras que en el segundo análisis no se observa diferencia significativas entre tratamientos.



**Figura 8.** Peso seco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol rojo. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En fréjol negro (fig. 9), al igual que en PFN, el tratamiento que muestra mejores resultados es el T2-*Rhizobium phaseoli*, el cual tiene una diferencia significativa respecto al T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T5-fertilización y T6-testigo, mientras que el T3-*Rhizobium leguminosarum* no difiere significativamente con los otros tratamientos, conservando así, los mismos grados de significancia que en el PFN. A los 60 DDS solo hay diferencia significativa entre el T3-*Rhizobium leguminosarum* y el T5-fertilización que es el que presenta menor resultado en cuanto a peso seco de nódulos.



**Figura 9.** Peso seco de nódulos a los 30 y 60 DDS en fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

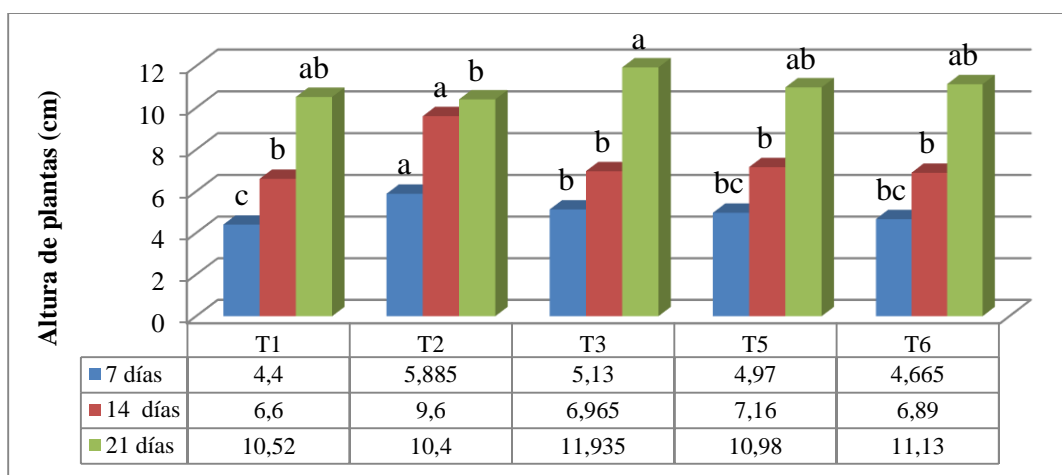
## 4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS AISLADOS DE *RHIZOBIUM* SOBRE LOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS, BIOMASA, COMPONENTES DE RENDIMIENTO, CONTENIDO TOTAL DE N Y RENDIMIENTO AGRÍCOLA DE LOS GENOTIPOS DE FREJOL, OBJETOS DE ESTUDIO.

### 4.2.1. Características morfológicas

En la figura 10 se muestran los resultados de la altura de plantas en fréjol rojo a los 7, 14 y 21 DDS. A los 7 DDS se observa homogeneidad en el crecimiento de las plantas, siendo el T2-*Rhizobium phaseoli* el que presenta los mejores resultados para esta variable evaluada, seguido por T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilización y T6-testigo. En el segundo análisis (14 DDS), sobresale el crecimiento con la inoculación de T2-*Rhizobium phaseoli* el cual difiere estadísticamente frente a los demás tratamientos, en lo que respecta al T1-

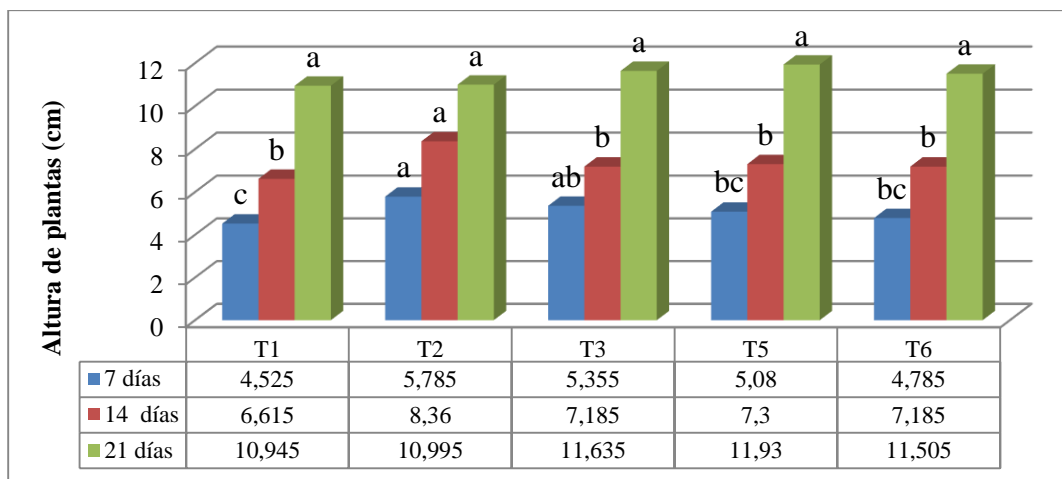
*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilización y T6-testigo mantienen una uniformidad en el crecimiento, por lo que no difieren estadísticamente entre sí.

Los resultados del tercer análisis (21 DDS), todos los tratamientos evaluados muestran homogeneidad en el crecimiento para la variable altura, siendo el T2-*Rhizobium phaseoli* el de menores resultados. A pesar de ello todos los tratamientos incluido el control influyen positivamente en el crecimiento de las plantas, destacándose el T3-*Rhizobium leguminosarum*.



**Figura 10.** Altura de plantas en el genotipo fréjol rojo a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey

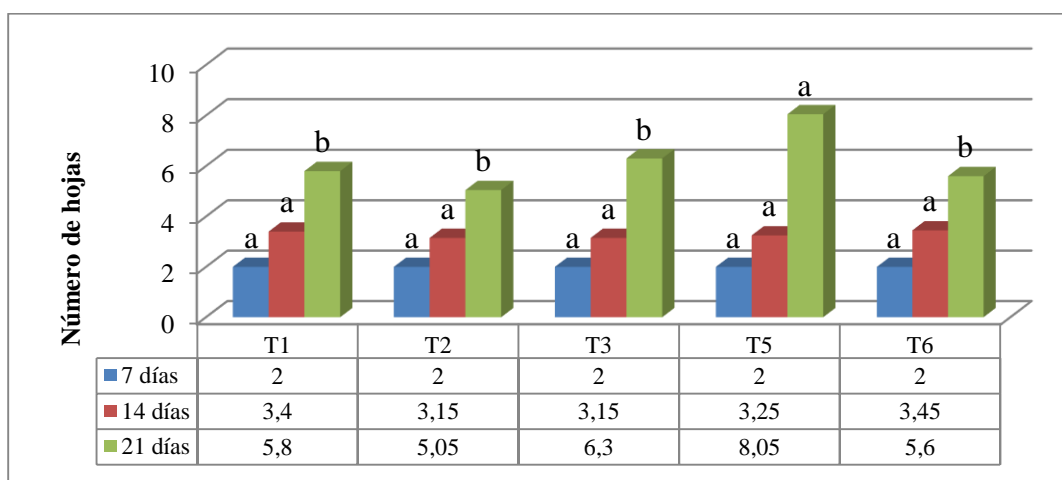
En la figura 11, se presentan los datos obtenidos de la altura de plantas en fréjol negro. A los 7 días se observa que no hubo un crecimiento homogéneo, siendo los tratamientos T2-*Rhizobium phaseoli* y el T3-*Rhizobium leguminosarum*, los de mejores resultados. A los 14 días, el T2-*Rhizobium phaseoli* con 8,36 cm de promedio, es el tratamiento que presenta los mejores resultados, el mismo que difiere estadísticamente con respecto a los demás tratamientos, mientras que en los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilización y T6-testigo se observa una homogeneidad en el crecimiento por lo que no existe diferencia significativa entre estos. En la tercera evaluación todos los tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí, lo que indica que a medida que avanzó el ciclo del cultivo el crecimiento de las plantas fue homogéneo.



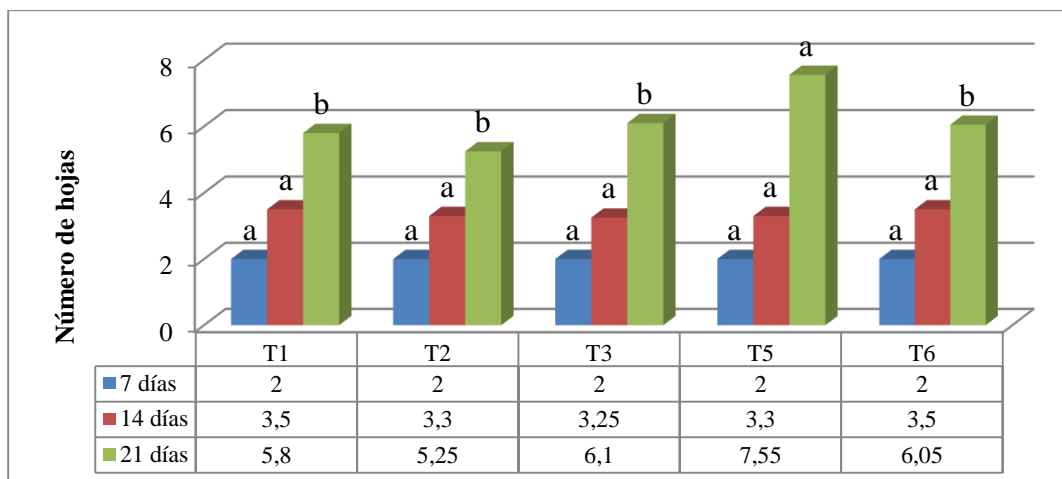
**Figura 11.** Altura de plantas en el genotipo fréjol negro a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

La comparación de medias de altura de las plantas en los dos genotipos de fréjol, no arrojan diferencias significativas a los 7, 14 y 21 DDS, excepto en el T5-fertilización, que en la tercera evaluación presenta un mayor crecimiento en fréjol rojo, por lo que la diferencia resulta significativa con respecto al fréjol negro (Tabla 16).

En la figura 12 y 13, correspondientes a fréjol rojo y negro respectivamente, se puede observar que en la primera y segunda evaluación (7 y 14 DDS), los tratamientos no difieren significativamente, mientras que en la tercera evaluación, el T5-fertilización presenta un mejor desarrollo en número de hojas, por lo que difiere significativamente con respecto a los otros tratamientos.



**Figura 12.** Número de hojas en fréjol rojo a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.



**Figura 13.** Número de hojas en fréjol negro a los 7, 14 y 21 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey

La comparación de medias para el número de hojas realizada a los 7, 14 y 21 DDS para ambos genotipos, no presentan diferencias significativas entre los tratamientos de cada variedad, lo que indica que cada una de las variedades responde de igual forma a las cepas inoculadas, fertilización y testigo (ver tabla 16).

**Tabla 16.** Comparación de los genotipos frejol rojo y negro respecto a los parámetros morfológicos.

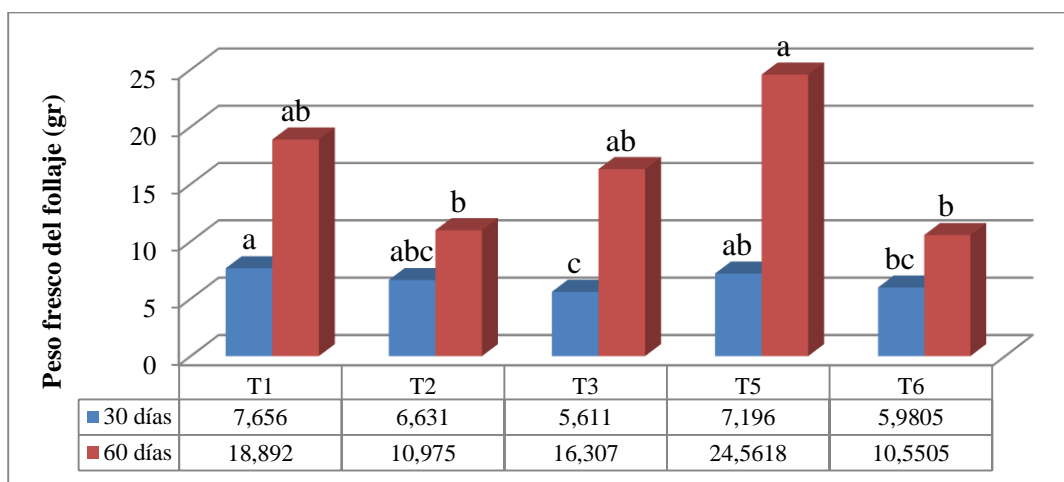
Variedades	7 DDS		14 DDS		21 DDS	
	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas	Altura (cm)	Nº Hojas
Frejol rojo	5,01 <sup>a</sup>	1,988 <sup>a</sup>	8,499 <sup>a</sup>	3,28 <sup>a</sup>	10,993 <sup>a</sup>	6,16 <sup>a</sup>
Frejol negro	5,106 <sup>a</sup>	1,996 <sup>a</sup>	7,329 <sup>a</sup>	3,37 <sup>a</sup>	11,402 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>
Error estándar	0,090*	0,005*	0,646*	0,046*	0,166*	0,172*

Letras desiguales en la columnas difieren para  $p < 0.05$  por Tukey (\*) error estándar.

En la tabla 16 se puede observar que no existe diferencia entre variedades con respecto a la altura y número de hojas, por lo que puede determinar que las cepas actuaron de igual forma en las dos variedades y que estas presentaron la misma capacidad de adaptación a las condiciones edafo-climáticas de la zona de experimentación.

#### 4.2.2. Biomasa

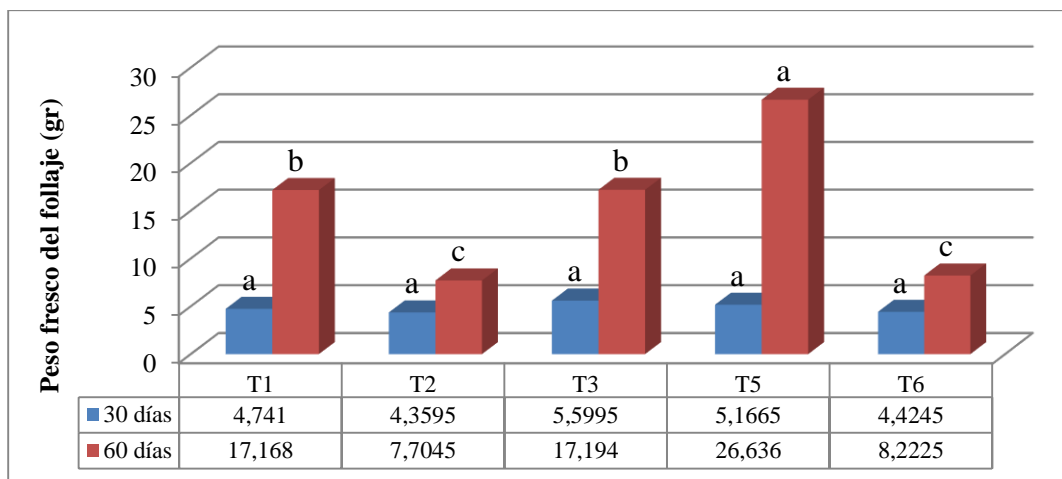
En la figura 14, se muestran los resultados correspondientes al fréjol rojo, respecto a la variable peso fresco del follaje (PFF) esto para los 30 y 60 DDS. En la primera evaluación el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* presentó un mayor desarrollo del follaje, el mismo que difiere significativamente con el T3-*Rhizobium leguminosarum* y el T6-testigo. A los 60 DDS, el T5-fertilización presentó un mayor PFF pero este no difiere significativamente con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* y el T3-*Rhizobium leguminosarum*. Por otro lado el T5-fertilización, difiere significativamente con respecto al T2-*Rhizobium phaseoli* y el T6-testigo.



**Figura 14.** Peso fresco del follaje en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

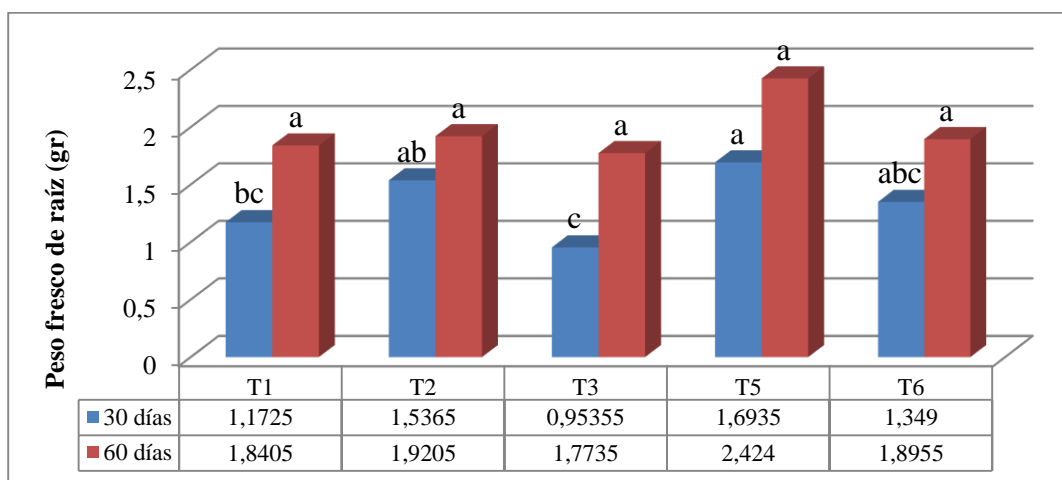
El análisis realizado a los 30 DDS en fréjol negro indica que no existieron diferencias significativas entre tratamientos ya que los valores promedio para la variable PFF se encuentran entre 4,35 y 5,59 g. En el segundo análisis el T5-fertilización presentó el mejor resultado en cuanto a PFF con un valor promedio de 26,63 g, el mismo que difiere significativamente con todos los tratamientos (figura 15), mientras tanto el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* y T3-*Rhizobium leguminosarum* con un valor de 17,16 y 17,19 g respectivamente, difieren significativamente con el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo, los mismos que presentan los valores más bajos.





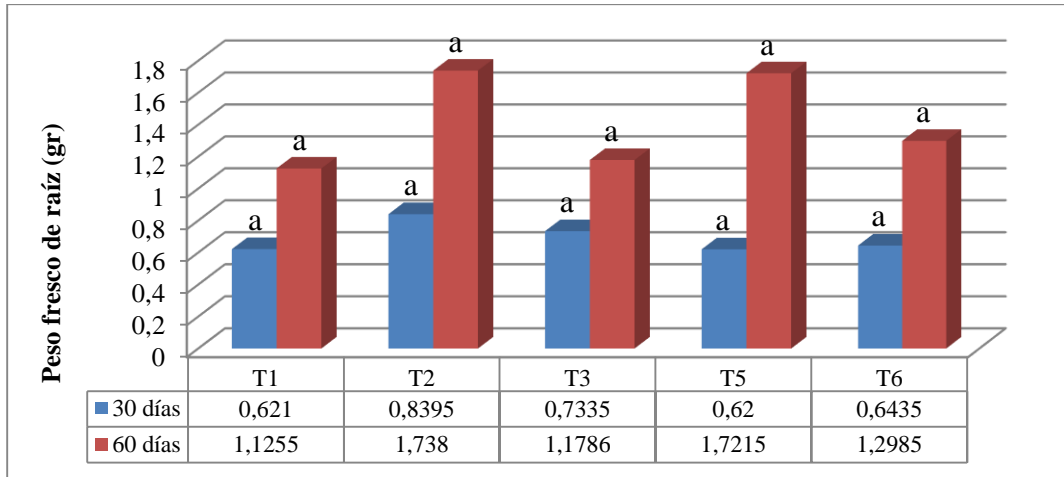
**Figura 15.** Peso fresco del follaje en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

Las evaluaciones realizadas para peso fresco de la raíz (PFR) en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS se muestran en la figura 16. A los 30 DDS el T5-fertilización presentó el mejor resultado, pero no difiere estadísticamente con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli* y el T6-testigo, presentando solo diferencias significativas con el T3-*Rhizobium leguminosarum*, mientras que a los 60 DDS no existen diferencias significativas entre tratamientos.



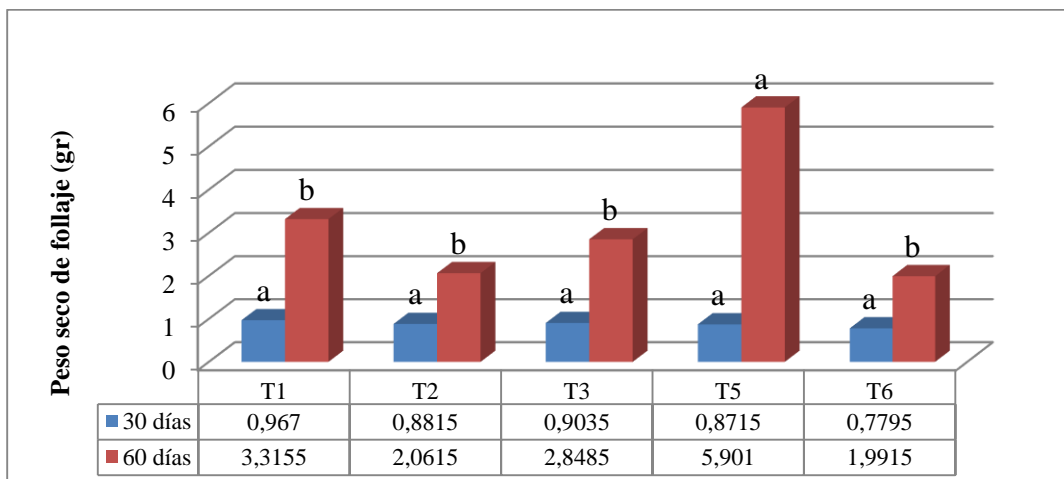
**Figura 16.** Peso fresco de la raíz en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En la figura 17 se muestran los datos correspondientes a PFR en fréjol negro. A los 30 como a los 60 DDS ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas entre sí.

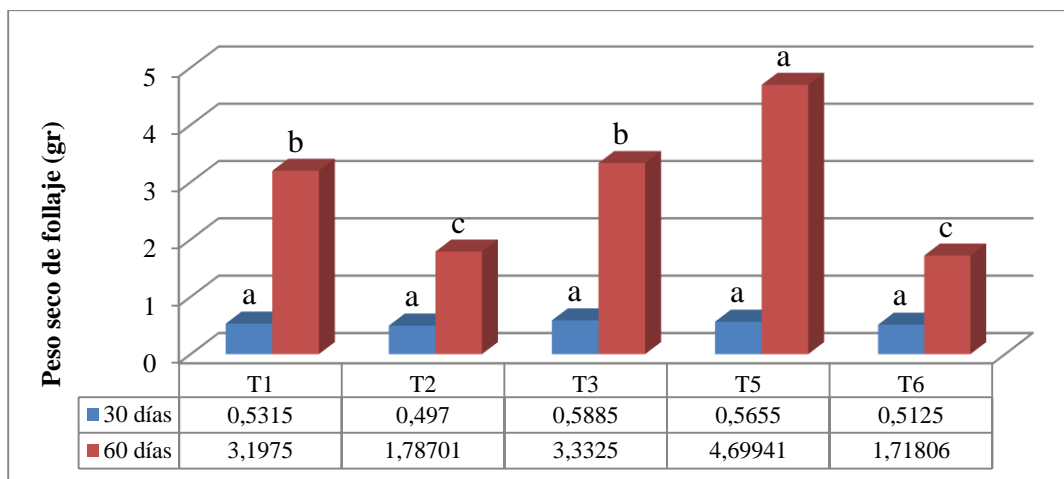


**Figura 17.** Peso fresco de la raíz en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

El peso seco de follaje (PSF) a los 30 DDS en fréjol rojo y fréjol negro, no muestran diferencias significativas en ningún tratamiento, pero en los dos casos se puede determinar que en la segunda evaluación (60 DDS) el T5-fertilización presenta los mejores resultados, mostrando una diferencia significativa sobre los demás tratamientos. En el caso de fréjol negro a los 60 DDS el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo son los tratamientos que presentaron los valores más bajos (figura 18 y 19).

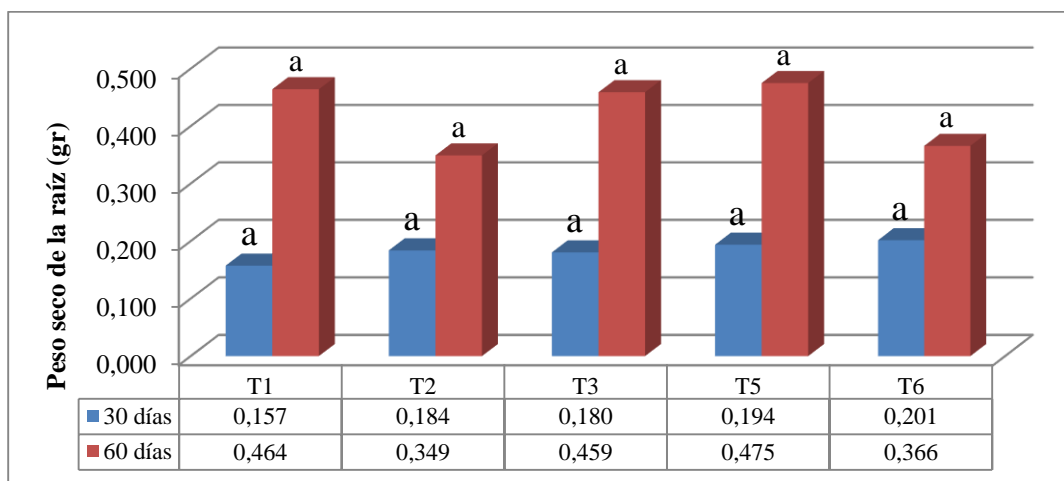


**Figura 18.** Peso seco de follaje en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

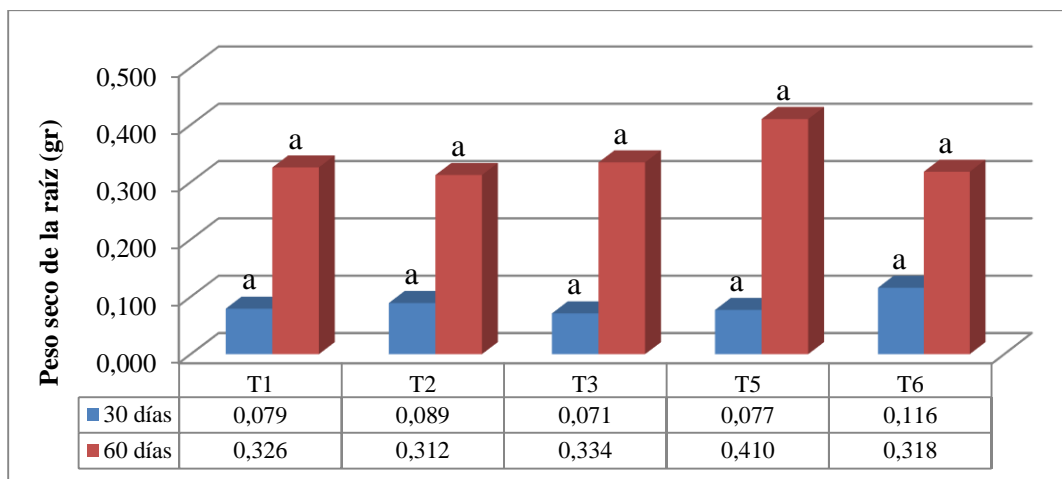


**Figura 19.** Peso seco de follaje en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En lo que respecta al peso seco de la raíz (PSR) tanto en fréjol rojo como fréjol negro, se lo determinó a los 30 y 60 DDS como muestran las figuras 20 y 21 respectivamente. Los resultados obtenidos en los 2 genotipos, indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos respecto a las 2 evaluaciones realizadas.



**Figura 20.** Peso seco de raíz en fréjol rojo a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey

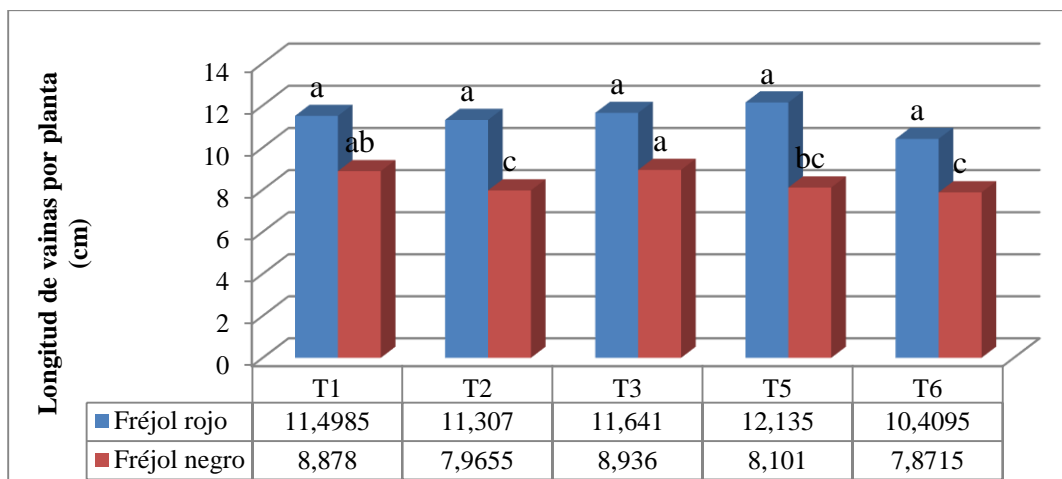


**Figura 21.** Peso seco de raíz en fréjol negro a los 30 y 60 DDS. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

### 4.2.3. Componentes del rendimiento

Los componentes del rendimiento son factores de gran importancia en la presente investigación, porque a través de estos se puede realizar una correlación para determinar la influencia de la aplicación de las cepas de *Rhizobium* con rendimiento agrícola en los genotipos investigados como son fréjol rojo y fréjol negro.

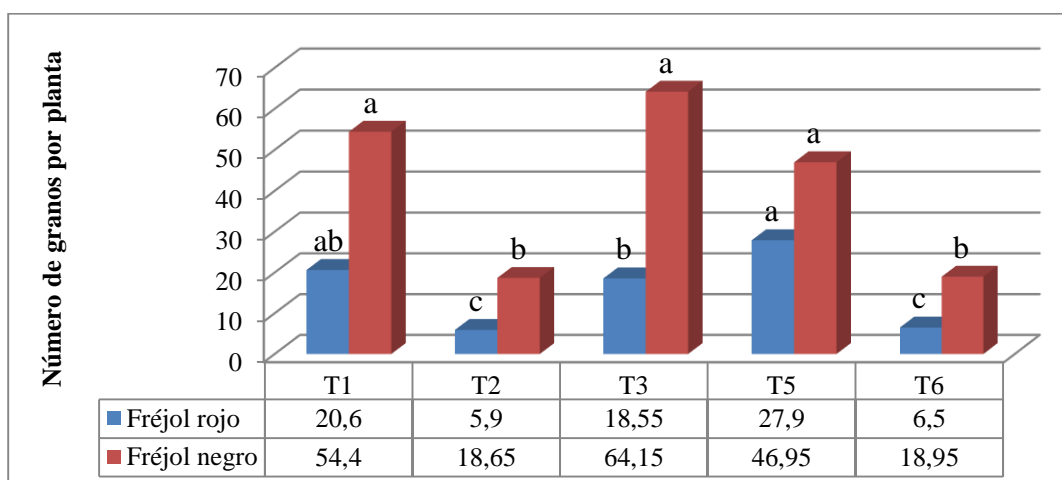
En la figura 22, se presentan los resultados obtenidos en las 2 variedades con respecto a la longitud de vainas, en la cual se puede observar que el fréjol rojo no presenta diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. En el caso del fréjol negro el T3-*Rhizobium leguminosarum* es el tratamiento que presenta los mejores resultados, aunque este no difiere significativamente con el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* debido a que sus valores promedios se encuentran entre 8,8 y 8,9 cm; lo que no sucede con el T2-*Rhizobium phaseoli*, T5-fertilización y T6-testigo donde la diferencia es significativa.



**Figura 22.** Longitud de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

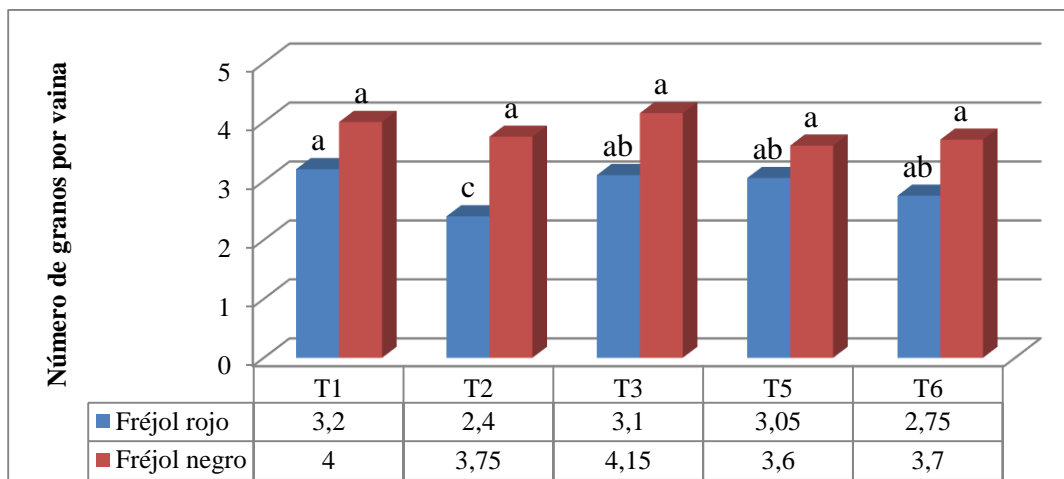
Los resultados obtenidos en cuanto al número de granos por planta (NGP) en fréjol rojo y fréjol negro se muestran en la figura 23. En fréjol rojo el T5-fertilización es el que presenta mayor número de granos por planta (promedio: 27,9), pero este no difiere estadísticamente con el T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae*, no así con los tratamientos T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T6-testigo, donde si hay diferencias estadísticas significativas.

El fréjol negro presentó mayor NGP en tres tratamientos: T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización con valores promedio de 54,4; 64,15 y 46,95 respectivamente y por lo tanto difieren significativamente con el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo que presentan los valores más bajos: 18,65 y 18,95.



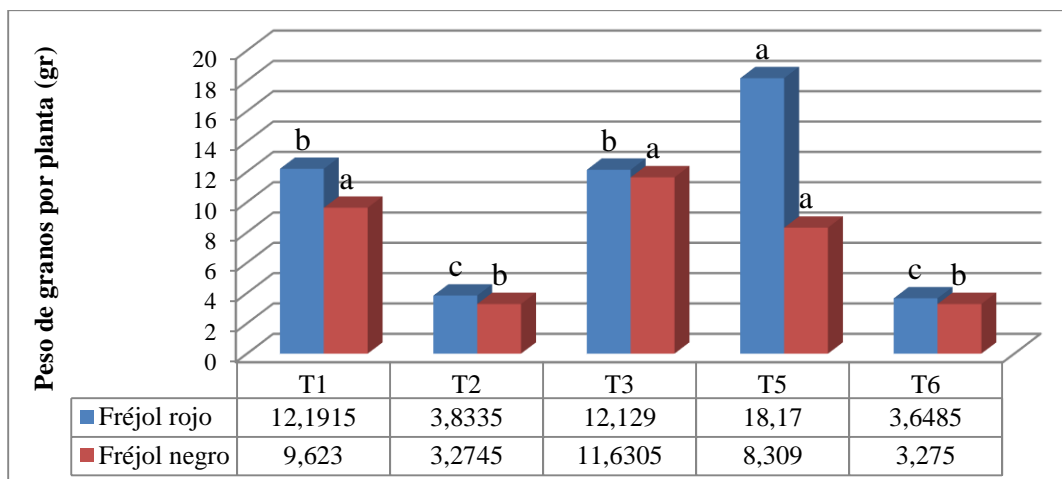
**Figura 23.** Número de granos por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

Los resultados obtenidos en base al número de granos por vainas (NGV) se presentan en la figura 24. En esta gráfica se puede observar que en el fréjol rojo, el tratamiento que obtuvo mejores resultados es el T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae*, pero a pesar de su valor promedio de 3,2 (GV) no difiere significativamente con el T3-*Rhizobium leguminosarum*, T5-fertilización y T6-testigo que presentan valores de 3,1; 3,05 y 2,75 respectivamente. Existe una diferencia significativa entre el T1, T3, T5 y T6 frente al T2-*Rhizobium phaseoli* que es el tratamiento con un valor menor de 2,4.



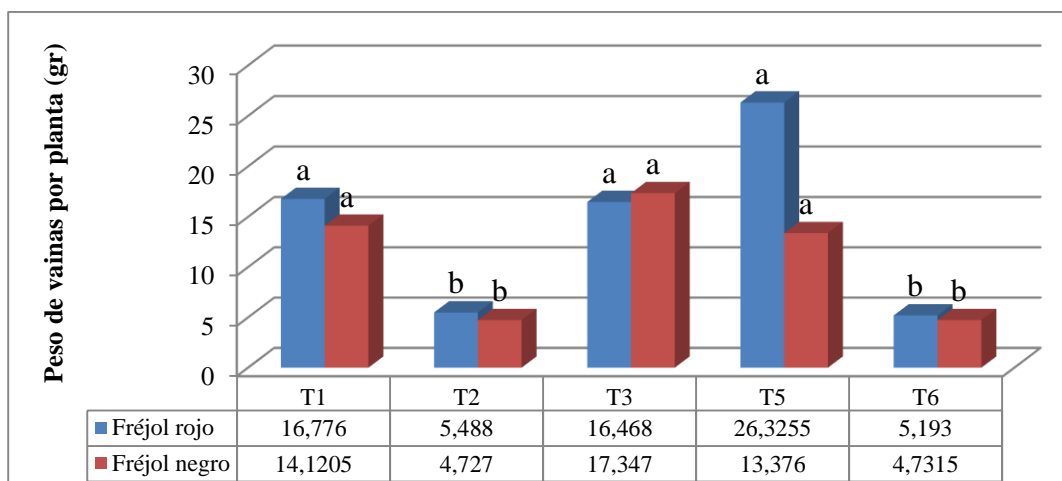
**Figura 24.** Número de granos por vaina en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey

La figura 25 muestra los resultados de peso de granos por planta (PGP) en fréjol rojo y fréjol negro respectivamente. En fréjol rojo se observa una gran variabilidad en el PGP entre tratamientos, siendo el T5-fertilización el de mejores resultados ya que el mismo difiere estadísticamente con el resto de tratamientos; el T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae* y T3-*Rhizobium leguminosarum* no difieren estadísticamente entre sí, pero si con el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo, que son los tratamientos de valores más bajos. En fréjol negro, la inoculación con las cepas; T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización son las de mejores resultados, contrario a ello el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo son los tratamientos con los valores más bajos



**Figura 25.** Peso de granos por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

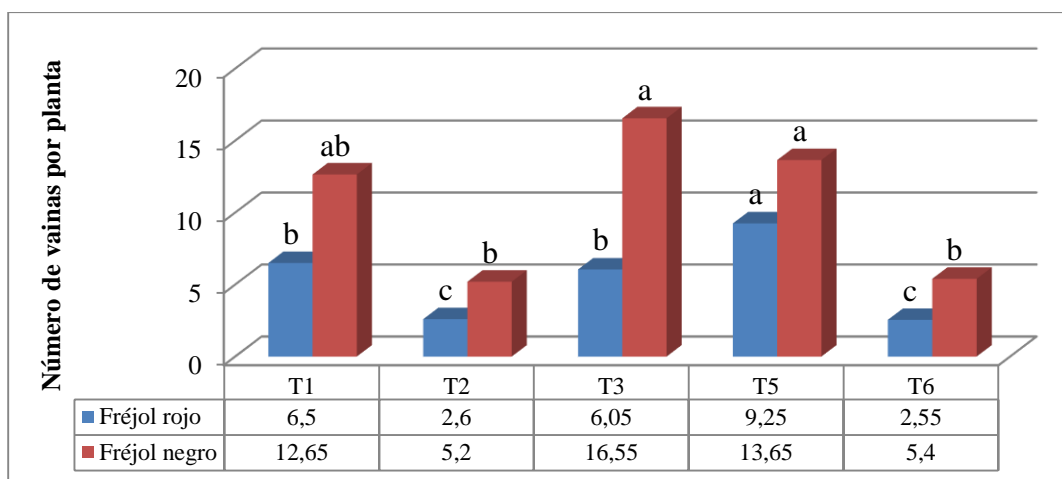
En lo que respecta al peso de vainas por planta las variedades (fréjol rojo y fréjol negro) en cada uno de los tratamientos estudiados no presentan diferencias estadísticas significativas, en la figura 26 se puede observar que el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización para las dos variedades tienen los mejores resultados, por lo que no difieren estadísticamente entre sí, pero si difieren con el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo que tienen los resultados más bajos.



**Figura 26.** Peso de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

El número de vainas por planta en fréjol rojo, responden de mejor forma en el T5-fertiización, el cual difiere estadísticamente con todos los tratamientos, seguido del T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* y T3-*Rhizobium leguminosarum*, los cuales presentan los mejores resultados después

del T5-Fertilización. En fréjol negro el T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización difieren estadísticamente con el T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo, que fueron los tratamientos con menor número de vainas, en tanto que el T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae* no presenta diferencias con ningún tratamiento (fig. 27).



**Figura 27.** Número de vainas por planta en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* *bv. mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

#### 4.2.4. Contenido total de nitrógeno

El contenido total de nitrógeno y proteína bruta se lo evaluó en grano, con el fin de determinar la efectividad de la interacción *Rhizobium* con los genotipos estudiados más el tratamiento fertilización y testigo. A continuación en las tablas 17 y 18 se muestran los resultados obtenidos del % de nitrógeno y proteína bruta (P.B) en fréjol rojo y fréjol negro respectivamente.

**Tabla 17.** Contenido de nitrógeno total en grano en los genotipos fréjol rojo y fréjol negro.

VARIEDADES	NITRÓGENO TOTAL (%)				
	<i>Rhizobium etli</i> <i>bv. mimosae</i> (T1)	<i>Rhizobium phaseoli</i> (T2)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3)	Fertilización (T5)	Testigo (T6)
Fréjol rojo	3,34	3,43	3,24	3,48	3,09
Fréjol negro	3,4	3,01	3,36	3,76	2,93



**Tabla 18.** Contenido de proteína bruta en grano en genotipos fréjol rojo y fréjol negro.

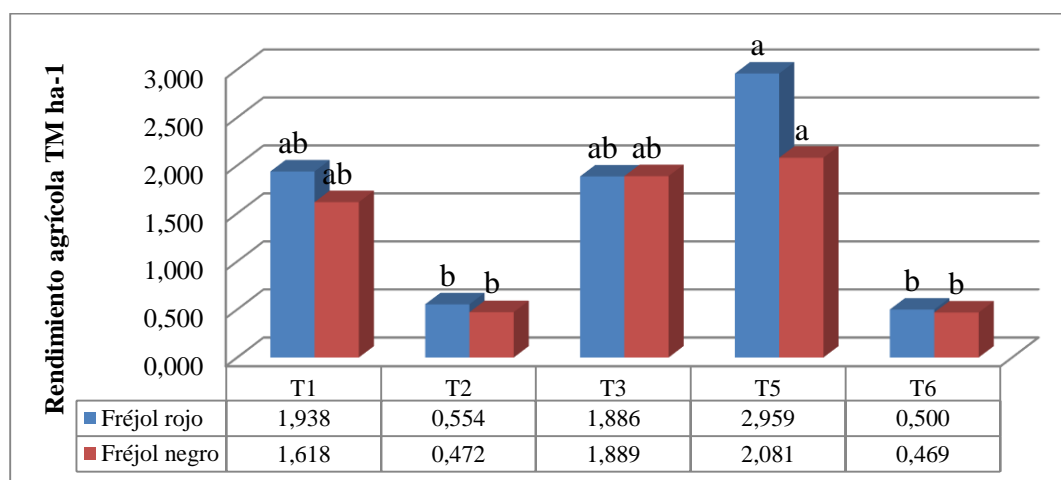
VARIETADES	PROTEÍNA BRUTA (%)				
	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> (T1)	<i>Rhizobium phaseoli</i> (T2)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (T3)	Fertilización (T5)	Testigo (T6)
Fréjol rojo	20,85	21,44	20,21	21,75	19,31
Fréjol negro	21,27	18,83	20,99	23,52	18,28

En Anexos se adjunta el análisis de nitrógeno total y proteína bruta realizado en fréjol rojo y fréjol negro en el laboratorio particular acreditado (SEIDLABORATORY Cía. Ltda.).

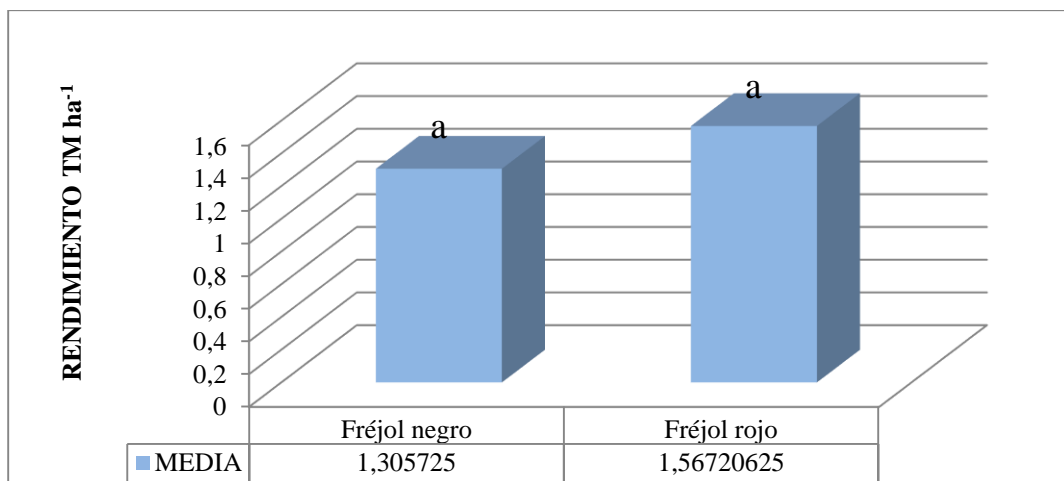
#### 4.2.5. Rendimiento agrícola

El rendimiento agrícola tanto en fréjol rojo como en fréjol negro presenta resultados similares. Los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* , T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización, aplicado en las dos variedades muestran los mejores resultados y no difiere estadísticamente entre ellos, en cambio los tratamientos T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo, presentan los valores más bajos (fig. 28).

La comparación de medias para el rendimiento agrícola, como se muestra en la figura 29, no existe diferencias significativas entre las dos variedades, sin embargo el fréjol rojo es la variedad que obtuvo un mayor rendimiento con 1,56 TM ha<sup>-1</sup>.



**Figura 28.** Rendimiento agrícola en fréjol rojo y fréjol negro. Tratamientos: *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (T1), *Rhizobium phaseoli* (T2), *Rhizobium leguminosarum* (T3), fertilización (T5), testigo (T6). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.



**Figura 29.** Comparación de medias para rendimiento en fréjol rojo y fréjol negro. Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

En los cuadros 19 y 20 se muestran las correlaciones estadísticas realizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson  $p < 0,05$  entre las diferentes variables evaluadas tanto para los parámetros de nodulación y componentes del rendimiento en condiciones de campo en los genotipos estudiados.

**Tabla 19.** Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol rojo.

	LVP	NGP	NGV	NN	NVP	PFF	PFN	PFR	PGP	PSF	PSN	PSR	PVP
<b>LVP</b>													
P-value*													
<b>NGP</b>	0,1078												
P-value*	0,2857												
<b>NGV</b>	0,2699	0,4210											
P-value*	<b>0,0066</b>	<b>0,0000</b>											
<b>NN</b>	-0,2734	-0,3897	-0,2020										
P-value*	<b>0,0059</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0439</b>										
<b>NVP</b>	0,0617	0,9511		-0,4014									
P-value*	0,5422	<b>0,0000</b>	<b>0,0387</b>	<b>0,0000</b>									
<b>PFF</b>	0,0447	0,1916	0,0832	0,0192	0,1873								
P-value*	0,6588	0,0561	0,4105	0,8496	0,0621								
<b>PFN</b>	-0,1003	-0,3193	-0,1488	0,5244	-0,3128	-0,1065							
P-value*	0,3207	<b>0,0012</b>	0,1395	<b>0,0000</b>	<b>0,0015</b>	0,2917							
<b>PFR</b>	-0,0137	-0,0584	-0,2131	0,1265	-0,0193	0,4729	0,0784						
P-value*	0,8925	0,5638	<b>0,0332</b>	0,2097	0,8491	<b>0,0000</b>	0,4382						
<b>PGP</b>	0,2168	0,9267	0,3669	-0,4818	0,9154	0,1832	-0,3833	-0,0527					
P-value*	<b>0,0303</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0680	<b>0,0001</b>	0,6025					
<b>PSF</b>	-0,0079	0,1537	0,0178	0,1016	0,1712	0,8296	-0,0659	0,3301	0,1434				
P-value*	0,9378	0,1268	0,8608	0,3147	0,0885	<b>0,0000</b>	0,5147	<b>0,0008</b>	0,1545				
<b>PSN</b>	-0,1559	-0,2615	-0,1045	0,4997	-0,2711	-0,0601	0,6858	0,0722	-0,3200	-0,0582			
P-value*	0,1214	<b>0,0086</b>	0,3006	<b>0,0000</b>	<b>0,0064</b>	0,5527	<b>0,0000</b>	0,4752	<b>0,0012</b>	0,5651			
<b>PSR</b>	-0,1485	-0,0400	-0,2830	0,2250	0,0163	0,3800	0,0994	0,7184	-0,0916	0,4536	0,1326		
P-value*	0,1404	0,6926	<b>0,0043</b>	<b>0,0244</b>	0,8722	<b>0,0001</b>	0,3251	<b>0,0000</b>	0,3647	<b>0,0000</b>	0,1884		
<b>PVP</b>	0,2143	0,9160	0,3301	-0,4623	0,9119	0,1856	-0,3637	-0,0219	0,9894	0,1442	-0,3072	-0,0696	
P-value*	<b>0,0323</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0645	<b>0,0002</b>	0,8284	<b>0,0000</b>	0,1524	<b>0,0019</b>	0,4913	

Leyenda: LVP: Longitud de vainas por planta, NGP: Número de granos por planta, NGV: Número de granos por vaina, NN: Número de nódulos, NVP: Número de vainas por planta, PFF: Peso fresco del follaje, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PGP: Peso de granos por planta, PSF: Peso seco del follaje, PSN: Peso seco de los nódulos, PSR: Peso seco de la raíz, PVP: Peso de vainas por planta. P-value\*: Correlación de Pearson para  $P < 0,05$ .

**Tabla 20.** Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol negro.

	LVP	NGP	NGV	NN	NVP	PFF	PFN	PFR	PGP	PSF	PSN	PSR	PVP
<b>LVP</b>													
P-value*													
<b>NGP</b>	0,4305												
P-value*	<b>0,0000</b>												
<b>NGV</b>	0,5820	0,2569											
P-value*	<b>0,0000</b>	<b>0,0103</b>											
<b>NN</b>	0,1921	-0,0887	0,2217										
P-value*	0,0568	0,3824	<b>0,0274</b>										
<b>NVP</b>	0,1900	0,8844	-0,0985	-0,1570									
P-value*	0,0596	<b>0,0000</b>	0,3320	0,1206									
<b>PFF</b>	0,2422	0,3651	0,2282	0,0762	0,2888								
P-value*	<b>0,0157</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0231</b>	0,4537	<b>0,0037</b>								
<b>PFN</b>	0,0007	-0,1868	0,0488	0,5169	-0,1790	0,1092							
P-value*	0,9944	0,0642	0,6313	<b>0,0000</b>	0,0762	0,2821							
<b>PFR</b>	0,0112	-0,0302	0,0370	0,3624	-0,0346	0,2221	0,3534						
P-value*	0,9122	0,7666	0,7165	<b>0,0002</b>	0,7338	<b>0,0272</b>	<b>0,0003</b>						
<b>PGP</b>	0,4113	0,9698	0,1364	-0,0945	0,9178	0,3622	-0,1673	-0,0340					
P-value*	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,1781	0,3522	<b>0,0000</b>	<b>0,0002</b>	0,0978	0,7382					
<b>PSF</b>	0,2087	0,3411	0,1692	0,0579	0,2948	0,9114	0,1293	0,1870	0,3434				
P-value*	<b>0,0381</b>	<b>0,0006</b>	0,0941	0,5695	<b>0,0031</b>	<b>0,0000</b>	0,2021	0,0638	<b>0,0005</b>				
<b>PSN</b>	-0,0163	-0,1800	0,0542	0,4990	-0,1740	0,1239	0,9699	0,3045	-0,1543	0,1521			
P-value*	0,8725	0,0746	0,5944	<b>0,0000</b>	0,0850	0,2216	<b>0,0000</b>	<b>0,0022</b>	0,1272	0,1328			
<b>PSR</b>	-0,0271	-0,0649	0,0816	0,1052	-0,0548	0,0947	0,1584	0,2842	-0,0696	0,0993	0,1425		
P-value*	0,7902	0,5235	0,4220	0,3002	0,5902	0,3513	0,1174	0,0044	0,4937	0,3282	0,1594		
<b>PVP</b>	0,3441	0,9383	0,0372	-0,1175	0,9596	0,3300	-0,1845	-0,0359	0,9806	0,3190	-0,1719	-0,0633	
P-value*	0,0005	0,0000	0,7148	0,2468	0,0000	0,0009	0,0675	0,7246	0,0000	0,0013	0,0890	0,5338	

Leyenda: LVP: Longitud de vainas por planta, NGP: Número de granos por planta, NGV: Número de granos por vaina, NN: Número de nódulos, NVP: Número de vainas por planta, PFF: Peso fresco del follaje, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PGP: Peso de granos por planta, PSF: Peso seco del follaje, PSN: Peso seco de los nódulos, PSR: Peso seco de la raíz, PVP: Peso de vainas por planta. P-value\*: Correlación de Pearson para  $P < 0,05$ .

En las tablas anteriormente descritas, se observa que en fréjol rojo las correlaciones son significativas entre las variables de cada factor evaluado como es: parámetros de nodulación-biomasa y componentes del rendimiento, siendo las correlaciones más importantes NN-PFN y PSN con el 52 y 49 % respectivamente; en biomasa se determinan correlaciones positivas entre PFF con PFR en un 47 %, PSR 38 % y PSF 82 % y finalmente componentes del rendimiento LVP-NGV y PGP, NGP-NGV los cuales se correlacionan positivamente entre sí con 26, 21, y 42 % respectivamente.

En el caso del fréjol negro la correlación de las variables evaluadas es similar en relación al fréjol rojo, los valores considerados significativos para esta variedad se los puede observar en las relaciones entre NN-NGP y PFN con un 22 y 51 % respectivamente, NN-PFR con el 36 %; además existe una significativa correlación entre parámetros de biomasa como PFF-NVP y NGP con 28 y 36 %, finalmente las correlaciones sobresalientes en cuanto a los componentes del rendimiento LVP-NGP y NGV con un 43 y 58 % respectivamente y LVP-PGP con 41 %.

Los valores presentados con respecto a cada variable evaluada, son significativos para éstas, sin embargo los parámetros de mayor importancia como son nodulación y componentes de rendimiento no se encuentran relacionados entre sí, excepto en el caso del fréjol negro, en donde se puede observar la relación NN-NGP con un 38 %, con ello podemos afirmar que la inoculación de *Rhizobium* influyó positivamente con el genotipo fréjol negro.

#### **4.3. EVALUAR LA INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE LOS AISLADOS SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO EN EL ÁREA DE EXPERIMENTACIÓN.**

Los resultados obtenidos de los análisis permiten determinar las condiciones y disponibilidad de los nutrientes antes del establecimiento del cultivo, así como las condiciones finales luego de la aplicación de los aislados de *Rhizobium*.

##### **4.3.1. Influencia de los aislados en las propiedades físicas del suelo**

En el análisis realizado en la zona de experimentación, se pudo determinar que la aplicación de las cepas de *Rhizobium* no influyó en las propiedades del suelo, es decir, que tanto al inicio

como al final del ensayo se encontró un suelo de textura y clase textural Franco-Arcilloso-Limoso. El análisis completo correspondiente se adjunta en Anexos.

#### **4.3.2. Influencia de los aislados en las propiedades químicas del suelo**

En cuanto a las propiedades químicas, se determinó que la aplicación de *Rhizobium* no influyó sobre el parámetro pH ya que el suelo se mantuvo ligeramente ácido (5,6-5,7) en los dos análisis realizados; así mismo el % de MO se encuentra entre bajo y medio (1,6-2,5) por lo tanto no se pudo determinar si realmente las bacterias inoculadas ejercieron efecto sobre este parámetro; sin embargo, donde se pudo evidenciar un resultado favorable es en el % de N (componente principal de la MO), ya que en el primer análisis la materia orgánica estaba en un nivel medio (1,6 %) mientras que en el segundo análisis se pudo notar un incremento de N (77,2 ppm). Los resultados de los micronutrientes, no se ven influenciados por la aplicación de las cepas de *Rhizobium*. Los análisis completos se adjuntan en Anexos, con toda la información correspondiente a pH, CE, MO, N-P-K, y microelementos (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn).

#### **4.3.3. Evaluación microbiológica**

En lo que corresponde a los análisis de bacterias, hongos y actinomycetos, se realizaron dos evaluaciones, al inicio y al final del ensayo. En la figura 30 se presenta el análisis de bacterias, en donde se puede observar que en el primer análisis el fréjol rojo presentó  $3,5 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>, en el segundo análisis, el número de microorganismos se elevó positivamente, obteniéndose un total de  $3,5 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup>, difiriendo significativamente en las dos evaluaciones realizadas. Lo mismo sucede con fréjol negro, en la primera evaluación se observó un número de  $3,5 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>, en la segunda evaluación el número de microorganismos se incrementó a  $3,1 \times 10^9$  UFC g<sup>-1</sup>. En ambos casos, estos valores se los obtuvo de la dilución  $10^{-6}$ .

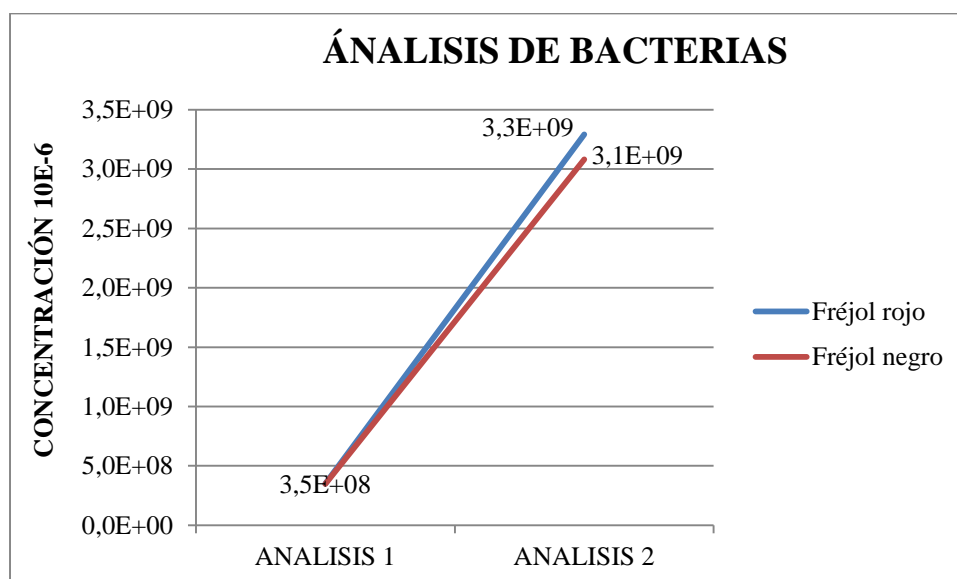
En cuanto al análisis de hongos, en la figura 31 se puede observar que el fréjol rojo presentó diferencias estadísticas en las 2 evaluaciones, en el primer análisis se determinó un número total de  $1,8 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> y una disminución en la segunda evaluación con  $5,0 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>, mientras que en fréjol negro, no existen diferencias estadísticas en el primer y segundo

análisis, a pesar de que los valores se encuentran entre  $1,8$  y  $1,9 \text{ e}+6 \text{ UFC g s}^{-1}$ . La dilución que presentó mayor número de colonias fue  $10^{-5}$ .

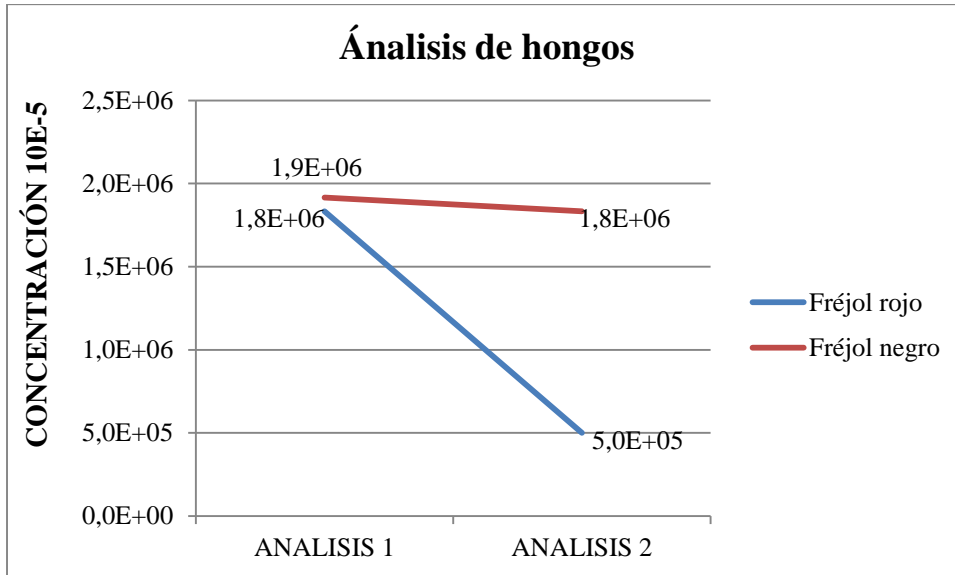
El análisis de actinomycetos (fig. 32), indica que no existen diferencias significativas en fréjol rojo con respecto al número de UFC en la primera y segunda evaluación, pero se puede observar que en la segunda evaluación el número de colonias se redujo considerablemente de  $2,8$  a  $1,3 \text{ e}+8 \text{ UFC g s}^{-1}$ , lo mismo sucede con fréjol negro en donde no se encuentra diferencias significativas, pero es notorio la disminución del número de total de colonias de  $3,1$  a  $2,1 \text{ e}+8 \text{ UFC g s}^{-1}$ .

**Tabla 21.** Unidades formadoras de colonias en los análisis de suelo realizados en el lugar del experimento.

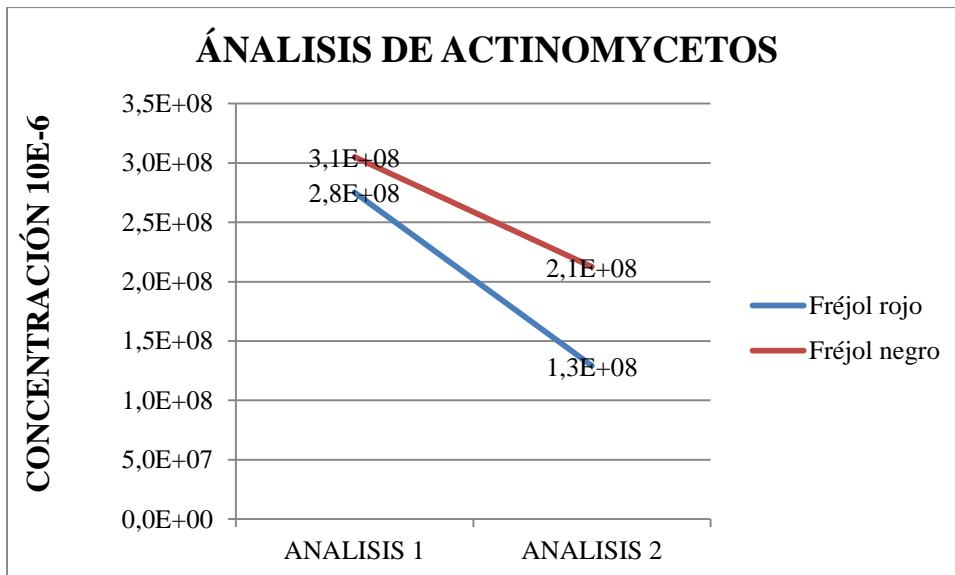
Microorganismo	Variedad	Análisis 1	Análisis 2
Bacterias	Fréjol rojo	$3,5 \text{ e}+8$	$3,3 \text{ e}+9$
	Fréjol negro	$3,5 \text{ e}+8$	$3,1 \text{ e}+9$
Hongos	Fréjol rojo	$1,8 \text{ e}+6$	$5,0 \text{ e}+5$
	Fréjol negro	$1,9 \text{ e}+6$	$1,8 \text{ e}+6$
Actinomycetos	Fréjol rojo	$1,8 \text{ e}+06$	$5,0 \text{ e}+05$
	Fréjol negro	$1,9 \text{ e}+06$	$1,8 \text{ e}+06$



**Figura 30.** Análisis de bacterias en fréjol rojo y fréjol negro en la hoja de Loja.



**Figura 31.** Análisis de hongos en fréjol rojo y fréjol negro en la hoya de Loja.



**Figura 32.** Análisis de actinomicetos en fréjol rojo y fréjol negro en la hoya de Loja.



## V. DISCUSIÓN

La presente investigación se la realizó en condiciones de campo con el objetivo de conocer el comportamiento de tres cepas: *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum* asociadas a la variedad frejol rojo y fréjol negro más el tratamiento fertilizado y el control. Se estudió la influencia de las cepas sobre parámetros de nodulación, características morfológicas, biomasa, componentes del rendimiento y rendimiento agrícola.

En cuanto a la nodulación se logró determinar que esta estuvo influenciado positivamente por las cepas inoculadas, es decir, que hubo una interacción beneficiosa *Rhizobium*-leguminosa, lo cual se logró evidenciar con los valores encontrados en el análisis de varianza para el NN en las dos variedades. Se pudo observar que en fréjol rojo el mayor número de nódulos totales se presentó a los 30 DDS en el T2-*Rhizobium phaseoli* (40,7 nódulos planta<sup>-1</sup>), comparando con los resultados obtenidos por González *et al.*, (2012), el cual registró valores promedio de 8,31 nódulos planta<sup>-1</sup> y Cayo *et al.*, (2004) valores de 24-94 nódulos planta<sup>-1</sup> con la aplicación de dos cepas de *Rhizobium*; en tanto que el T5-fertilización, fue el que presentó menor número de nódulos, según el IICA (2000) la alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo no inhibe la nodulación, pero si disminuye la eficiencia de la misma.

Verástegui (2009), explica que el NN varía de acuerdo a la presencia de bacterias nativas en el suelo, ya que estas pueden competir con el inóculo resultando un factor crítico, debido a que la cepa introducida siempre está en menor cantidad que las bacterias propias del suelo y por lo tanto, estas se antepone hacia la planta huésped (leguminosa) induciendo la formación de nódulos de baja productividad. Es por ello, que en nuestra investigación aunque el T2-*Rhizobium phaseoli* obtuvo el mayor número de nódulos por planta, este no presenta diferencias significativas con el T6-testigo, lo cual se le puede atribuir lo anteriormente descrito, posiblemente existió competencia de cepas nativas con las cepas inoculadas, impidiendo una simbiosis de mayor eficiencia.

En fréjol negro las cepas de *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium etli* bv. *mimosae* y *Rhizobium leguminosarum* presentaron mayor número de nódulos con respecto a los demás tratamientos. Aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos para cada variedad; estadísticamente las dos variedades difieren entre sí, presentando los mejores resultados el fréjol rojo a los 30 y 60 DDS frente al fréjol negro. Es importante mencionar que en las dos

variedades, a los 60 DDS se obtuvo una considerable disminución del NN, lo cual se puede ratificar con los resultados obtenidos por Segura *et al.*, (2006) en donde menciona que el número de nódulos activos y muertos disminuyen conforme avanza la edad de la planta, además de: i) las condiciones ambientales y edáficas; ii) capacidad de nodulación y fijación de las cepas; iii) las poblaciones nativas que compiten con las cepas introducidas (Mora, 1995) y iv) la característica específica del género *Rhizobium* de poder adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas, encontrándose en una diversidad de tipos de suelos (Granda *et al.*, 2009).

El peso seco de nódulos para ambas variedades, muestran valores más altos en fréjol rojo en la segunda evaluación (60 DDS) con un promedio de 0,032-0,036 g, a diferencia del fréjol negro donde no se muestran diferencias significativas en las dos evaluaciones realizadas. Según Brunet (1999), reporta que todas las cepas probadas presentaron buena infección en la variedad de fréjol utilizada, el cual se evidenció con el incremento del PSN conforme avanza la edad de la planta, lo que indica la efectividad de las cepas estudiadas en esas condiciones. En un trabajo realizado por Mora (1995) en la variable peso seco de nódulos, la mayor respuesta fue obtenida con la inoculación de las cepas de *Rhizobium* CR-455, CR- 487, CR-BSA y CR-492, los cuales mostraron diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos (sin inoculación y sin aplicación de N). En nuestra investigación se pudo determinar que el T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T5-fertilización en fréjol rojo y T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T5-fertilización y T6-testigo en fréjol negro ambos a los 30 DDS fueron los que presentaron el menor PSN, posiblemente por dos razones: primero, en el suelo se encontraban rizobios nativos viables capaces de infectar las raíces y estos inhibieron de alguna manera la interacción de las cepas inoculadas con las variedades establecidas; y segundo, por la capacidad que poseen las cepas inoculadas para interactuar de diferente manera con las dos variedades, así lo menciona Subía (2001), que el desarrollo nodular y por ende el PSN dependen tanto de la cepa inoculada como de la variedad del hospedero.

La altura de las plantas, se mostró homogénea para ambas variedades. En fréjol rojo y fréjol negro se pudo determinar que el T2- *Rhizobium phaseoli* fue el que presentó mejores resultados tanto a los 7 y 14 DDS el cual difiere significativamente con respecto a los demás tratamientos, esto pudo deberse al efecto de la cepa para promover la producción de diferentes fitohormonas en la planta y por ende al crecimiento de la planta (Madrigal *et al.*, 2009). En la

tercera evaluación (21 DDS) no se mostraron diferencias entre tratamientos, por lo que la altura de plantas se mantuvo estable en las dos variedades con un promedio de 10,98 a 11,93 cm y 10,99 a 11,93cm para fréjol rojo y fréjol negro respectivamente. En cuanto al número de hojas en fréjol rojo y fréjol negro, se puede observar que en las evaluaciones realizadas a los 7 y 14 DDS, los tratamientos no difieren significativamente, a excepción del T5-fertilización que a los 21 DDS obtuvo los mayores valores para fréjol rojo y negro (8,05 y 7,55 cm) pero que estadísticamente, no sobresalen con respecto a los tratamientos inoculados con *Rhizobium* y al tratamiento testigo; así lo reporta Mayz *et al.*, (2011), quien en su trabajo realizado, los mejores resultados para el número de hojas por planta fueron mostrados por las plantas inoculadas con las cepas de *Rhizobium* JV91, JV99 y JV101, el control y fertilización; así mismo las correlaciones entre el peso seco y el número de hojas ( $r=0,94$ ) fueron estadísticamente significativas.

Los tratamientos que mejores resultados presentaron en cuanto a parámetros de biomasa, especialmente en PSF, se pudo determinar que en la primera evaluación (30 DDS) el fréjol rojo y fréjol negro no presentaron diferencias estadísticas con respecto a esta variable en todos los tratamientos, mientras que a los 60 DDS se pudo evidenciar que el T5-fertilización obtuvo los mejores resultados, con un promedio de 5,90 g y 4,69 g para fréjol rojo y fréjol negro respectivamente; esto puede relacionarse con la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, que si bien es cierto produce plantas vigorosas con gran cantidad de follaje (Yáñez, 2002) pero que a la vez en forma directa y negativa disminuye la eficiencia de la nodulación por medio del uso de microorganismos diazotróficos (García y Fabrizzi, 2000).

Sierra *et al.*, (2012), al emplear cepas aisladas de *Rhizobium* en fréjol, determinó que de acuerdo al análisis de varianza realizado, existió una diferencia significativa con respecto al tratamiento con adición de N y el tratamiento que no recibió la aplicación de nitrógeno, produjo menor cantidad de biomasa y acumuló una menor cantidad de nitrógeno con respecto a los demás tratamientos en donde se inocularon las cepas; esto lo podemos evidenciar en nuestros resultados, en donde el testigo presentó los valores más bajos para la variable PSF en fréjol rojo y fréjol negro.

El peso seco de la raíz (PSR) a los 30 DDS en las dos variedades en estudio, mostraron que no existe diferencias estadísticas entre los tratamientos de cada variedad, pero se puede observar claramente que a los 60 DDS se presentaron los valores más altos en un rango de 0,34-0,47 g

y 0,31-0,41 g para fréjol rojo y fréjol negro respectivamente. Es importante mencionar que estos valores tienden a relacionarse directamente con la variable NN, ya que en las correlaciones se logró determinar que existe una interacción entre NN-PSR tanto para fréjol rojo y negro con un 22 y 30 %, con ello corroboramos lo que menciona Ferrera-Corrato *et al.*, (1990) citado por Brunet *et al.*, (1999), quien señala que el comportamiento de la población de *Rhizobium* varía a medida que la planta se desarrolla, siendo fuertemente influenciada por la raíz.

Los componentes de rendimiento presentaron diversos valores con respecto a cada una de las variedades evaluadas. En el caso de la longitud de vainas por planta (LVP), se determinó que en fréjol rojo los tratamientos con inoculación, fertilización y testigo no difieren significativamente entre sí, lo mismo sucede con fréjol negro en donde las diferencias estadísticas entre cada tratamiento es mínimo, pero a pesar de ello, el fréjol rojo es la variedad que presentó los mejores valores para esta variable con un rango promedio de longitud de vainas de 10,40-12,13 cm. Por otro lado el número de granos por vaina (NGV) para fréjol negro presentó mayor número de granos (promedio de 3,6-4,15 granos) a pesar de que la longitud de vainas fue superior en fréjol rojo. Trabajos realizados por González *et al.*, (2012) bajo las mismas condiciones ambientales y del suelo, obtuvieron resultados de 7,12 granos por vaina mediante la aplicación de cepas de *Rhizobium* en fréjol. El número de granos por vaina son los componentes del rendimiento más estables y están más relacionados con las características propias del cultivar (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Finalmente en cuanto al número de vainas por planta (NVP) en fréjol rojo, fue el T5-fertilización el que obtuvo el mejor resultado para esta variable con respecto a los demás tratamientos (9,25 vainas), mientras que en fréjol negro el mejor tratamiento fue el T3-*Rhizobium leguminosarum* con 16,66 vainas; seguidamente el T5-fertilización y T1-*Rhizobium etli* *bv. mimosae*. Los resultados obtenidos de los componentes de rendimiento, demuestran que para las condiciones en que se desarrolló el experimento (ambiental y edáfico), la utilización de cepas de *Rhizobium* optimizan el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico, la absorción de elementos nutritivos y por lo tanto se estimula el desarrollo vegetal aumentando el potencial productivo de las plantas. En contraste con ello, Valdivia (2011), manifiesta que los componentes de rendimiento antes mencionados, son de baja heredabilidad y se encuentran altamente influenciados por el ambiente (baja luminosidad, altas precipitaciones, estrés hídrico), difieren entre las variedades y además pueden presentar

variaciones incluso a lo interno de cada variedad. Por lo tanto en nuestra investigación podemos afirmar que los resultados obtenidos con respecto a estos parámetros, no existe relación entre cada uno de ellos y por lo tanto dependen de las condiciones edafo-climáticas y del genotipo de fréjol.

El rendimiento agrícola obtenido en las dos variedades analizadas en la presente investigación, muestra que en fréjol rojo el tratamiento que presentó el valor más alto fue el T5-fertilización con un promedio de 2,95 TM ha<sup>-1</sup> seguido del T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* (1,93 TM ha<sup>-1</sup>) y T3-*Rhizobium leguminosarum* (1,88 TM ha<sup>-1</sup>); similar a estos resultados se presentan para el fréjol negro, en donde el tratamiento que presentó un mayor rendimiento fue T5-fertilización con 2,08 TM ha<sup>-1</sup>, seguido del T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae* (1,88 TM ha<sup>-1</sup>) y T3-*Rhizobium leguminosarum* (1,61 TM ha<sup>-1</sup>). Al comparar las dos variedades, podemos determinar que no existen diferencias significativas entre ellas, pero el fréjol rojo finalmente es la variedad que presentó mejores resultados. Ávila-Serrano *et al.*, (2005), reporta que en cuanto al rendimiento, no todas las cepas de *Rhizobium* son capaces de producir una fijación efectiva y mostrar habilidades para nodular; por lo que, mientras mayor sea el número de nódulos, habrá mayor uso del nitrógeno atmosférico presente en el suelo y por ende influirá en la producción de biomasa y producción de grano (rendimiento). En nuestra investigación se pudo comprobar lo antes mencionado, puesto que en cada uno de los tratamientos y evaluaciones, mientras mayor fue el NN se evidenció mayor biomasa y rendimiento, mostrándose esto claramente a los 30 DDS en los dos genotipos fréjol rojo y negro, ya que a los 60 DDS se observó senescencia en la nodulación.

En la investigación realizada por Ballesteros *et al.*, (1994), reporta que al analizar el efecto de la inoculación sobre tres variedades de fréjol, para rendimiento y contenido de nitrógeno en la planta, observó que con cualquiera de las variedades, la cepa CIAT 144 (*Rhizobium*) es la que mayor cantidad de nitrógeno fija y por tanto la que produce el mayor rendimiento. Hernandez (2013) obtuvo un rendimiento positivo de 2,17 TM ha<sup>-1</sup> en fréjol mediante la inoculación con *Rhizobium*, valor incrementado en un 13 % con respecto a una investigación previamente realizada. Dicho autor concluye que con la aplicación de *Rhizobium* en suelos con bajo contenido de nitrógeno se puede aumentar los rendimientos de plantas leguminosas. Según SICA (2002), la producción media nacional de fréjol es de 5,2 TM, que al comparar con el rendimiento obtenido en nuestra investigación, los valores son inferiores (1,3-1,6 TM ha<sup>-1</sup>),

pero se debe señalar que las condiciones ambientales adversas jugaron un papel importante en el rendimiento obtenido.

El porcentaje de nitrógeno total y proteína bruta se lo realizó en grano, el mismo que no presentó diferencias significativas para ambas variedades, es importante tomar en cuenta que esta variable permite determinar si hubo el efecto o no de las cepas de *Rhizobium* inoculadas en fréjol rojo y fréjol negro.

En cuanto al análisis físico, químico y microbiológico, correspondiente al tercer objetivo de nuestra investigación, no se pudo evidenciar la influencia de *Rhizobium* sobre las propiedades físicas del suelo, ya que los valores obtenidos en los análisis se mantuvieron estables y por lo tanto no hubo variabilidad en cuanto a las propiedades. Se puede señalar que el uso de microorganismos diazotróficos como es el caso de *Rhizobium*, no modifican las características físicas del suelo, por el contrario, la capacidad de estas bacterias para desarrollar eficientemente el proceso de FBN depende del suelo en el cual se desarrolla.

El análisis químico realizado en el suelo de experimentación nos muestra que *Rhizobium* no modifica las características químicas del suelo, excepto en la cantidad de nitrógeno, ya que se pudo determinar el aporte de nitrógeno al suelo luego de la aplicación de *Rhizobium*, en donde se evidenció un incremento del porcentaje de nitrógeno al nivel alto, por lo que podemos sostener lo descrito por Urzúa (2005), quien menciona que el aporte de nitrógeno a los suelos (en simbiosis) es de 25-100 kg ha año<sup>-1</sup>. Al igual que sucede en el análisis físico, este rizobio se beneficia de los macro y microelementos que se encuentran disponibles en el suelo como es calcio y magnesio, el primero en la nodulación y el segundo en el funcionamiento de la nitrogenasa; de igual manera hierro y azufre son necesarios en el funcionamiento de la enzima nitrogenasa por ser constituyentes de la misma, el primero influye en las leghemoglobinas y azufre tiene que ver con la conformación de las proteínas. El boro es importante en el desarrollo del nódulo y el cobalto favorece en la funcionalidad del mismo (Orozco, 1999). Los suelos del sector son de característica ligeramente ácida, pero esto no influye, ya que el pH está dentro del rango tolerante para el desarrollo de este microorganismo.

Los resultados obtenidos con respecto al análisis microbiológico, muestran un efecto positivo, en el cual podemos determinar que en cuanto al número de UFC de bacterias, se observa un incremento en el segundo análisis de  $2,75 \times 10^9$  UFC en fréjol negro y en fréjol rojo un

incrementó de  $2,95 \times 10^9$  UFC, lo que beneficia según (Rodríguez y López, 2009) a los procesos bioquímicos adicionales que se encuentran asociados con otros microorganismos presentes en el suelo. De esta forma, se puede incrementar la disponibilidad de otros nutrimentos y sustancias promotoras del crecimiento; además, este rizobio crea una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, lo que garantiza un crecimiento sano y fortalecido.

Con los resultados presentados anteriormente, podemos determinar que los aislados de *Rhizobium* influyeron positivamente en el crecimiento, desarrollo y fijación de  $N_2$  en las dos variedades.

## VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- A los 30 DDS los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli* y T6-testigo, aplicados al frejol rojo, ejercieron una mayor nodulación en las raíces.
- A los 60 DDS el tratamiento T2-*Rhizobium phaseoli* presentó un mayor número de nódulos totales frente a los demás tratamientos.
- A los 30 DDS los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, y T3-*Rhizobium leguminosarum*, aplicados en frejol negro produjeron un mayor número de nódulos totales.
- A los 60 DDS, los tratamientos T1-*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, T2-*Rhizobium phaseoli*, T3-*Rhizobium leguminosarum* y T6-testigo aplicados al frejol negro presentaron los mejores resultados en número de nódulos totales.
- El tratamiento T2-*Rhizobium phaseoli* aplicado en los fréjoles rojo y negro a los 30 y 60 DDS, es el que produjo mayor número de nódulos en las raíces, lo que indica que la interacción entre el *Rhizobium* y estas leguminosas fue efectiva.
- El tratamiento T5-fertilización (urea), aplicado en fréjol rojo y fréjol negro es el que presentó los mejores rendimientos.
- Las cepas de *Rhizobium* en la zona de experimentación, no influyó en las propiedades físicas y químicas del suelo en estudio.
- Después de la inoculación hubo un incremento en el suelo de nueve veces más la cantidad de UFC g<sup>-1</sup> de bacterias de *Rhizobium*.



## **VII. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el efecto de las bacterias diazotróficas en otras condiciones edafo-climáticas y época de siembra con variedades locales de mayor consumo, para obtener información en este campo, que permita producir un bioinoculante eficiente al alcance de los productores de fréjol.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABELA, J. Importancia y función de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el cultivo de la soya. Consultado 04 may 2013. Disponible (en línea) [http://www.fundacruz.org.bo/uploads/modules/multimedia/2012/01/10\\_Fijacion\\_biologica\\_209.pdf](http://www.fundacruz.org.bo/uploads/modules/multimedia/2012/01/10_Fijacion_biologica_209.pdf)

ACUÑA, O.; RODRÍGUEZ, E. *et al.* 2001. Validación Técnica de Inoculantes en frijol con cepas de *Rhizobium*eficientes en fijación de nitrógeno en Centroamérica. *Agronomía Mesoamericana* 12(1): 25-32. Consultado 02 abr 2014. Disponible (en línea) [http://observatorioresicta.info/observatorio/sites/default/files/estudios\\_regionales/pccmca/Frijol/Fertilizacion/v12n1\\_p25%20%28Acuna%29.pdf](http://observatorioresicta.info/observatorio/sites/default/files/estudios_regionales/pccmca/Frijol/Fertilizacion/v12n1_p25%20%28Acuna%29.pdf)

ALARCON, A. FERRERA, R. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la Agricultura. *Agricultura Técnica en México*. Consultado 03 dic 2012. Disponible (en línea) <http://www.google.com.ec>

ANAYA, A. 2003. *Ecología Química*. Plaza y Valdez editores. 292 pág. Consultado el 25 de nov del 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/books?id=H6j8zaDYSYEC&printsec=frontcover&dq=ecologia+quimica>

ARRIECHI, G.; *et al.*, 2011. Evaluación del proceso de desnitrificación en el módulo 4 de la planta de tratamiento de aguas residuales La Mariposa. *Revista Ingeniería UC*, Vol. 18, No. 3, Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70723269008>

ÁVILA-SERRANO, N.; MURILLO-AMADOR, B. *et al.* 2005. *Caracterización y obtención de funciones para producción de biomasa en cinco cultivares de frijol yorimón: I. Método destructivo*. *Técnica Pecuaria en México*, vol. 43, núm. 3, septiembre-diciembre, 2005, pp. 449-458. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias México. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.redalyc.org/pdf/613/61343315.pdf>

BACA, B., SOTO, L., PARDO, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/294/29403808.pdf>

BALLESTEROS, M.; LOZANO, A. 1994. Evaluación de la Fijación de Nitrógeno por cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Santafé de Bogotá. D.C. *Revista Colombiana de Química Bogotá (Colombia)*, Volumen 23, No. 2. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/download/16203/17080::pdf>

BRUNET, E.; LUIS, M.; *et al.* 1999. Comportamiento de cepas de *Rhizobium phaseoli* asociada al cultivo del frijol. I. Peso seco, número, % N y crecimiento de los nódulos. Centro Agrícola, Año 26, No. 4. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v06n01\\_068.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v06n01_068.pdf)

CALVO, S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. Consultado 09 jun 2013. Disponible (en línea) [http://scholar.google.com.ec/scholar?q=papel+de+los+flavonoides+en+la+Fijacion+biologica+de+nitrogeno&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5&as\\_ylo=2009](http://scholar.google.com.ec/scholar?q=papel+de+los+flavonoides+en+la+Fijacion+biologica+de+nitrogeno&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5&as_ylo=2009)

CAMELO, M.; VERA, S.; BONILLA, R. 2011. Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Manejo y conservación de suelos y aguas. *Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal*. Consultado 13 abr 2014. Disponible (en línea) <http://www.siembra.com.co/SitioWeb/Archivos/Revista/RevistaCorpoicavol12-2Cap08.pdf>

CAMPOVERDE, C.; PACCHA, H. 2013. Tesis: “Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en genotipos de fréjol común en diferentes zonas ecológicas de la provincia de Loja”. Consultado 02 abr 2014.

CARRANZA, L. 2004. Aislamiento e Identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum biovarphaseoli*, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Consultado 28 ene 2013. Disponible (en línea) [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2236.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2236.pdf)

CASTILLO, F., ROLDÁN, M. *et al.* 2005. Biotecnología Ambiental. Editorial Zebor. 595 pag. Consultado 26 mar 2013. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

CASTRO, R. 2012. Respuesta a la inoculación con tres dosis de *Rhizobium* en el cultivo de arveja *Pisum sativum* L. variedad Rogger Temprana. Espejo - Carchi 2011. Universidad Técnica del Norte Instituto de Postgrado. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1245/1/PG%20350\\_anteproyecto%20diplo\\_mado%201.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1245/1/PG%20350_anteproyecto%20diplo_mado%201.pdf)

CAYO, P.; ROJAS, F. 2004. Efecto de la inoculación de dos cepas de *Rhizobium* sp. En relación a la nodulación del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) abonado con humus de lombriz en la zona media del valle de Ica. Manejo Ecológico de suelos. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo\\_ecologico\\_de\\_suelos/manejo\\_ecologico\\_de\\_suelos-7.pdf](http://www.cepes.org.pe/pdf/OCR/Partidos/manejo_ecologico_de_suelos/manejo_ecologico_de_suelos-7.pdf)

CERDA, M. 2008. TESIS DOCTORAL: Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. Consultado 04 may 2013. Disponible (en línea)

[http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/22501/3/DMG\\_Aislamiento%20Micromonospora%20nodulos%20leguminosas.pdf](http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/22501/3/DMG_Aislamiento%20Micromonospora%20nodulos%20leguminosas.pdf)

CICEANA, A.C. 2007. Centro de Información y Comunicación Ambiental de Norte América. Ciudad de México. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://www.ciceana.org.mx/recursos/ciclo%20del%20nitrogeno.pdf>

CONTRERAS S., C.; IRIARTE M., J., *et al.* 2007. Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., asociados a la leguminosa *Cajanuscajan* en parcelas agrícolas del Municipio de Sampués, Departamento de Sucre. Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias. Sucre, Colombia. 15-127 p.

CORBERA, J.; NÁPOLES, M. 2000. Evaluación Agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos micorrizógenos arbusculares en el cultivo de la soya sobre suelo ferralítico rojo compactado. Cultivos Tropicales 21(1):21-25. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://ediciones.inca.edu.cu/antiores/pdf/2000/1/CT21113.pdf>

CUADRADO, B. *et al.* 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. colomb. Cienc. Quim. farm. Vol.38, No.1, p.78-104. ISSN 0034-7418. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/15432/36602>

DE FELIPE, M. 2009. Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Consultado 18 may 2014. Disponible (en línea) <http://digital.csic.es/bitstream/10261/16457/1/de%20Felipe%202007.pdf>

DIARIO HOY-Noticias del Ecuador y el mundo. 2010. El fréjol, muy importante para la seguridad alimentaria. Consultado 13 abr 2014. Disponible (en línea) <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/el-frejol-muy-importante-para-la-seguridad-alimentaria-401684.html>

DÍAZ, C. 2010. Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (*Phaseolus vulgaris* L.), en la República Dominicana. Tesis Doctoral. Consultado 27 mar 2013. Disponible (en línea) <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1585/Antonio.pdf?sequence=1>

ESPIN, G. 2002. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado 10 nov 2012. Disponible (en línea) [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_09/Capitulo09.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf)

FAO. 2006. FICHAS TÉCNICAS: Productos frescos y procesados. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/index.htm](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/index.htm)

FEDERACIÓN NACIONAL DE CULTIVADORES DE CEREALES Y LEGUMINOSAS (FENALCE). 2010. Importancia de los cultivos representados por FENALCE. El cultivo del frijol: historia e importancia. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) [www.fenalce.org/arch\\_public/frijol93.pdf](http://www.fenalce.org/arch_public/frijol93.pdf)

GARCÍA, E. *et al.* 2009. Guía Técnica para el Cultivo de Frijol en los Municipios de Santa Lucía, Teustepe y San Lorenzo del Departamento de Boaco, Nicaragua. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) [http://www.redsicta.org/PDF\\_Files/guiaTecnicaFrijol\\_Boaco.pdf](http://www.redsicta.org/PDF_Files/guiaTecnicaFrijol_Boaco.pdf)

GARCÍA, F. O.; FABRIZZI, K. P. 2000. Transformaciones del nitrógeno y siembra directa. Fijación de nitrógeno atmosférico. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://repiica.iica.int/docs/B0631e/B0631e\\_312.html](http://repiica.iica.int/docs/B0631e/B0631e_312.html)

GOMEZ, D. 2005. Praticultura. Universidad Pontificia de Valencia. 253 pag. Consultado 28 ene 2013. Disponible (en línea) [http://books.google.es/books?id=VTiLpo2jugoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg\\_e\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.es/books?id=VTiLpo2jugoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_e_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

GONZÁLEZ, R.; NÚÑEZ, D.; *et al.* 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. Artículos Generales. Centro Agrícola, 39(4): 17-20; octubre-diciembre. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero\\_4/cag044121877.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero_4/cag044121877.pdf)

GRANDA, K.; COLÁS, A.; *et al.* 2009. Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Artículos Generales: 36(4): 5-14; oct.-dic. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36-Numero\\_4/1.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V36-Numero_4/1.pdf)

GUERRERO, V. 2010. Manual de leguminosas y abonos verdes para una agricultura sostenible y soberanía alimentaria. Proyecto de desarrollo rural integral Vicente Guerrero, a.c. de Tlaxcala. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) [http://vicenteguerrero.org.mx/documentos/manual-de-leguminosas-y-abonos-verdes-del-gvg-pdf/at\\_download/file](http://vicenteguerrero.org.mx/documentos/manual-de-leguminosas-y-abonos-verdes-del-gvg-pdf/at_download/file)

GUTIERREZ, A., MARTINEZ, E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). Journal of Biotechnology. 91: 117-126.

GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M.; ESCALANTE, J.; *et al.* 2004. Índices de Reflectancia y Rendimiento del Frijol con aplicaciones de Nitrógeno. Spectral Reflectance Indices and Yield

in Bean with Nitrogen Applications. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/22/4/409.pdf>

HERNÁNDEZ, J.; *et al.*, 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. Vol. 2 N° 2. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://acimcolombia.net/unicesar/rcmt/ARTICULO6.pdf>

HERNANDEZ, L. 2013. Efectos del *Rhizobium* en el rendimiento del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la CCS Sabino Pupo del Municipio Manatí. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://caribeña.eumed.net/wp-content/uploads/frijol.pdf>

HERNÁNDEZ, V. 2004. Caracterización proteómica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Consultado 25 ener 2013. Disponible (en línea) <http://www.um.es/estructura/equipo/vic-estudiantes/arquimedes2003/pdf/004-Virginiamarugan.pdf>

INIAP- PRONALEG-GA. 2007. Leguminosas de grano comestible. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/proyectos\\_inversion\\_iniap/priorizados\\_senplades/fortalecimiento\\_institucional/Matrices/Word/JUSTIFICACIONLEG-GA.doc](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/proyectos_inversion_iniap/priorizados_senplades/fortalecimiento_institucional/Matrices/Word/JUSTIFICACIONLEG-GA.doc)

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP). 2010. *Manual Agrícola de fréjol y otras leguminosas*. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/MANUAL%20FREJOL%20Y%20LEGUMIN%202010.pdf>

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP). 2012. INIAP 481 (rojo del valle). Variedad mejorada de fréjol arbustivo de grano de color rojo moteado. Consultado 07 jun 2013. Disponible (en línea) <http://www.iniap.gob.ec.pdf>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS (INEC). 2000. Consultado 25 ene 2013. Disponible (en línea) <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/using-joomla/extensions/languages>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS (INEC). 2010. Consultado 26 mar 2013. Disponible (en línea) <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS (INEC). 2011. Consultado 26 mar 2013. Disponible (en línea) <http://www.inec.gob.ec/estadisticas/>

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP-PROMSA). 2003. Plegable divulgativo. INIAP 422 Blanco belén: *Nueva variedad de fréjol arbustivo para la Sierra Sur del Ecuador*. Consultado 08 jun 2013. Disponible (en línea) <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/FR%C3%89JOL%20422%20BLANCO%20BELE N%20%28Austro%29.pdf>

LEÓN, M. 2013. La simbiosis rizobio-leguminosa: *Árboles fijadores de nitrógeno y su importancia en los ecosistemas*. Departamento de Microbiología y Biología Celular. Universidad de La Laguna. Consultado 04 may 2013. Disponible (en línea) <http://www.jornadasforestalesdegrancanaria.com>

MADRIGAL, E.; VALDÉZ, I.; *et al.* 2009. Efecto de aislados bacterianos de la familia de las rizobacterias provenientes de alfalfa (*Medicago sativa*) en la mejora del crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y nodulación en jitomate (*Solanum lycopersicon*). Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Número 43, (10-15), Enero-Abril. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista43/Articulo%202.pdf>

MANAHAN, S. 2007. Introducción a la Química Ambiental. Editorial Puente UNAM 2007. Impreso en España. 603 pag. Consultado 26 mar 2013. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

MAYZ, J., LÁREZ, A., ALCORCÉS, N. 2011. Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C4A-3. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XII No. 2 Diciembre 2010 194-202. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18592>

MORA, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* eficientes en Fijación Biológica de Nitrógeno en Suelos de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 6: 68-74. Consultado 02 abr 2014. Disponible (en línea) [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v06n01\\_068.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v06n01_068.pdf)

MORALES, P. 2010. Los Microorganismos del Suelo. Granos andinos. Consultado 13 abr 2014. Disponible (en línea) <http://biologia.laguia2000.com/biologia/los-microorganismos-del-suelo>

NADAL, S.; MORENO, M.; CUBERO, J. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Consejo de Agricultura y Pesca. Ed Mundi-Prensa. 313 pg.

NEYRA, S.; RAMÍREZ, S.; *et al.*, 2013. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *longum*. Revista Científica de Estudiantes (REBIOLEST) 1 (1): 11-21 Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Nacional de Trujillo. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/176>



OBANDO, M. 2012. “Respuesta Fisiológica Del Frijol Caupí (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp) a la Coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* en suelos del Departamento del Cesar”. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Maestría en Ciencias Agrarias-Énfasis Fisiología de Cultivos. Bogotá. Consultado 18 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.bdigital.unal.edu.co/7266/1/07790779.2012.pdf>

OLIVEIRA J, *et al.* 2006. Análisis de Suelos y Plantas y Recomendaciones de Abonado. Universidad de Oviedo. 147 pág Consultado el 25 de nov del 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

OROZCO, F. 2009. La Biología del Nitrógeno. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Primera Ed. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) [http://www.bdigital.unal.edu.co/3666/1/8287520.1999\\_1.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/3666/1/8287520.1999_1.pdf)

PAREDES, M. C. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>

PEDRAZA, R., TEIXEIRA, R. *et al.* 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Consultado 28 ene 2013. Disponible (en línea) <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/Microorganismos.pdf>

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, P. 1993. Microbiología. Cuarta edición. México: McGraw–Hill. p. 8-36.

PERALTA, E., MAZÓN, N., *et al.* 2012. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA), INIAP. Mejoramiento genético del fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador. Consultado 26 mar 2013. Disponible (en línea) <http://www.iniap.gob.ec/> pdf

PERETÓ J, *et al.* 2007. Fundamentos Bioquímicos. 369 pág. Consultado 25 nov 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/books?id=TRD112Ay7IUC&printsec=frontcover&dq=fundamentos+bioquimicos>

QUISHPE, G. 2012. Determinación de la influencia de fertilización foliar como complemento a la fertilización edafológica en la producción de fréjol arbustivo variedad INIAP-414 Yunguilla en el Cantón Paute. Capítulo II: *cultivo de fréjol arbustivo*. Disponible [http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1085/3/Capitulo\\_II.pdf](http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1085/3/Capitulo_II.pdf)



RAMÓN, R. 2011. Cómo determinar el rendimiento de frijol en producción de semilla a nivel artesanal. Proyecto A4N, Catholic Relief Services (CRS). Consultado 25 nov 2012. Disponible (en línea) [http://www.a4n.com.sv/uploaded/mod\\_documentos/METODOLOGIA%20PARA%20ESTIMAR%20RENDIMIENTOS%20EN%20FRIJOL.pdf](http://www.a4n.com.sv/uploaded/mod_documentos/METODOLOGIA%20PARA%20ESTIMAR%20RENDIMIENTOS%20EN%20FRIJOL.pdf)

REDALYC: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Caracterización y obtención de funciones para producción de biomasa en cinco cultivares de frijol yorimón: I. Método destructivo. Técnica Pecuaria en México, vol. 43, núm. 3, septiembre-diciembre, 2005, pp. 449-458. Consultado 25 nov 2012. Disponible (en línea) <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61343315>

RIVERA, D. 2012. Formulación de un prototipo de Biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Consultado 04 may 2013. Disponible (en línea) <http://www.bdigital.unal.edu.co/7026/1/01192544.2012.pdf>

ROCHA R. *et al* 2006. Mecanismo de Patogenicidad e Interacción Parasito Hospedero Segunda Parte. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. 245 pág. Consultado el 25 de nov del 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

RODRÍGUEZ, B.; LÓPEZ, M. 2009. Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de un ultisol de la altiplanicie del Estado Guarico. Agronomía Trop. 59(4): 381-386. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at5904/pdf/5904rodriguez\\_b.pdf](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5904/pdf/5904rodriguez_b.pdf)

ROLAND. M. ATLAS, RICHARD BARTHA. 2006. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental Cuarta Edición. España. 665 pág. Consultado el 25 de nov del 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

SALAZAR, A.; ORDÓÑEZ, C. 2013. Aislamiento e Identificación de Actinomicetos Fijadores de Nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Escuela de Tecnología Química Pereira. Consultado 10 jun 2014. Disponible (en línea) <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3050/1/58073S161.pdf>

SÁNCHEZ, S. HERNÁNDEZ, M. RUZ, F. 2011. Alternativas de manejo de la fertilidad del suelo en ecosistemas agropecuarios. Pastos y Forrajes. Vol. 34, No. 4, octubre-diciembre, 375-392. Consultado 18 may 2014. Disponible (en línea) <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v34n4/pyf01411.pdf>

SEGURA, M. *et al.* 2006. Efecto de la fertilización con fósforo sobre la nodulación de *Frankia* en plantaciones de *Alnus acuminata* en andisoles de Costa Rica. Consultado el 02 de abr de 2014. Disponible (en línea) [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v30n01\\_043.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v30n01_043.pdf)

SEOÁNEZ M. *et al.* 2000. Tratado de Reciclado y Recuperación de Productos de los Residuos. Colección Ingeniería del Medio Ambiente. Edición Mundi Prensa. 520 pág. Consultado el 25 de nov del 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

SIERRA, O. 2005. Fundamentos para el Establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Segunda Ed 2005. 239 pg. Consultado 13 sep 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

SIERRA, C.; LEÓN, E. *et al.* 2012. Evaluación de la sobrevivencia y eficiencia e invernadero y ensayos de campo de cepas aisladas localmente de rhizobia. Revista 24 de la Universidad del Valle de Guatemala. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-24/7.EVALUACION\\_82-88c.pdf](http://www.uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero-24/7.EVALUACION_82-88c.pdf)

SILVA, C., VINUEZA, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: *El caso de los Rhizobios*. Consultado 28 ene 2013. Disponible (en línea) <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap11.pdf>

SISTEMA DE INFORMACIÓN Y CENSO AGROPECUARIO (SICA). 2006.

SUBÍA, C. 2001. Evaluación de tres cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* en cuatro variedades de arveja *Pisum sativum* L. para la zona Interandina. Escuela Politécnica del Ejército. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

TAIZ L. ZEIGER E. 2006. Fisiología Vegetal 1. Colección Ciencias Experimentales. UNIVERSITAT JAUME. 552 pág. Consultado 25 nov de 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/books?id=7QIbYgC5AC&printsec=frontcover&dq=fisiologia+vegetal>.

THOMPSON J. 2003. El proceso Coevolutivo. 98 pág. Consultado 25 nov de 2012. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/books?id=SYMRLcGvp6AC&printsec=frontcover&dq=el+proceso+coevolutivo>

TORRES G., R. 2008. Phytoestimulatory effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertations de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven. 21, 155 p.

TORTORA, GERARD J. 2007. Introducción a la Microbiología Novena Edición. Editorial Médico Panamericana. 931 pág. Consultado 25 nov de 2013. Disponible (en línea) [books.google.com.ec/](http://books.google.com.ec/)

ULLOA, J.; RAMÍREZ, J. et al. 2011. *El frijol (Phaseolus vulgaris): Su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos*. Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit. Consultado 16 abr de 2013. Disponible (en línea) <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>

URQUIAGA, S. Y ZAPATA, F. 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. Ed. GENESIS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Brasil. 88 pp.

URZÚA, H. 2005. Beneficios de la Fijación simbiótica en Chile. Departamento de Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Consultado 28 ener 2013. Disponible (en línea) <http://agronomia.uc.cl/index.php?/Descargar-documento/606-Benefits-of-Symbiotic-Nitrogen-Fixation-in-Chile.html>

VALDIVIA, R. 2011. ¿Cómo determinar el rendimiento de frijol en producción de semilla a nivel artesanal?. Asesor Técnico en Innovación, Experimentación y Producción. Proyecto A4N, Catholic Relief Services (CRS). Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) [http://www.a4n.com.sv/uploaded/mod\\_documentos/METODOLOGIA%20PARA%20ESTIMAR%20RENDIMIENTOS%20EN%20FRIJOL.pdf](http://www.a4n.com.sv/uploaded/mod_documentos/METODOLOGIA%20PARA%20ESTIMAR%20RENDIMIENTOS%20EN%20FRIJOL.pdf)

VERÁSTEGUI, M. 2009. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Departamento de Microbiología. Tesis: Diversidad de rizobios asociados a seis cultivares de frijol en dos tipos de suelo. Consultado 02 abr 2014. Disponible (en línea) <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8123/DIVERIZO.pdf?sequence=1>

VOYSEST, O. 2000. Mejoramiento genético de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Consultado 25 ener 2013. Disponible (en línea) <http://books.google.com.ec/>

WEIR, B. 2006. Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. School of Biological Sciences. The University of Auckland. New Zealand. Consultado 18 may 2014. Disponible (en línea) [http://www.rhizobia.co.nz/downloads/Weir2006\\_PhD\\_thesis.pdf](http://www.rhizobia.co.nz/downloads/Weir2006_PhD_thesis.pdf)

YANNI, Y.; RIZK, R.; FATTAH, F.K.; SQUARTINE, A. 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice root. Australian Journal of Plant Physiology. 28: 845-870.

YÁÑEZ, J. 2002. Nutrición y Regulación del Crecimiento en Hortalizas y Frutales. Tecnología, Comercio y Servicios Agrícolas Mundiales. Saltillo, Coahuila. Consultado 04 may 2014. Disponible (en línea) <http://www.uaaan.mx/postgrado/images/files/hort/simposio2/Ponencia03.pdf>

# ANEXOS

**Anexo 1.** Medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos del suelo.

**1. Bacterias: AGAR NUTRIENTE**

- Agar nutriente 28 gr/1000 ml

**2. Hongos: PDA (Papa-Dextrosa-Agar)**

- Papa 200 gr
- Dextrosa 10 gr/1000 ml
- Agar 18 gr/1000 ml

**3. Actinomicetos: AGAR CASEINA**

- Peptona 5 gr/1000 ml
- Cloruro de sodio (NaCl) 5 gr/1000 ml
- Agar nutriente 23 gr/1000 ml
- Agar 4 gr/1000 ml
- Leche descremada 10 ml

## **Anexo 2.** Preparación de soluciones para determinar el porcentaje de Materia Orgánica.

### 1. Solución de Dicromato de Potasio 1 N

Para la elaboración de un litro de la solución dicromato de potasio 1 N se pesó 49.04 gr de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), se conserva en un desecador y se afora a 1 000 ml con agua destilada.

### 2. Difenilamina

Disolver 0.5 gr de difenilamina en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado, esto se debe verter en 20 ml de agua destilada, una vez obtenida la solución se recomienda conservar en frascos oscuros.

### 3. Solución de Sal de Morh 0.5 N

Para la elaboración de la sal de Morh, se pesó 139.01 gr de sulfato de hierro II heptahidratado, agregar 500 ml de agua destilada y 15 ml de ácido sulfúrico concentrado, a esta mezcla aforar a 1 000 ml con agua destilada. Para determinar la normalidad de la sal de Morh, se mide 5 ml de dicromato de potasio 1 N y se añade 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico y 5 gotas de difenilamina. Se determinó el viraje de color de azul a verde para calcular el factor de corrección de la normalidad (INIAP, 2000).

### 4. Fórmula para el cálculo de M.O.

$$MO (\%) = [(V_o - V) * N * 0.39 * 1.72 * 1.1] / PM$$

De donde:

**V<sub>o</sub>** = Volumen gastado en la titulación del blanco (sin suelo).

**V** = Volumen gastado en la titulación de la muestra.

**N** = Normalidad exacta del sulfato de hierro.

**0.39** = Peso químico equivalente del carbono.

**1.72** = Constante de conversión de carbono a materia orgánica sobre la hipótesis de que la materia orgánica contiene 58 % de carbono en la generalidad de suelos encontrados en el Ecuador.

**1.1** = Error de conversión de carbono a materia orgánica (10 %).

**PM** = Peso de la muestra de suelo.

### **Anexo 3.** Preparación de soluciones para determinar Nitrógeno Amoniacal en Suelos.

#### *1. Preparación del fenol básico*

En 500 ml de agua destilada disolver 100 gr de hidróxido de sodio (NaOH), dejar enfriar y seguidamente añadir 138 gr de fenol en cristales o 130 ml de fenol líquido al 92 %. Aforar a un volumen de 1 litro.

#### *2. Solución patrón de nitrógeno*

Pesar 9.69 gr de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y disolver en agua destilada hasta un volumen de 1 litro, dicha solución tiene una concentración de 2 500  $\mu\text{g/ml}$ . De la solución antes mencionada tomar 10 ml y llevar a un volumen de 1 litro con la solución extractante a fin de llegar a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Anexo 4.** Preparación de soluciones para determinar fósforo en Suelos.

#### *1. Solución "A" reactivo concentrado*

Disolver 0.250 gr de potasio y antimonio en 100 ml agua destilada; mientras se está mezclando añadir 41.25 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado y dejar enfriar. En un frasco volumétrico disolver 1.875 gr de molibdato de amonio en aproximadamente 90 ml de agua destilada.

#### *2. Solución "B" reactivo de color para fósforo*

Diluir 1 gr de goma de acacia y 1 gr de ácido ascórbico por litro, mezclar estas 2 soluciones añadir 150 ml de solución A y llevar a un volumen de 1 litro con agua destilada.

#### *3. Solución patrón de fósforo*

Pesar 4.39 gr de fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y disolver en agua destilada hasta un volumen de 1 litro, esta solución contiene 1 000  $\mu\text{g/ml}$  de P, de donde se toma una alícuota de 12 ml y llevar a un volumen de 1 litro con la misma solución extractante para obtener una concentración final de 12  $\mu\text{g/ml}$  de P.

## Anexo 5. Preparación de soluciones para determinar potasio, calcio y magnesio en Suelos.

### 1. Oxido de lantano al 1 %

En 50 ml de agua destilada disolver 58.64 gr de óxido de lantano ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) y agregar 100 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado al 37 %, para posteriormente la mezcla aforarla a un volumen de 5 litros de agua destilada. Se recomienda que el ácido clorhídrico sea agregado cuidadosamente al óxido de lantano para evitar su reacción.

### 2. Solución patrón: 5 000 $\mu\text{g/ml}$ de K, 12 500 $\mu\text{g/ml}$ de Ca, 5 000 $\mu\text{g/ml}$ de Mg

Pesar 9.53 gr de KCl, 45.253 gr de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 41.793 gr de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y disolver por separado a un volumen de 1 litro (1 000ml) para obtener soluciones madres de las anteriores concentraciones. De dichas soluciones madres tomar 10 ml de potasio, 20 ml de la de calcio y 10 ml de magnesio, llevar a un litro con la solución extractante para obtener las concentraciones finales de: 50  $\mu\text{g/ml}$  de potasio, 250  $\mu\text{g/ml}$  de calcio y 50  $\mu\text{g/ml}$  de magnesio.

## Anexo 6. Identificación de colonias bacterianas en placa.

La evaluación de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/gr) se la realizó con la ayuda de un cuantificador de colonias, en el cual se identificó las características generales de las bacterias, que a continuación se muestra:

Parámetros morfológicos					
<b>a. Crecimiento:</b>	<input type="checkbox"/> nulo	<input type="checkbox"/> ligero	<input type="checkbox"/> moderado	<input type="checkbox"/> abundante	
<b>b. Color:</b>	<input type="checkbox"/> transparente	<input type="checkbox"/> traslucido	<input type="checkbox"/> opaco	<input type="checkbox"/> blanco opaco	<input type="checkbox"/> crema
<b>c. Mucosidad:</b>	<input type="checkbox"/> nulo	<input type="checkbox"/> ligero	<input type="checkbox"/> moderado	<input type="checkbox"/> abundante	
<b>d. Bordes:</b>	<input type="checkbox"/> liso	<input type="checkbox"/> ondulado	<input type="checkbox"/> lobulado	<input type="checkbox"/> dentado	<input type="checkbox"/> filamentoso
<b>e. Forma:</b>	<input type="checkbox"/> punteada	<input type="checkbox"/> circular	<input type="checkbox"/> filamentosa	<input type="checkbox"/> irregular	<input type="checkbox"/> rizoide

**a/Crecimiento:** (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; **b/Color:** (1) transparente, (2) traslúcido, (3) opaco, (4) blanco opaco, (5) crema; **c/Mucosidad:** (-) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) abundante; **d/Bordes:** (1) liso, (2) ondulado, (3) lobulado, (4) dentado, (5) filamentoso; **e/Forma:** (1) punteado, (2) circular, (3) filamentosa, (4) irregular, (5) rizoide.



**Anexo 7.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol rojo.

Variedad	Tratamiento	Réplica	Muestra	Altura 7 DDS	# de Hojas 7	Altura 14 DDS	# de Hojas 14	Altura 21 DDS	# de Hojas 21
2	1	1	1	3,8	2	5,9	4	8,4	6
2	1	1	2	4,1	2	5,1	3	7,7	5
2	1	1	3	4,4	2	6,6	3	8,3	5
2	1	1	4	4,2	2	5,9	3	7,9	4
2	1	1	5	4	2	5,8	3	7,8	5
2	1	2	1	3,6	2	7,2	3	8,2	11
2	1	2	2	4,3	2	6	3	8,5	5
2	1	2	3	5,1	2	6,4	3	8,9	9
2	1	2	4	4,4	2	6,4	3	8,6	8
2	1	2	5	4,6	2	6,2	3	8,8	8
2	1	3	1	5,3	2	7,6	4	12,6	5
2	1	3	2	5,2	2	6,9	3	10,7	4
2	1	3	3	4,9	2	6,7	4	11,1	6
2	1	3	4	5,9	2	7,2	3	11,3	5
2	1	3	5	3,8	2	7	4	11,8	5
2	1	4	1	3,9	2	7,8	3	13,9	5
2	1	4	2	4	2	6,6	4	13,7	5
2	1	4	3	4,4	2	6,8	4	14,1	5
2	1	4	4	3,9	2	6,5	4	14,6	5
2	1	4	5	4,2	2	7,4	4	13,5	5
2	2	1	1	6,6	2	7,7	4	8,1	5
2	2	1	2	5,4	2	6,4	3	9,9	6
2	2	1	3	3,9	2	6	3	9,5	5
2	2	1	4	7,1	2	7,7	3	10,1	5
2	2	1	5	7	2	6,5	3	9,9	5

continuación del anexo 7

2	2	2	1	7,1	2	9,6	3	11,1	5
2	2	2	2	4	2	8,4	3	9	5
2	2	2	3	5,5	2	7,7	3	10,4	5
2	2	2	4	6,6	2	9,9	3	9,9	5
2	2	2	5	6,1	2	9,5	4	9,9	5
2	2	3	1	4,6	2	11,3	3	12,2	5
2	2	3	2	5,6	2	10,9	3	11,7	5
2	2	3	3	5,6	2	11,6	3	11,9	5
2	2	3	4	4,9	2	10,4	3	11,9	5
2	2	3	5	4,7	2	11	3	11,2	5
2	2	4	1	6,9	2	7,3	4	11,1	5
2	2	4	2	6,6	2	7,1	3	9,1	5
2	2	4	3	6,3	2	7	3	9,6	5
2	2	4	4	6,8	2	7	3	10,9	5
2	2	4	5	6,4	2	6,8	3	10,6	5
2	3	1	1	5,3	2	5,8	3	11,9	6
2	3	1	2	5,1	2	5,9	3	12,5	5
2	3	1	3	5,3	2	6,6	4	11	4
2	3	1	4	4,9	2	6,5	3	10,9	5
2	3	1	5	4,7	2	6,7	3	13,1	5
2	3	2	1	5,1	2	7,4	3	11,9	7
2	3	2	2	3,7	2	6,5	3	10,5	4
2	3	2	3	3,9	2	7,2	3	10,9	4
2	3	2	4	4	2	7,4	3	12,1	5
2	3	2	5	3,8	2	6,6	4	11,5	5
2	3	3	1	5,9	2	7,3	3	11,6	5
2	3	3	2	4,9	2	7,5	3	15,2	7
2	3	3	3	5	2	6,9	3	14,9	9
2	3	3	4	5,4	2	6,6	3	14,1	7

continuación del anexo 7

2	3	3	5	5,2	2	7	3	14,5	8
2	3	4	1	6,1	2	6,6	3	13,5	8
2	3	4	2	5,9	2	7,5	3	9,6	11
2	3	4	3	6	2	8,2	4	9,3	5
2	3	4	4	6,3	2	7,6	3	9,9	8
2	3	4	5	6,1	2	7,5	3	9,8	8
2	5	1	1	4,3	2	7,3	3	10,7	11
2	5	1	2	4,7	2	6,9	3	10,2	7
2	5	1	3	3,7	2	7,7	3	10,2	7
2	5	1	4	4,1	2	7,1	3	9,5	9
2	5	1	5	4	2	7	3	9,9	6
2	5	2	1	5,6	2	7,7	4	11,3	6
2	5	2	2	5,1	2	6,4	4	10,9	6
2	5	2	3	4,9	2	6,8	4	11,1	9
2	5	2	4	4,7	2	6,9	3	10,9	9
2	5	2	5	4,8	2	7,3	4	11	11
2	5	3	1	5,9	2	8,5	3	10,8	5
2	5	3	2	4,7	2	7,8	3	10,5	9
2	5	3	3	4,9	2	7,9	3	11,3	9
2	5	3	4	5,5	2	7,5	4	11,9	7
2	5	3	5	6	2	7,6	3	12,2	8
2	5	4	1	5,6	2	7,3	3	10,7	8
2	5	4	2	5,9	2	6,4	3	12,2	7
2	5	4	3	5	2	6,6	3	11,1	9
2	5	4	4	5,1	2	6,1	3	13,4	11
2	5	4	5	4,9	2	6,4	3	9,8	7
2	6	1	1	4,8	2	6,9	4	10,5	8
2	6	1	2	4,3	2	5,6	4	11	8
2	6	1	3	4,2	2	6,7	4	10,2	8

continuación del anexo 7

2	6	1	4	4,5	2	6	3	9,8	9
2	6	1	5	4,1	2	6,2	4	9,7	8
2	6	2	1	4,3	2	7,4	4	10,6	4
2	6	2	2	4,5	2	7,2	3	9,9	5
2	6	2	3	4	2	7,1	4	9,1	5
2	6	2	4	3,9	2	7,3	4	8,2	5
2	6	2	5	4	2	6,5	4	8,6	5
2	6	3	1	4,3	2	7,6	4	10,2	5
2	6	3	2	5,1	2	7,3	3	14,1	5
2	6	3	3	3,6	2	7,1	3	10,9	4
2	6	3	4	3,8	2	7,4	3	11,2	4
2	6	3	5	3,8	2	6,5	3	10,7	5
2	6	4	1	7	2	7,1	3	14,2	5
2	6	4	2	5	2	6,9	3	12,9	5
2	6	4	3	5,6	2	6,6	3	13,7	5
2	6	4	4	6,6	2	7,5	3	13,8	5
2	6	4	5	5,9	2	6,9	3	13,3	4

**Anexo 8.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol negro.

Variedad	Tratamiento	Réplica	Muestra	Altura 7 DDS	# de Hojas 7	Altura 14 DDS	# de Hojas 14	Altura 21 DDS	# de Hojas 21
3	1	1	1	3,9	2	6,1	4	8,4	7
3	1	1	2	4,3	2	5,6	3	8,6	5
3	1	1	3	4,4	2	6,2	3	9,1	5
3	1	1	4	4,8	2	5,5	3	8	5
3	1	1	5	4,2	2	6,1	4	7,7	5
3	1	2	1	3,8	2	7,1	3	8,5	8
3	1	2	2	4,1	2	6,7	3	9,2	5
3	1	2	3	5,3	2	6,6	4	8,9	6
3	1	2	4	4,7	2	6,9	3	9,6	7
3	1	2	5	4,4	2	6,1	3	9,6	8
3	1	3	1	5,5	2	7,5	4	14,6	7
3	1	3	2	5,1	2	7	3	11,3	4
3	1	3	3	5,1	2	6,7	3	10,7	5
3	1	3	4	5,7	2	7,5	3	12,6	6
3	1	3	5	3,9	2	7,3	4	11,2	5
3	1	4	1	4,2	2	6,1	4	14,5	5
3	1	4	2	4,2	2	6,6	4	13,3	5
3	1	4	3	4,7	2	6,9	4	14,4	6
3	1	4	4	3,7	2	6,3	4	14,8	5
3	1	4	5	4,5	2	7,5	4	13,9	7
3	2	1	1	6,3	2	7,5	4	9,2	5
3	2	1	2	5,6	2	6,8	3	9,5	6
3	2	1	3	4,3	2	6,1	3	9,8	5
3	2	1	4	5,6	2	7,2	3	11,2	5
3	2	1	5	6,2	2	6,9	3	10,3	4

continuación del anexo 8

3	2	2	1	5,9	2	8,2	3	12,1	7
3	2	2	2	4,4	2	8,1	4	9,6	5
3	2	2	3	5,2	2	7,9	3	10,4	5
3	2	2	4	6,1	2	9,2	3	10,5	5
3	2	2	5	6,3	2	9,4	4	11,4	5
3	2	3	1	4,7	2	10,5	3	12,8	4
3	2	3	2	5,8	2	11,1	3	13,1	7
3	2	3	3	5,7	2	10,2	3	12,8	5
3	2	3	4	5,1	2	9,7	4	11,5	5
3	2	3	5	4,9	2	10,3	3	11,6	5
3	2	4	1	7,1	2	8,2	4	11,2	7
3	2	4	2	6,8	2	7,7	3	10,4	5
3	2	4	3	6,5	2	7,9	3	10,6	5
3	2	4	4	7,1	2	7,2	3	11,1	5
3	2	4	5	6,1	2	7,1	4	10,8	5
3	3	1	1	5,9	2	6,6	3	12,7	7
3	3	1	2	5,3	2	6,3	3	12,9	4
3	3	1	3	5,5	2	6,9	4	11,9	4
3	3	1	4	5,1	2	6,8	3	12,5	5
3	3	1	5	4,9	2	6,6	3	14,1	5
3	3	2	1	5,8	2	7,9	4	11	7
3	3	2	2	4,2	2	6,8	3	10	4
3	3	2	3	4,5	2	7,5	3	12,1	4
3	3	2	4	4,5	2	7,6	3	11,2	5
3	3	2	5	4,1	2	6,8	3	11,6	5
3	3	3	1	5,5	2	7,5	3	11,9	7
3	3	3	2	5,1	2	7,7	4	12,3	7
3	3	3	3	4,9	2	7,1	3	11,8	4
3	3	3	4	5,3	2	6	3	12,6	7

continuación del anexo 8

3	3	3	5	5,8	2	7,8	3	12,9	8
3	3	4	1	6,2	2	6,9	3	10,3	8
3	3	4	2	6	2	7,8	3	8,8	11
3	3	4	3	6,4	2	7,9	4	10,1	5
3	3	4	4	6,2	2	7,7	4	10,8	8
3	3	4	5	5,9	2	7,5	3	11,2	7
3	5	1	1	4,2	2	8,1	3	10,7	8
3	5	1	2	4,5	2	7,2	3	11,2	7
3	5	1	3	4,1	2	7,5	3	12,5	7
3	5	1	4	4,2	2	7,8	3	10,5	9
3	5	1	5	4,3	2	7,2	3	11,5	7
3	5	2	1	5,7	2	7,5	4	11,8	6
3	5	2	2	5,3	2	7,1	4	12,5	6
3	5	2	3	5,1	2	6,5	4	12,6	9
3	5	2	4	4,9	2	6,6	3	11,5	9
3	5	2	5	4,8	2	7,4	4	10,5	7
3	5	3	1	6,1	2	8,1	4	11,8	5
3	5	3	2	4,6	2	8,2	3	12,6	9
3	5	3	3	5,1	2	8	3	13,1	9
3	5	3	4	5,3	2	7	4	12,5	7
3	5	3	5	6,1	2	7,6	3	12,8	8
3	5	4	1	5,7	2	7,8	3	11,5	8
3	5	4	2	5,8	2	6,9	3	12,1	7
3	5	4	3	5,2	2	6,5	3	12,5	9
3	5	4	4	5,5	2	6,1	3	12,9	7
3	5	4	5	5,1	2	6,9	3	11,5	7
3	6	1	1	4,5	2	7,4	4	12,6	8
3	6	1	2	4,4	2	7,2	4	11,1	8
3	6	1	3	4,7	2	6,6	4	10,8	8

continuación del anexo 8

3	6	1	4	4,6	2	6,3	3	11,5	9
3	6	1	5	4,6	2	5,9	4	11,8	8
3	6	2	1	4,9	2	7,4	4	12,6	4
3	6	2	2	4	2	6,9	3	10	7
3	6	2	3	4,1	2	6,6	4	11,1	7
3	6	2	4	3,6	2	6	4	9,2	5
3	6	2	5	4,3	2	7,1	4	9	5
3	6	3	1	4,6	2	7,5	4	10,1	5
3	6	3	2	5,5	2	7,8	3	12,9	7
3	6	3	3	4	2	7,7	3	12,1	7
3	6	3	4	3,9	2	8,1	3	10,7	4
3	6	3	5	3,7	2	6,9	3	10,8	5
3	6	4	1	7,2	2	7,6	3	12,3	5
3	6	4	2	5,3	2	7,2	3	12,6	5
3	6	4	3	5,5	2	7,5	3	12,9	5
3	6	4	4	6,5	2	8,1	4	13,1	5
3	6	4	5	5,8	2	7,9	3	12,9	4



**Anexo 9.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)
T1M1	22	0,014	0,84	5,95	16	0,026	1,72	7,48	48	0,0782	1,34	8,47	39	0,0268	1,04	7,4
T1M2	41	0,0134	0,84	7,43	5	0,0094	0,89	7,42	13	0,0221	0,84	5,11	52	0,0563	1,18	7,74
T1M3	12	0,0108	0,73	5,99	48	0,0646	1,48	8,82	21	0,0191	0,17	6,28	16	0,0342	0,96	3,99
T1M4	36	0,0088	0,61	6,16	31	0,0364	1,11	9,83	19	0,0196	1,94	9,9	45	0,0623	1,35	8,89
T1M5	50	0,0629	1,37	7,95	28	0,0212	1,57	8,59	18	0,0479	1,81	10,53	6	0,0017	1,66	9,19
T2M1	48	0,1813	1,23	7,28	62	0,076	2	7,26	47	0,0954	1,26	4,97	22	0,0365	1,03	5,78
T2M2	22	0,0846	1,17	4,58	28	0,0917	2,04	8,38	18	0,0816	0,9	2,89	44	0,1015	1,47	6,83
T2M3	47	0,1563	1,8	8,99	56	0,1665	1,36	4,96	35	0,1494	1,94	5,74	33	0,0409	1,63	7,29
T2M4	33	0,141	1,41	7,29	71	0,1252	1,34	5,75	85	0,1549	3,35	9,06	25	0,0367	1,77	10,6
T2M5	22	0,1669	1,8	7,36	50	0,1803	1,51	8,79	46	0,0843	0,96	4,44	20	0,0228	0,76	4,38
T3M1	31	0,0336	1,49	2,14	8	0,0157	0,98	5,85	13	0,0119	0,601	4,7	11	0,0201	1,53	7,74
T3M2	24	0,0157	1,01	5,56	28	0,0327	0,82	3,03	5	0,0049	0,46	3,56	13	0,0079	1,12	5,89
T3M3	9	0,0008	0,44	2,14	19	0,0304	1,1	7,14	5	0,0038	0,58	5,36	34	0,0528	1,27	6,85
T3M4	36	0,0124	0,52	4,73	27	0,444	0,74	5,49	15	0,067	0,82	7,15	12	0,012	1,73	7,17
T3M5	43	0,019	0,72	6,31	33	0,0474	1,54	8,63	41	0,0371	0,62	5,42	33	0,0283	0,98	7,36
T5M1	10	0,0195	2,15	7,92	17	0,051	2,82	5,74	5	0,0066	1,26	7,26	7	0,0043	1,99	7,67
T5M2	11	0,0351	2,12	9,41	9	0,0058	1,1	5,66	14	0,0375	0,96	5,05	12	0,0103	1,46	5,78
T5M3	4	0,0106	1,89	4,67	36	0,0657	1,61	7,69	12	0,0144	1,59	7,59	23	0,0322	1,18	8,42
T5M4	21	0,0385	2,73	6,78	34	0,056	1,17	5,13	4	0,006	1,84	10,81	9	0,017	1,82	8,91
T5M5	6	0,0004	3,24	8,92	4	0,0031	0,79	5,54	5	0,0056	0,61	7,68	21	0,0261	1,54	7,29
T6M1	25	0,0464	1,45	5,46	42	0,199	1,25	6,66	35	0,0509	2,95	8,9	26	0,0356	1,38	6,62
T6M2	44	0,0533	1,9	5,45	38	0,1131	1,11	4,95	45	0,0848	1,18	7,16	34	0,0236	0,44	7,32
T6M3	36	0,137	1,1	6,36	39	0,1481	0,9	6,62	54	0,0656	1,36	5,61	25	0,0232	1,79	8,6
T6M4	52	0,2621	0,89	3,92	16	0,0183	0,67	5,06	31	0,0611	0,77	6,34	35	0,0541	1,45	5,5
T6M5	36	0,0766	1,23	4,05	38	0,0636	1,76	5,06	43	0,0586	1,54	3,74	58	0,0912	1,86	6,23

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 10.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF
T1M1	27	0,25	3,66	8,35	8	0,13	1,21	18,44	4	0,1285	0,74	24,06	9	0,0610	2,44	45,67
T1M2	52	0,24	1,58	14,45	0	0	1,44	7,82	8	0,1457	2,72	34,40	6	0,0319	1,47	11,67
T1M3	0	0	1,22	10,23	16	0,1126	1,20	8,94	27	0,4323	3,59	28,18	3	0,0057	1,25	17,74
T1M4	13	0,1096	1,29	13,03	9	0,0597	1,96	11,9	4	0,1125	1,48	28,15	10	0,0706	1,03	16,64
T1M5	9	0,0432	1,97	4,71	8	0,29	1,75	14,31	19	0,1783	2,74	28,97	13	0,1349	2,07	30,18
T2M1	55	0,68	2,52	11,07	29	0,4006	4,32	18,01	19	0,0751	3,33	8,3	26	0,2475	1,37	10,92
T2M2	7	0,2108	1,14	13,36	50	0,6385	2,24	15,44	10	0,0306	1,48	4,88	52	0,3296	1,35	9,57
T2M3	8	0,20	2,92	16,42	36	0,5001	1,14	13,65	5	0,0228	2,40	5,82	5	0,0557	1,22	12,11
T2M4	25	0,47	1,88	18,78	42	0,4482	2,23	19,82	0	0	2,75	4,69	26	0,1473	0,80	5,75
T2M5	6	0,18	1,36	9,02	12	0,0669	1,14	6,64	9	0,0537	1,61	5,00	8	0,1378	1,21	10,25
T3M1	42	0,4103	2,43	11,91	18	0,2363	1,68	10,86	38	0,2706	0,83	19,77	23	0,2246	1,95	35,10
T3M2	24	0,2326	1,52	14,57	14	0,2301	1,54	18,45	14	0,1090	2,20	20,39	14	0,1487	2,67	13,22
T3M3	15	0,1573	2,35	11,43	0	0	1,86	16,48	9	0,0291	1,39	12,45	35	0,8172	4,10	27,42
T3M4	0	0	1,19	13,87	0	0	1,50	9,92	26	0,3488	0,92	25,45	0	0	1,09	10,90
T3M5	53	0,6164	1,20	10,46	10	0,0836	0,96	10,35	6	0,0633	1,45	22,51	9	0,1112	2,64	10,63
T5M1	4	0,0202	1,25	16,73	9	0,0275	1,65	19,07	10	0,0835	1,82	37,54	0	0	2,86	54,35
T5M2	8	0,0405	3,11	23,95	0	0	2,39	21,99	2	0,0087	2,12	40,66	7	0,1339	3,26	31,88
T5M3	0	0	4,66	23,95	13	0,1088	1,81	22,94	20	0,2448	1,42	14,21	6	0,0291	3,67	63,21
T5M4	0	0	1,12	5,10	4	0,0350	2,32	22,68	10	0,0254	1,68	17,34	0	0	2,30	0,3822
T5M5	5	0,0304	2,39	27,28	0	0	1,33	18,64	15	0,2085	2,14	28,63	6	0,0396	5,18	0,7030
T6M1	5	0,0794	1,78	5,84	0	0	0,82	2,29	18	0,32	2,41	14,59	11	0,17	1,29	18,82
T6M2	2	0,0222	1,52	5,58	3	0,0316	3,60	9,87	4	0,040	1,39	6,50	1	0,0162	2,22	13,15
T6M3	11	0,27	0,97	6,78	45	0,55	3,23	17,09	28	0,54	1,59	8,32	5	0,0197	1,96	4,61
T6M4	24	0,28	1,69	17,82	8	0,16	2,71	6,12	32	0,37	1,56	10,61	17	0,2208	1,36	9,31
T6M5	6	0,064	2,69	13,51	11	0,29	1,23	11,06	54	0,66	2,43	11,48	34	0,56	1,46	17,66

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 11.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol negro en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)	NN	PFN (gr)	PFR (gr)	PFF (gr)
T1M1	23	0,0249	0,59	3,62	24	0,0131	0,6	4,67	26	0,0463	0,81	7,62	5	0,0179	0,4	3,61
T1M2	17	0,0333	0,54	3,47	9	0,0134	0,95	3,9	5	0,0056	0,4	4,99	11	0,0192	0,77	7,1
T1M3	27	0,0658	0,64	4,54	2	0,0017	0,48	3,63	18	0,00776	0,93	8,62	7	0,0176	0,43	3,37
T1M4	23	0,0252	0,61	3,43	33	0,0124	0,82	8,26	7	0,0142	0,4	4,24	15	0,0111	0,9	2,87
T1M5	15	0,0254	0,61	3,81	10	0,0086	0,44	2,83	10	0,0212	0,55	4,89	10	0,0319	0,55	5,35
T2M1	6	0,049	0,58	5,14	13	0,0419	0,86	3,64	17	0,0444	1,29	4,1	29	0,0662	0,68	3,66
T2M2	18	0,3742	1,05	5,56	17	0,0772	1,6	4,96	31	0,0423	1,09	5,37	12	0,005	0,55	2,35
T2M3	7	0,0195	0,51	4,18	4	0,0134	0,76	3,83	10	0,042	0,76	4,23	13	0,0041	0,85	3,46
T2M4	22	0,112	0,5	2,17	31	0,2472	0,69	5,77	28	0,0407	0,44	2,69	34	0,0914	0,72	2,56
T2M5	17	0,0854	0,96	8,85	45	0,1313	0,91	4,66	25	0,1389	1,28	4,89	16	0,062	0,71	5,12
T3M1	4	0,0024	0,47	2,44	8	0,0119	0,29	5,13	22	0,0818	0,84	7,06	10	0,0527	0,52	5,86
T3M2	18	0,0223	0,68	4,54	5	0,0027	0,58	3,76	31	0,2942	1,18	7,48	9	0,0093	0,74	6,57
T3M3	19	0,0444	0,56	3,51	7	0,0066	0,97	7,92	12	0,051	1,07	6,02	11	0,0125	0,15	3,69
T3M4	12	0,0145	0,79	4,74	10	0,0107	0,49	3,59	8	0,0564	1,03	5,83	11	0,0224	0,51	7,2
T3M5	25	0,0342	0,55	6,05	34	0,0618	1,73	5,73	17	0,0339	0,66	7,01	30	0,0459	0,86	7,86
T5M1	0	0	0,45	2,71	0	0	0,81	4,07	0	0	0,73	7,23	0	0	0,61	9,69
T5M2	0	0	0,69	2,81	22	0,0279	0,72	6,31	0	0	0,27	5,16	0	0	0,42	4,55
T5M3	6	0,0066	0,38	2,18	12	0,0307	0,75	4,45	0	0	0,42	7,98	0	0	0,53	5,48
T5M4	11	0,0493	0,77	5,07	8	0,0055	1,03	4,26	0	0	0,9	7,81	0	0	0,77	4,14
T5M5	2	0,0005	0,61	4,16	0	0	0,42	7,1	0	0	0,62	3,96	0	0	0,5	4,21
T6M1	14	0,0873	0,67	3,8	6	0,009	0,46	3,51	15	0,0158	0,47	3,84	7	0,013	0,36	3,86
T6M2	0	0	0,82	6,7	8	0,03	0,89	5,34	10	0,0393	0,5	4,55	6	0,0056	0,42	5,38
T6M3	8	0,1114	0,6	5,43	12	0,016	0,71	5,96	12	0,0319	0,45	3,81	20	0,0447	0,5	3,97
T6M4	6	0,0556	0,74	4,43	7	0,083	1,05	2,66	7	0,0159	0,35	4,25	11	0,0093	0,48	5,31
T6M5	0	0	0,47	4,09	15	0,039	1,95	3,74	13	0,0145	0,4	3,38	12	0,0186	0,58	4,48

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 12.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol negro en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF
T1M1	2	0,0462	1,06	5,28	3	0,0358	0,86	14,47	4	0,0873	0,99	17,09	6	0,0721	2,02	32,87
T1M2	2	0,0386	1,19	8,33	0	0	0,89	11,25	1	0,0027	0,74	8,91	3	0,0655	0,79	11,01
T1M3	0	0	1,07	14,54	3	0,0306	0,97	18,74	14	0,1292	1,62	32,69	6	0,0303	0,99	16,80
T1M4	11	0,0674	0,83	8,88	4	0,1914	1,31	16,34	16	0,1280	1,86	28,62	11	0,1245	1,05	21,09
T1M5	1	0,0154	0,94	13,92	9	0,1848	1,09	11,38	7	0,2062	1,1	20,67	8	0,0905	1,14	30,48
T2M1	20	0,4094	1,64	15,7	0	0	1,53	6,58	5	0,0017	0,65	4,63	7	0,0884	1,49	10,27
T2M2	7	0,0402	0,94	6,32	3	0,0114	1,01	7,56	0	0	0,82	3,73	5	0,0433	0,90	8,37
T2M3	0	0	0,71	9,01	18	0,2028	1,01	6,62	4	0,0384	1,27	5,26	11	0,1114	1,08	6,37
T2M4	0	0	0,90	9,76	14	0,1615	1,39	8,84	4	0,1010	1,24	9,64	0	0	12,71	1,39
T2M5	5	0,0332	1,32	10,02	0	0	1,28	6,04	6	0,0261	1,29	8,45	10	0,0215	1,58	9,53
T3M1	19	0,2457	0,870	10,87	3	0,0453	0,99	12,13	2	0,0340	1,25	13,98	9	0,2050	1,87	19,50
T3M2	4	0,0305	0,8320	4,68	4	0,0500	1,30	21,95	4	0,0138	0,84	4,92	10	0,2285	1,28	23,20
T3M3	0	0	0,1249	9,49	8	0,1325	2,52	26,83	11	0,2476	2,09	15,52	2	0,0031	1,60	36,66
T3M4	1	0,0084	0,8232	11,99	3	0,040	2,08	20,85	11	0,1219	1,33	18,04	2	0,0368	0,38	10,65
T3M5	4	0,055	0,0319	15,31	18	0,4070	1,28	19,09	6	0,1091	0,94	12,02	2	0,0110	1,14	36,20
T5M1	0	0	1,94	25,41	3	0,0355	2,33	22,70	0	0	0,98	20,07	0	0	1,34	23,51
T5M2	0	0	0,67	7,78	0	0	1,07	9,69	5	0,0499	3,12	49,73	0	0	2,62	52,30
T5M3	0	0	0,76	12,99	0	0	1,85	32,55	0	0	1,28	30,80	0	0	2,92	61,94
T5M4	0	0	0,78	8,47	6	0,1227	1,49	17,79	2	0,0104	2,55	25,12	0	0	2,74	41,54
T5M5	0	0	1,04	8,66	0	0	1,34	17,90	3	0,015	1,40	22,44	0	0	2,21	41,33
T6M1	7	0,2152	1,52	10,30	10	0,1485	2,24	7,85	5	0,0321	1,03	5,58	6	0,0382	0,90	7,94
T6M2	14	0,2397	0,94	7,61	4	0,1592	1,29	9,24	19	0,3109	2,82	12,54	4	0,0211	1,36	9,77
T6M3	4	0,1880	0,93	6,24	14	0,3617	2,65	11,15	14	0,0595	1,59	6,70	1	0,0170	0,83	7,16
T6M4	5	0,1837	1,89	6,95	0	0	1,0	9,66	4	0,0707	0,26	2,60	7	0,0394	1,06	10,10
T6M5	1	0,0115	0,67	6,67	4	0,0707	1,39	13,17	4	0,0242	0,66	4,65	8	0,0777	0,94	8,57

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 13.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0016	0,0776	0,78	0,0022	0,1207	1	0,0107	0,1446	0,96	0,002	0,1553	0,93
T1M2	0,0013	0,1122	0,88	0,0006	0,2086	0,89	0,0016	0,1061	0,66	0,0096	0,196	1,04
T1M3	0,0007	0,096	0,77	0,0088	0,1726	1,14	0,0024	0,0702	0,73	0,0055	0,1208	0,47
T1M4	0,0018	0,1145	0,83	0,0058	0,1584	1,23	0,001	0,2207	1,23	0,0089	0,1992	1,12
T1M5	0,0072	0,249	1,14	0,0028	0,1719	1,06	0,0044	0,2431	1,36	0,0002	0,2062	1,12
T2M1	0,024	0,1367	0,92	0,0109	0,2012	0,98	0,0119	0,1153	0,67	0,0038	0,1066	0,8
T2M2	0,0145	0,1035	0,59	0,0148	0,2336	1,04	0,0119	0,1166	0,38	0,0106	0,1902	0,92
T2M3	0,0223	0,2004	1,13	0,0202	0,1731	0,83	0,023	0,2431	0,77	0,0159	0,2001	0,88
T2M4	0,0189	0,162	0,86	0,0175	0,1821	0,74	0,0255	0,369	1,41	0,0028	0,2514	1,44
T2M5	0,0159	0,2194	0,94	0,032	0,2132	1,13	0,0122	0,1454	0,62	0,003	0,1101	0,58
T3M1	0,0077	0,2374	0,44	0,0025	0,112	0,83	0,002	0,1486	0,93	0,0036	0,2023	1,01
T3M2	0,0037	0,2401	0,99	0,0062	0,1321	0,49	0,0014	0,1521	0,72	0,0017	0,155	0,81
T3M3	0,0008	0,1364	0,47	0,0034	0,1597	0,97	0,0012	0,1841	1,04	0,0092	0,1505	0,94
T3M4	0,0035	0,1961	0,88	0,0061	0,1142	0,8	0,0016	0,2213	1,25	0,0021	0,1964	1,02
T3M5	0,0082	0,2499	1,09	0,0068	0,2346	1,25	0,0097	0,2378	1,22	0,0052	0,1445	0,92
T5M1	0,0009	0,2163	0,92	0,0043	0,2918	1,01	0,0008	0,2324	1,08	0,0008	0,2302	0,98
T5M2	0,0032	0,237	1,01	0,0008	0,0905	0,64	0,0057	0,2349	0,64	0,0014	0,1341	0,54
T5M3	0,0005	0,1518	0,4	0,0076	0,2113	1,02	0,0015	0,1757	1,14	0,068	0,1697	0,98
T5M4	0,0028	0,2462	0,73	0,0046	0,1459	0,59	0,0007	0,2438	1,28	0,0017	0,1919	1,11
T5M5	0,003	0,2763	0,92	0,0001	0,103	0,65	0,0012	0,0899	0,92	0,0006	0,1991	0,87
T6M1	0,0033	0,16	0,95	0,0337	0,201	0,89	0,0106	0,4024	1,12	0,0058	0,2375	0,42
T6M2	0,0048	0,2264	0,76	0,0234	0,1396	0,56	0,0246	0,1879	1,01	0,0043	0,0842	1,02
T6M3	0,0239	0,2457	0,72	0,0261	0,1361	0,8	0,01	0,1947	0,68	0,0035	0,2382	0,99
T6M4	0,0467	0,1341	0,62	0,0024	0,1123	0,67	0,0074	0,1452	0,9	0,0131	0,2515	0,78
T6M5	0,0119	0,1429	0,55	0,0133	0,257	0,75	0,0485	0,2337	0,58	0,0059	0,2978	0,82

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 14.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0314	0,79	1,43	0,0278	0,31	4,55	0,0290	0,51	4,38	0,0133	0,57	7,02
T1M2	0,0479	0,36	2,69	0	0,28	1,31	0,0260	0,64	5,44	0,0059	0,35	2,20
T1M3	0	0,28	1,73	0,0146	0,60	1,44	0,0751	0,89	4,63	0,0012	0,27	3,35
T1M4	0,0276	0,32	2,40	0,0103	0,35	2,64	0,0262	0,40	5,24	0,0119	0,20	2,75
T1M5	0,0081	0,44	0,83	0,0771	0,43	2,28	0,0333	0,68	4,77	0,0278	0,614	5,23
T2M1	0,1021	0,42	2,23	0,0693	0,74	2,68	0,0089	0,61	1,69	0,0402	0,30	2,29
T2M2	0,0326	0,21	3,34	0,1011	0,48	2,88	0,0032	0,23	0,93	0,0443	0,24	1,63
T2M3	0,0335	0,58	3,07	0,0579	0,20	2,36	0,0006	0,33	1,07	0,0050	0,26	2,17
T2M4	0,0882	0,35	3,54	0,0817	0,54	3,46	0	0,41	0,83	0,0171	0,16	0,85
T2M5	0,0148	0,27	1,91	0,0088	0,12	1,06	0,0065	0,27	0,98	0,0217	0,26	2,26
T3M1	0,0764	0,73	2,66	0,0008	0,47	2,46	0,0624	0,26	3,79	0,0346	0,38	5,34
T3M2	0,0309	0,35	2,59	0,0226	0,33	3,57	0,0168	0,69	4,01	0,0165	0,46	2,17
T3M3	0,0264	0,58	2,25	0	0,50	3,21	0,0039	0,43	2,52	0,1398	1,00	5,27
T3M4	0,0046	0,33	0,33	0	0,35	1,61	0,0690	0,63	5,39	0	0,27	2,02
T3M5	0,1186	0,30	0,30	0,0128	0,23	1,76	0,0099	0,45	3,94	0,0137	0,44	1,78
T5M1	0,0025	0,23	5,30	0,0046	0,35	5,21	0,0175	0,49	3,43	0	0,56	8,84
T5M2	0,0060	0,59	4,56	0	0,41	5,27	0,0010	0,41	1,81	0,0195	0,53	4,98
T5M3	0	0,66	5,44	0,0846	0,44	4,69	0,0400	0,25	1,98	0,0051	0,73	10,82
T5M4	0	0,20	1,13	0,0069	0,43	4,63	0,0050	0,38	2,22	0	0,42	13,45
T5M5	0,0056	0,30	7,71	0	0,47	3,49	0,0370	0,44	4,56	0,0047	1,21	18,50
T6M1	0,0057	0,31	1,09	0	0,14	0,72	0,0336	0,49	2,61	0,0298	0,25	3,37
T6M2	0,0021	0,25	1,02	0,0039	0,69	1,67	0,0031	0,26	1,21	0,0006	0,49	2,44
T6M3	0,0454	0,17	1,47	0,0823	0,53	3,02	0,0995	0,30	1,34	0,0021	0,42	0,80
T6M4	0,0522	0,37	2,90	0,0283	0,60	1,38	0,0557	0,34	1,96	0,0315	0,28	1,81
T6M5	0,0107	0,28	2,69	0,0485	0,48	2,19	0,1237	0,38	2,55	0,1196	0,28	3,59

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 15.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 30 DDS para el genotipo fréjol negro en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0028	0,075	0,38	0,0042	0,0836	0,51	0,0063	0,0838	0,72	0,0029	0,06	0,62
T1M2	0,0058	0,0711	0,41	0,0017	0,0944	0,39	0,0008	0,044	0,54	0,0015	0,1061	0,79
T1M3	0,01	0,067	0,5	0,0024	0,0536	0,38	0,0136	0,0859	0,89	0,0019	0,0524	0,45
T1M4	0,0039	0,0629	0,41	0,0038	0,1546	0,84	0,0021	0,0543	0,61	0,0017	0,1274	0,34
T1M5	0,0041	0,0916	0,41	0,0013	0,0527	0,28	0,004	0,0863	0,6	0,0047	0,078	0,56
T2M1	0,0072	0,0572	0,48	0,0069	0,0875	0,46	0,0068	0,1214	0,43	0,0099	0,0842	0,48
T2M2	0,0643	0,1363	0,65	0,0099	0,1811	0,55	0,0071	0,1218	0,53	0,0024	0,0464	0,27
T2M3	0,0008	0,0447	0,4	0,0032	0,0653	0,39	0,0046	0,0777	0,48	0,0015	0,0818	0,37
T2M4	0,0251	0,0583	0,22	0,0456	0,0964	0,64	0,006	0,0423	0,27	0,0134	0,0735	0,27
T2M5	0,0129	0,0984	1,07	0,022	0,0689	0,62	0,0176	0,1347	0,58	0,0101	0,1044	0,78
T3M1	0,0006	0,0355	0,25	0,0015	0,0269	0,44	0,0109	0,0669	0,8	0,0084	0,0548	0,64
T3M2	0,002	0,0653	0,5	0,0009	0,0439	0,37	0,0459	0,1238	0,78	0,0006	0,0957	0,78
T3M3	0,0067	0,0666	0,42	0,0008	0,1002	0,85	0,0097	0,1117	0,68	0,0031	0,0213	0,48
T3M4	0,0018	0,0904	0,54	0,0007	0,0556	0,36	0,0103	0,1167	0,64	0,0056	0,01096	0,87
T3M5	0,0051	0,0783	0,56	0,0099	0,0769	0,58	0,0045	0,076	0,49	0,0033	0,102	0,74
T5M1	0	0,0662	0,3	0	0,0686	0,44	0	0,0754	0,85	0	0,0946	1,08
T5M2	0	0,0638	0,23	0,0053	0,1048	0,75	0	0,0393	0,51	0	0,0551	0,45
T5M3	0,0005	0,0332	0,21	0,006	0,0896	0,42	0	0,0405	0,76	0	0,0669	0,65
T5M4	0,0073	0,1131	0,69	0,0009	0,123	0,59	0	0,117	0,82	0	0,1034	0,44
T5M5	0,0001	0,0773	0,5	0	0,0835	0,84	0	0,0616	0,32	0	0,0638	0,46
T6M1	0,0123	0,1117	0,34	0,0003	0,0504	0,32	0,0007	0,0606	0,39	0,0018	0,0702	0,46
T6M2	0	0,0812	0,85	0,0022	0,09	0,55	0,0069	0,727	0,49	0,0017	0,0685	0,66
T6M3	0,0169	0,084	0,7	0,0026	0,0902	0,6	0,0043	0,0605	0,44	0,0071	0,092	0,56
T6M4	0	0,0715	0,31	0,0099	0,134	0,36	0,0018	0,0541	0,54	0,001	0,0692	0,68
T6M5	0,008	0,0423	0,46	0,0038	0,1963	0,39	0,007	0,0623	0,46	0,0022	0,0977	0,69

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.

**Anexo 16.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 60 DDS para el genotipo fréjol negro en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0035	0,2903	1,42	0,0125	0,2755	3,08	0,0034	0,3463	3,84	0,0179	0,5203	5,84
T1M2	0,0080	0,2938	1,83	0	0,2763	2,40	0,0008	0,2371	1,83	0,0162	0,2447	2,01
T1M3	0	0,2610	2,65	0,0064	0,2487	3,47	0,0361	0,4575	6,16	0,0104	0,3047	3,07
T1M4	0,0169	0,2249	1,85	0,0136	0,3634	3,03	0,0303	0,5534	4,89	0,0276	0,3343	3,86
T1M5	0,0033	0,2646	2,48	0,0406	0,3285	2,01	0,0581	0,3358	3,09	0,0208	0,3512	5,14
T2M1	0,0869	0,4224	2,8396	0	0,3978	1,4829	0,0002	0,1592	1,1274	0,0225	0,3917	2,4144
T2M2	0	0,2829	1,5846	0,0020	0,2969	1,6175	0	0,2190	0,9867	0,0114	0,1747	1,8369
T2M3	0,0077	0,2355	2,0594	0,0586	0,3192	1,0921	0,0069	0,2934	0,1617	0,0246	0,2878	1,5977
T2M4	0	0,2838	2,8130	0,0433	0,4170	0,8545	0,0194	0,3030	2,1925	0	0,2984	3,1069
T2M5	0,0106	0,4547	2,7008	0	0,3365	1,5152	0,0071	0,3412	1,843	0,0008	0,3329	1,9134
T3M1	0,0511	0,2062	1,96	0,0096	0,3035	2,25	0,0089	0,3382	2,60	0,0252	0,3983	3,85
T3M2	0,0080	0,2679	1,16	0,0084	0,2535	4,13	0,0046	0,2314	2,74	0,0394	0,3292	4,52
T3M3	0	0,2262	2,02	0,0388	0,6839	5,40	0,0267	0,542	3,14	0,0018	0,3938	6,43
T3M4	0,0011	0,2358	2,68	0,0055	0,5660	3,50	0,0204	0,3980	3,48	0,0113	0,1127	1,71
T3M5	0,0007	0,2638	2,89	0,0870	0,2968	3,84	0,0313	0,3067	2,21	0,0030	0,3348	6,14
T5M1	0	0,3772	4,6883	0	0,5094	4,2721	0	0,2031	3,1956	0	0,3789	4,2682
T5M2	0	0,1571	1,6130	0	0,2174	1,8892	0,0090	0,8142	9,1300	0	0,6326	8,4869
T5M3	0	0,1781	2,4375	0,0058	0,4206	6,0094	0	0,3590	5,9193	0	0,7419	10,0431
T5M4	0	0,1734	1,5685	0,0250	0,2984	2,8207	0,0031	0,5109	4,4243	0	0,7488	6,6790
T5M5	0	0,2297	1,5243	0	0,3241	3,6564	0,0036	0,3294	3,6967	0	0,5986	7,6656
T6M1	0,0463	0,3867	2,0748	0,0167	0,4825	1,5787	0,0089	0,2469	1,4035	0,0014	0,2354	1,4998
T6M2	0,0437	0,2624	1,7992	0,0177	0,2418	1,9875	0,0660	0,6760	2,5125	0,0016	0,3422	2,0048
T6M3	0,0363	0,2868	1,8489	0,0709	0,5864	1,9393	0,0068	0,3609	1,3875	0,0044	0,2257	1,7580
T6M4	0,0278	0,3902	1,3445	0	0,2859	1,8916	0,0074	0,1010	0,6389	0,0045	0,2443	2,0380
T6M5	0,0028	0,2197	1,4665	0,0092	0,3343	2,5674	0,0017	0,2003	0,9829	0,0169	0,2533	1,6369

NN: Número de nódulos, PFN: Peso fresco de los nódulos, PFR: Peso fresco de la raíz, PFF: Peso fresco del follaje.



**Anexo 17.** Prueba de Tukey HSD para fréjol rojo con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.

Altura 7 DDS		# de hojas 7 DDS		Altura 14 DDS		# de hojas 14 DDS		Altura 21 DDS		# de hojas 21 DDS	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T2	4,4 a	T1	2 a	T2	9,6 a	T6	3,45 a	T3	11,935 a	T5	8,05 a
T3	5,885 b	T2	2 a	T5	7,16 b	T1	3,4 a	T6	11,13 ab	T3	6,3 b
T5	5,13 bc	T3	2 a	T3	6,965 b	T5	3,25 a	T5	10,98 ab	T1	5,8 b
T6	4,97 bc	T5	2 a	T6	6,89 b	T3	3,15 a	T1	10,52 ab	T6	5,6 b
T1	4,665 c	T6	2 a	T1	6,6 b	T2	3,15 a	T2	10,4 b	T2	5,05 b

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 18.** Prueba de Tukey HSD para fréjol negro con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.

Altura 7 DDS		# de hojas 7 DDS		Altura 14 DDS		# de hojas 14 DDS		Altura 21 DDS		# de hojas 21 DDS	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T2	5,785 a	T1	2 a	T2	8,36 a	T1	3,5 a	T5	11,93 a	T5	7,55 a
T3	5,355 ab	T2	2 a	T5	7,3 b	T6	3,5 a	T3	11,635 a	T3	6,1 b
T5	5,08 bc	T3	2 a	T3	7,185 b	T2	3,3 a	T6	11,635 a	T6	6,05 b
T6	4,785 bc	T5	2 a	T6	7,185 b	T5	3,3 a	T2	10,995 a	T1	5,8 b
T1	4,525 c	T6	2 a	T1	6,615 b	T3	3,25 a	T1	10,945 a	T2	5,25 b

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 19.** Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol rojo sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 30 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T6	46,05a	T6	0,11231 a	T5	1,693 a	T1	7,656 a	T6	0,01816 a	T6	0,20141 a	T1	0,967 a
T2	21,5ab	T2	0,10869 a	T2	1,536 ab	T5	7,196 ab	T2	0,01558 a	T5	0,19359 a	T3	0,9035 a
T1	12,25 bc	T3	0,04487 b	T6	1,349 abc	T2	6,631 abc	T5	0,00575 b	T2	0,18365 a	T2	0,8815 a
T3	17,5 cd	T1	0,03178 b	T1	1,172 bc	T6	5,980 bc	T3	0,00433 b	T3	0,18025 a	T5	0,8715 a
T5	5,95 d	T5	0,02228 b	T3	0,953 c	T3	5,611 c	T1	0,00395 b	T1	0,15718 a	T6	0,7795 a

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 20.** Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 30 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T2	19,75 a	T2	0,08440 a	T2	0,8395 a	T3	5,5995 a	T2	0,0138 a	T6	0,1156 a	T3	0,5315 a
T3	15,15 ab	T3	0,04358 ab	T3	0,7335 a	T5	5,1665a	T3	0,0066 ab	T2	0,0891 a	T5	0,5655 a
T1	14,85 ab	T6	0,03199 b	T6	0,6435 a	T1	4,741 a	T6	0,0045 b	T1	0,0792 a	T1	0,5315 a
T6	9,45 bc	T1	0,020828 b	T1	0,621 a	T6	4,4245 a	T1	0,0039 b	T5	0,0770 a	T6	0,5125 a
T5	3,05 c	T5	0,006025 b	T5	0,62 a	T2	4,3595 a	T5	0,0010 b	T3	0,0709 a	T2	0,497 a

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 21.** Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol rojo sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 60 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T2	21,5 a	T2	0,24476 a	T5	2,424 a	T5	24,561 a	T2	0,0368 a	T5	0,475 a	T5	5,901 a
T3	17,5 ab	T6	0,20619 a	T2	1,920 a	T1	18,892 ab	T6	0,0347 a	T1	0,464 a	T1	3,315 b
T6	15,95 ab	T3	0,20445 a	T6	1,895 a	T3	16,307 ab	T3	0,0329 a	T3	0,459 a	T3	2,848 b
T1	12,25 ab	T1	0,12682 ab	T1	1,8405 a	T2	10,975 b	T1	0,0247 a	T6	0,3655 a	T2	2,0615 b
T5	5,95 b	T5	0,05179 b	T3	1,7735 a	T6	10,550 b	T5	0,012 a	T2	0,349 a	T6	1,9915 b

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 22.** Prueba de Tukey HSD para el genotipo fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 60 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T3	6,15 a	T3	0,10126 a	T2	1,738 a	T5	26,636 a	T3	0,0191 a	T5	0,41014 a	T5	4,69941 a
T2	5,95 ab	T6	0,09045 a	T5	1,7215 a	T3	17,194 b	T6	0,0175 ab	T3	0,33443 a	T3	3,3325 b
T1	5,55 ab	T1	0,07732 ab	T6	1,2985 a	T1	17,168 b	T1	0,0162 ab	T1	0,32561 a	T1	3,1975 b
T6	5,45 ab	T2	0,06451 ab	T3	1,1786 a	T6	8,2225 c	T2	0,0151 ab	T6	0,31813 a	T2	1,78701 c
T5	0,95 b	T5	0,01167 b	T1	1,1255 a	T2	7,7045 c	T5	0,0023 b	T2	0,3124 a	T6	1,71806 c

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 23.** Prueba de Tukey HSD entre ambas variedades fréjol rojo y fréjol negro sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa.

Tratamientos	Var.	NN	PFN	PFR	PFF	PSN	PSR	PSF
T1	V2	28,3 a	0,031785 a	1,1725 a	7,656 a	0,003955 a	0,157185 a	0,967 a
	V3	14,85 b	0,020828 a	0,621 b	4,741 b	0,003975 a	0,079235 b	0,5315 b
T2	V2	40,7 a	0,10869 a	1,5365 a	6,631 a	0,01558 a	0,18365 a	0,8815 a
	V3	19,75 b	0,084405 a	0,8395 b	4,3595 b	0,013865 a	0,089115 b	0,497 b
T3	V2	22 a	0,044875 a	0,95355 a	5,611 a	0,00433 a	0,180255 a	0,9035 a
	V3	15,15a	0,04358 a	0,7335 a	5,5995 a	0,006615 a	0,070973 b	0,5885 b
T5	V2	13,2 a	0,022285 a	1,6935 a	7,196 a	0,00575789 a	0,19359 a	0,8715 a
	V3	3,05 b	0,006025 a	0,62 b	5,1665 b	0,001005 a	0,077035 b	0,5655 b
T6	V2	46,05 a	0,11231 a	1,349 a	5,9805 a	0,01816 a	0,20141 a	0,7795 a
	V3	9,45 b	0,031995 a	0,6435 b	4,4245 b	0,004525 b	0,115685 b	0,5125 b

Tratamientos	Var.	NN	PFN	PFR	PFF	PSN	PSR	PSF
T1	V2	12,25 a	0,126825 a	1,8405 a	18,892 a	0,024725 a	0,4642 a	3,3155 a
	V3	5,55 b	0,077325 a	1,1255 b	17,168 a	0,01632 a	0,325615 b	3,1975 a
T2	V2	21,5 a	0,24476 a	1,9205 a	10,975 a	0,036875 a	0,349 a	2,0615 a
	V3	5,95 b	0,064515 b	1,738 a	7,7045 b	0,0151b	0,3124 a	1,78701 a
T3	V2	17,5 a	0,204455 a	1,7735 a	16,307 a	0,032985 a	0,459 a	2,8485 a
	V3	6,15 b	0,10126 a	1,1786 b	17,194 a	0,01914 a	0,334435 b	3,3325 a
T5	V2	5,95 a	0,051795 a	2,424 a	24,5618 a	0,012 a	0,475 a	5,901 a
	V3	0,95 b	0,011675 b	1,7215 b	26,636 a	0,002325 a	0,41014 a	4,69941 a
T6	V2	15,95 a	0,206195 a	1,8955 a	10,5505 a	0,034745 a	0,3655 a	1,9915 a
	V3	5,45 b	0,09045 b	1,2985 b	8,2225 a	0,01755 a	0,318135 a	1,71806 a

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

## Anexo 24. Tríptico de día de campo.

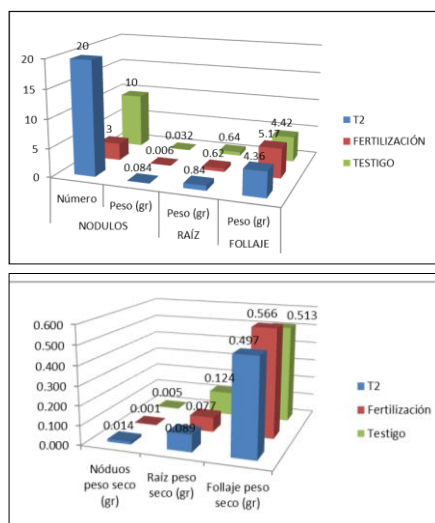


Figura 3-4. Parámetros de nodulación a los 30 días (peso fresco y peso seco respectivamente) en fréjol negro, en el sector Moraspamba, Loja.

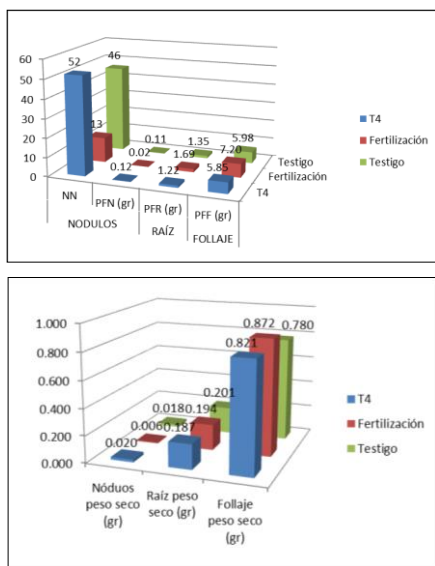


Figura 5-6. Parámetros de nodulación a los 30 días (peso fresco y peso seco respectivamente) en fréjol rojo, en el sector Moraspamba, Loja.

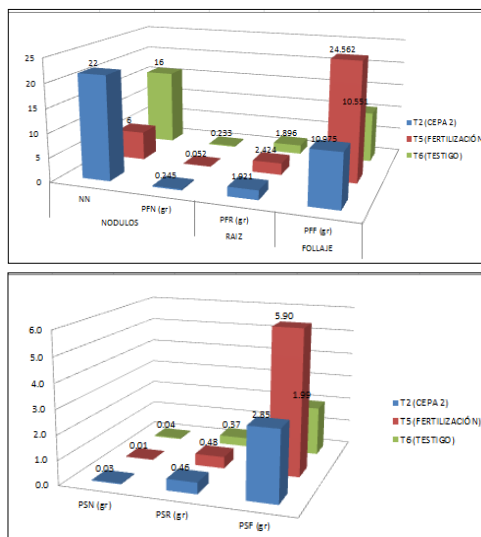


Figura 7-8. Parámetros de nodulación a los 60 días (peso fresco y peso seco respectivamente) en fréjol rojo, en el sector Moraspamba, Loja.

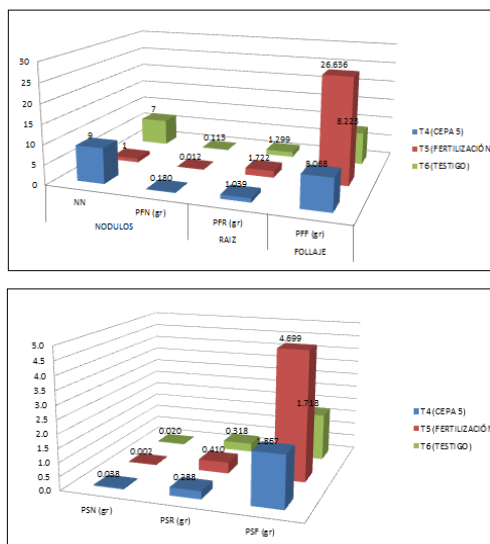


Figura 9-10. Parámetros de nodulación a los 60 días (peso fresco y peso seco respectivamente) en fréjol negro, en el sector Moraspamba, Loja.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
Área Agropecuaria y de Recursos Naturales  
Renovables  
INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS:

“Determinación de la eficiencia de bacterias diazotróficas en genotipos de fréjol común en la hoya de Loja”.



Director:

Ing. Kléver Iván Granda Mora., M. Sc.

Tesistas:

María de los Angeles Ochoa Tapia  
Enrique Vinicio Ruilova Vásquez

109

## INTRODUCCIÓN

Las Leguminosas comprenden una amplia variedad de especies; posee un estimado de 700 géneros y 18 000 especies (Muñoz, 2011). Son las únicas especies que pueden fijar nitrógeno, por la presencia de ciertas bacterias simbióticas como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*. Este proceso (FBN) permite disminuir la aplicación de fertilizantes nitrogenados, y depende de la especie leguminosa utilizada, efectividad del rizobio aplicado, condiciones edafoclimáticas y manejo del cultivo. Los niveles promedio de fijación en fréjol la cantidad de nitrógeno fijado es de 25-100 kg ha año (Díaz, 2010).

Esta investigación es encontrar alternativas biológicas eficientes para los agricultores, que contribuyan al incremento de los rendimientos agrícolas y a minimizar la utilización de fertilizantes nitrogenados.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- ◆ Evaluar el efecto de bacterias diazotróficas simbióticas sobre parámetros microbiológicos y fenotípicos en la interacción con genotipos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para contribuir a la obtención de bioinoculantes comerciales eficientes en este cultivo.

### Objetivos específicos

- ✗ Determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* nativos de la región Sur del Ecuador sobre parámetros de nodulación de los genotipos fréjol rojo, fréjol negro y blanco belén en condiciones de campo.
- ✗ Evaluar el efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre la biomasa, componentes de rendimiento, contenido total de N y rendimiento agrícola de los genotipos de fréjol, objetos de estudio.
- ✗ Evaluar la influencia de la aplicación de los aislados sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación.

## METODOLOGÍA

### Metodología para el primer objetivo

- ✗ Se utilizarán los mejores aislados obtenidos a partir de los estudios en condiciones controladas de la tesis titulada "Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en genotipos de fréjol común en diferentes zonas agroecológicas de la provincia de Loja".

### Elaboración del inoculante

- ✗ 250 gramos de turba para cada una de las cepas a analizar.
- ✗ Se esterilizó el soporte en Elenmeyer en autoclave (120 grados, 121 atm durante 20 min).
- ✗ Las cepas se inocularon a razón de 250 ml por kg de soporte, por lo que se adicionó 62.5 ml del inoculo a cada cepa.
- ✗ Se midió la densidad óptica de cada cultivo de las cepas para tener títulos de 108 unidades formadoras de colonias por cada ml (UFC/ml).
- ✗ El inoculo se realizó 1 semana antes de la inoculación por peletización a las semillas.
- ✗ Al cabo de los 7 días de la inoculación del soporte se realizó el conteo de células en el inoculo mediante el método de diluciones cuantitativas.

### Metodología para el segundo objetivo

- ✗ Características morfológicas y biomasa.



- ✗ Componentes del rendimiento.
- ✗ Contenido de nitrógeno total.

### Metodología para el tercer objetivo

- ✗ Análisis químico
- ✗ Análisis físico
- ✗ Análisis microbiológico



## RESULTADOS

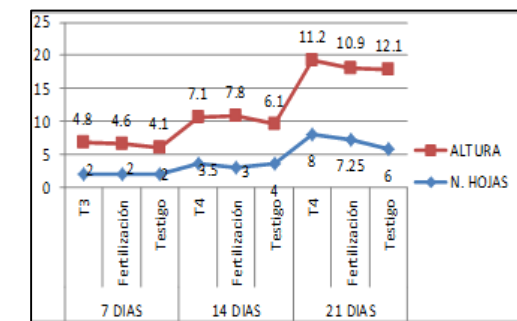
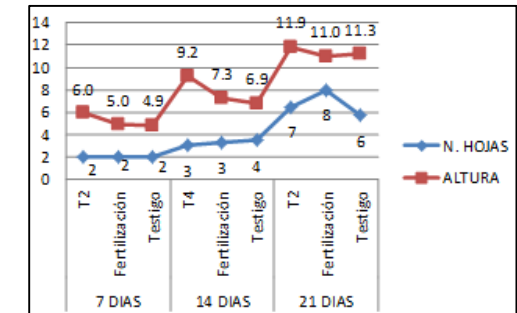


Figura 1-2. Caracterización morfológica y biomasa en fréjol rojo y fréjol negro respectivamente, en el sector Moraspamba, Loja.

**Anexo 25. Análisis del % de Nitrógeno y % de Proteína Bruta en fréjol rojo y fréjol negro.**



**SEIDLaboratory Cia. Ltda.**  
SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

MEMBER ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION



LABORATORIO Nº 2102-DU-02

Organismo de Acreditación Ecuatoriana



LABORATORIO DE ENSAYOS Nº OAE LA TE 0001

---

**INFORME DE ENSAYO NR. 72173**

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente  
como: **FREJOL ROJO (T1)**

CÓDIGO LABORATORIO: **72173- 1**  
TIPO DE PRODUCTO: **FREJOL ROJO (T1)**  
CLIENTE: **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
DIRECCIÓN: **AV. P.O. JARAMILLO ALVARADO S/N**

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: **FUNDA DE PAPEL CERRADA**  
NÚMERO DE LOTE: **ND**  
FECHA RECEPCIÓN: **13/11/01**  
FECHA INICIO ENSAYO: **13/11/01**  
CONTENIDO DECLARADO: **ND**  
CONTENIDO ENCONTRADO: **204.8 g**  
FECHA DE ELABORACIÓN: **ND**  
FECHA DE CADUCIDAD: **ND**  
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: **Temperatura 22 ° C Humedad relativa 43 %**  
FORMA DE CONSERVACIÓN: **AMBIENTE**  
MUESTREO: **ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE**

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Proteína P= 5.25	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	20.65
Nitrógeno	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	3.34

NS: No solicita el cliente/ ND: No declara

Datos tomados del cuaderno de FQ 52 Pág. 35B

Los resultados expresados en este informe sólo son válidos para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensible a cualquier lote.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra.

Atentamente, 13/11/01  
PCWA ZM/SAC



Dra. Milena V. Rucza  
Directora de Calidad  
Director Técnico (E)

Página 1 de 4

---

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio:  
Muestras perecibles: 8 días hábiles. Muestras no perecibles: 30 días hábiles. Si existe reacción de alguna sustancia, la fecha general vale en función al período señalado.

Malchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth  
Telfs.: 248 3145 / 280 8849 / 247 6314. Telefax: 280 8825 www.seidlaboratory.com



SEIDLaboratory Cia. Ltda.

SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

LABORATORIO Acreditado bajo Norma ISO/IEC 17025

laboratorio acreditado por  
Asociación Venezolana de Laboratorios Acreditados - Dependencia de Autorización Internacional



Certificado N° 2102-01-002



LABORATORIO DE  
ENSAYOS  
N° 0400 18 10 00 001

### INFORME DE ENSAYO NR. 72173

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente  
como: FREJOL ROJO (T2)

CODIGO LABORATORIO: 72173- 3  
TIPO DE PRODUCTO: FREJOL ROJO (T2)  
CLIENTE: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
DIRECCION: Av. P.O. JARAMILLO ACORADO SM

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: FUNDA DE PAPIO CERRADA  
NUMERO DE LOTE: ND  
FECHA RECEPCION: 13/11/01  
FECHA INICIO ENSAYO: 13/11/01  
CONTENIDO DECLARADO: ND  
CONTENIDO ENCONTRADO: 190 g  
FECHA DE ELABORACION: ND  
FECHA DE CADUCIDAD: ND  
CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: Temperatura 22 °C Humedad relativa 43 %  
FORMA DE CONSERVACION: AMBIENTE  
MUESTREO: ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Proteina F= 6.25	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	21.44
Nitrogeno	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	3.43

NS: No solicita el cliente NO: No declara

Datos tomados del cuaderno de FD 62 Pág. 35B

Los resultados expresados arriba serán válidos solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivo a cualquier lote.

Este informe será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico.

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atentamente,

13/11/08  
FECHA ENVIO

  
Dra. María Vinuesa  
Director de Calidad  
Director Técnico (E)

Página 3 de 4

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio  
Muestra seca/mojar 3 días calendario. Muestra rehidratada 20 días calendario. Si desea obtener un certificado de origen/valoración, en forma general una vez emitido el informe verificado.

Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth  
Telfs.: 248 3145 / 280 8849 / 247 6314 Telefax: 280 8825 - www.seidlaboratory.com





SEIDLaboratory Cia. Ltda.

SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

LABORATORIO ACREDITADO ISO 17025 NORMA ISO/IEC 17025

Laboratorio acreditado por  
American Association for Laboratory Accreditation - Organismo de Acreditación Ecuador



Certificado Nº 2102/01/02



LABORATORIO DE  
ENSAYOS  
Nº 008 LE Y 05401

### INFORME DE ENSAYO NR. 72173

TIPO MUESTRA: Declarada por el cliente  
como: FREJOL NEGRO (T1)

CODIGO LABORATORIO: 72173- 2

TIPO DE PRODUCTO: FREJOL NEGRO (T1)

CLIENTE: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

DIRECCION: AV. PLO JARAMILLO ALVARADO 516

CONDICION LLEGADA Y TIPO DE ENVASE: BURDA DE PAPEL CERRADA

NUMERO DE LOTE: ND

FECHA RECEPCION: 13/11/01

FECHA INICIO ENSAYO: 13/11/01

CONTENIDO DECLARADO: ND

CONTENIDO ENCONTRADO: 201.3 g

FECHA DE ELABORACION: ND

FECHA DE CADUCIDAD: ND

CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA: Temperatura 22 °C Humedad relativa 43 %

FORMA DE CONSERVACION: AMBIENTE

MUESTREO: ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Proteina F= 6.25	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	21.27
Nitrogeno	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	3.40

NS: No coincide el cliente/ ND: No declara

Datos tomados del cuaderno de FQ 62 Pág. 35B

Los resultados expresados, arriba, tienen validez solo para la muestra analizada en condiciones especificas no siendo extensivo a cualquier lote.

Este informe no será reproducido, ni usado en su totalidad sin la aprobación del Director Técnico.

- Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Acontar con

13/11/08  
FECHA EMISION

Dra. María Victoria  
Directora de Calidad  
Director Técnico (E)

Página 2 de 4

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio  
Muestras especiales 6 días calendario. Muestras rutinarias 30 días calendario. Si el cliente solicita el análisis en el laboratorio, se debe generar una orden de trabajo y servicio correspondiente.

Melchor Toaza N61-63 entre Av. del Maestro y Nazareth  
Telfs.: 248 1145 / 280 8849 / 247 6314 - Telefax: 280 8825 - www.seidlaboratory.com



SEIDLaboratory Cia. Ltda.

SERVICIO INTEGRAL DE LABORATORIO

LABORATORIO CREDITADO BANCODENA - 0000017000

laboratorio acreditado por:  
Asociación Ecuatoriana de Laboratorios Acreditados - Organismo de Acreditación Ecuatoriana



Certificado N° 2100-01/02



LABORATORIO DE  
ENSAYOS  
AV. MAESTRO 63 Y N. NAZARETH

### INFORME DE ENSAYO NR. 72173

**TIPO MUESTRA:** Declarada por el cliente  
cereal) FREJOL NEGRO (T2)

**CODIGO LABORATORIO:** 72173- 4

**TIPO DE PRODUCTO:** FREJOL NEGRO (T2)

**CLIENTE:** UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**DIRECCION:** AV. PO. VIBRAMO LOJA VIBRAMO EN

**CONDICIÓN LLEGADA Y TIPO DE ENVASE:** FOLDA DE PAPEL CERRADA

**NUMERO DE LOTE:** NO

**FECHA RECEPCION:** 13/11/06

**FECHA INICIO ENSAYO:** 13/11/06

**CONTENIDO DECLARADO:** NO

**CONTENIDO ENCONTRADO:** 195.4 g

**FECHA DE ELABORACION:** NO

**FECHA DE CADUCIDAD:** NO

**CONDICIONES AMBIENTALES DE LLEGADA DE LA MUESTRA:** Temperatura 22 ° C Humedad relativa 43 %

**FORMA DE CONSERVACIÓN:** AMBIENTE

**MUESTREO:** ES RESPONSABILIDAD DEL CLIENTE

ENSAYOS FISICO-QUIMICOS	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Proteína F= 9.25	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	19.63
Nitrogeno	SEMM-FQ PROTEINA (AOAC 2001.11)	%	3.01

NS: No solicita el cliente NO: No declara

Verse totales del cuaderno de FQ 62 Pág. 35B

Los resultados expresados, están firmados solo para la muestra analizada en condiciones específicas no siendo extensivos a cualquier lote.

Este informe no será reproducido, excepto en su totalidad con la aprobación del Director Técnico

• Tiempo de almacenamiento de informes: Cinco años a partir de la fecha de ingreso de la muestra

Atestamos:

13/11/06  
FECHA EMISION


Dra. Mayra Vinuesa  
Director de Calidad  
Director Técnico (E)

Página 4 de 4

Tiempo de permanencia de las muestras en el laboratorio

Muestras perecibles: 6 días calendario; Muestras no perecibles: 30 días calendario; Si existe expiración de algún instrumento, se debe garantizar su correcto funcionamiento en el periodo de validez

Anexo 26. Primer análisis físico-químico de suelo en el sector de Moraspamba “La Argelia”



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA ECUATORIANA  
DE ASSEGURAMIENTO  
DE LA CALIDAD DEL AGRICULTIVO

**LABORATORIO DE SUELOS, FOLIARES Y AGUAS**  
**INFORME DE ANÁLISIS DE SUELO No. 281**

Via Interoceánica Km 14, Granja del MAGAP, Tumbaco - Teléfono 2372-844 - Telefáx 2372-845

Hoja 1 de 2

**Remitente de la(s) muestra(s):** Universidad Nacional de Loja  
**Propietario de la(s) muestra(s):** Sr. Francisco Guamán Díaz  
**Número Telefónico:** 0994944298/072545329  
**Email:** guamandiaz@hotmail.com  
**No. Factura:** 12870

**Fecha del informe:** 31-Jul-2013  
**Fecha de ingreso de la(s) muestra(s):** 29-Julio-2013  
**Nombre de la finca o terreno / Parroquia:** La Argelia  
**Cantón:** Loja  
**Provincia:** Loja

**RESULTADOS DEL ANÁLISIS**

No. LAB.	Método aplicado	Pot.*	Cond.*	Vol.*	Col.*		AA*								
					N*	P*	K*	Ca*	Mg*	Fe*	Mn*	Cu*	Zn*		
		pH	CE* (ds/m)	MO* (%)	(%)	(ppm)	(cmol/ Kg)	(cmol/ Kg)	(cmol/ Kg)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
2302	22/V1.1/Moraspamba	5.98	1.005	2.54	0.13	30.6	0.22	5.77	1.62	327.5	23.51	4.21	1.91		
2303	23/V1.2/Moraspamba	5.93	1.169	2.36	0.12	37.1	0.36	5.89	1.61	372.7	26.82	4.28	<1.60		
2304	24/V1.3/Moraspamba	5.95	1.083	1.34	0.07	20.3	0.26	5.64	1.57	431.6	26.07	4.34	<1.60		
2305	25/V2.1/Moraspamba	5.67	0.570	1.23	0.06	14.6	0.24	4.70	1.40	418.9	21.76	4.52	<1.60		
2306	26/V2.2/Moraspamba	5.71	0.843	1.92	0.10	35.9	0.42	6.03	1.68	820.0	28.06	5.17	2.03		
2307	27/V2.3/Moraspamba	5.46	0.848	1.53	0.08	19.9	0.25	4.85	1.47	449.8	20.92	4.49	<1.60		
2308	28/V3.1/Moraspamba	5.50	0.556	0.73	0.04	54.3	0.35	4.27	1.33	832.0	25.53	4.43	1.68		
2309	29/V3.2/Moraspamba	5.26	0.550	0.91	0.05	58.3	0.24	4.23	1.31	838.0	24.48	4.36	<1.60		
2310	30/V3.3/Moraspamba	5.39	0.712	1.85	0.09	62.8	0.36	4.15	1.27	844.0	28.61	4.29	2.01		

\* Pot.: Potenciométrico; Cond.: Conductométrico; Vol.: Volumétrico; Col.: Colorimétrico; AA: Absorción Atómica; CE: Conductividad eléctrica; MO: Materia Orgánica; N: Nitrogeno total; P: Fósforo; K: Potasio; Ca: Calcio; Mg: Magnesio; Fe: Hierro; Mn: Manganeso; Cu: Cobre; Zn: Zinc.

- Los resultados analíticos presentes en este informe corresponden exclusivamente a la muestra enviada por el cliente al laboratorio.
- Este informe puede reproducirse únicamente en su totalidad.



**LABORATORIO DE SUELOS, FOLIARES Y AGUAS**  
**INFORME DE ANÁLISIS DE SUELO No. 281**

Vía Interoccidental Km 14, Granja del MAGAP, Tumbaco - Teléfono 2372-844 - Telefax 2372-845

Hoja 2 de 2

Método aplicado	Bases			Clase textural
	No. LAB.	% A*	% Ac*	
	2302	11	37	Franco Arcilloso Limoso
	2303	15	35	Franco Arcilloso Limoso
	2304	15	37	Franco Arcilloso Limoso
	2305	13	37	Franco Arcilloso Limoso
	2306	17	37	Franco Arcilloso Limoso
	2307	13	37	Franco Arcilloso Limoso
	2308	11	41	Arcilloso Limoso
	2309	15	39	Franco Arcilloso Limoso
	2310	15	37	Franco Arcilloso Limoso

\*A: Arena; L: Limo y Ac: Arcilla

**OBSERVACIONES:**

- Los resultados se expresan en base seca.

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS - REGIÓN SIERRA**

PARÁMETRO	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (cmol/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)
BAJO	< 1.0	0 - 0.15	0 - 10	< 0.2	< 1	< 0.33	0 - 20	0 - 5	0 - 1	0 - 3
MEDIO	1 - 2.0	0.16 - 0.3	11 - 20	0.2 - 0.38	1.0 - 3.0	0.34 - 0.66	21 - 40	6 - 15	1.1 - 4	3.1 - 6
ALTO	> 2.0	> 0.31	> 21	> 0.4	> 3	> 0.66	> 41	> 16	> 4.1	> 6.1

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS - REGIÓN COSTA Y SIERRA**

pH	Ácido	Ligeramente Ácido	Prácticamente Neutro	Ligeramente Alcalino	Alcalino
	5.5	5.6 - 6.4	6.5 - 7.5	7.6 - 8.0	8.1

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS - REGIÓN COSTA Y SIERRA**

CE <sup>+</sup> ds/m	NO SALINO (NS)	SALINO (S)	MUY SALINO (MS)
	< 2.0	2.0 - 4.0	4.0 - 8.0



Ing. Anabel Jaramila-Chamba  
**RESPONSABLE TÉCNICO**

- Los resultados analíticos presentes en este informe corresponden exclusivamente a la muestra enviada por el cliente al laboratorio.
- Este informe puede reproducirse únicamente en su totalidad.

Anexo 27. Segundo análisis físico-químico de suelo en el sector de Moraspamba "La Argelia"



LABORATORIO DE ANALISIS FISICO-QUIMICO DE SUELOS, AGUAS Y BROMATOLOGIA  
AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

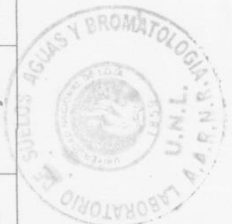
Provincia:	Loja	FECHA DE INGRESO:	30 de enero de 2014
Cantón:	Loja	FECHA DE EGRESO:	06 de febrero de 2014
Parroquia:	San Sebastián	RESPONSABLE:	Klever Iván Granda Mora
Sector:	Moraspamba		

1. RESULTADOS DE ANÁLISIS

Cód. Lab.	Cód. Cam.	Análisis Mecánico % TFSA			pH	Textura	M.O %	N ppm	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ppm	K <sub>2</sub> O ppm	Ca disp. meq/100 ml	Mg disp. meq/100 ml	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	C.E. mmhos/cm
		Ao	Lo	Ac												
1299	T1	26	47.6	26.4	6.1	Fo≈FoAc	2.0	65.1	89.1	93.1	5.92	0.66	179.1	10.6	10.9	0.938
1300	T2	24	47.2	28.8	5.7	FoAc	2.9	87.9	97.6	88.6	4.44	0.67	186.1	12.5	11.2	0.606
1301	T3	23.6	44	32.4	5.5	FoAc	1.7	78.6	160.4	118.9	2.70	0.65	187.4	13.8	10.6	0.662



2. INTERPRETACIÓN DE ANÁLISIS

Cód. Lab.	Cód. Cam.	Textura	pH	M.O %	N ppm	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ppm	K <sub>2</sub> O Ppm	Ca disp. meq/ 100 ml	Mg disp. meq/ 100 ml	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	C.E. mmhos/cm
1299	T1	Franco ≈ Franco arcilloso	Ligeramente ácido	Bajo	Alto	Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto	Medio	Alto	No salino
1300	T2	Franco arcilloso	Medianamente ácido	Bajo	Alto	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Alto	Medio	Alto	No salino
1301	T3	Franco arcilloso	Medianamente ácido	Bajo	Alto	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	No salino






Ing. Omar Ojeda Ochoa Mg. Sc.  
RESPONSABLE DEL LABORATORIO

**Anexo 28.** Evidencia fotográfica





<b>Figura N°</b>	<b>Imagen</b>	<b>Descripción</b>
<b>ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE NODULACIÓN</b>		
1.		Recolección de muestras de fréjol, en el sector de Moraspamba-Loja, 19 de julio de 2012.
2.		Lavado de muestras previo al conteo de nódulos laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.
3.		secado de muestras de fréjol, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013
4.		Conteo y de nódulos en las muestras de fréjol, laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.





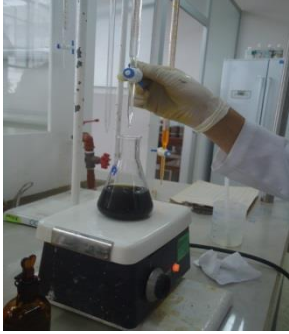
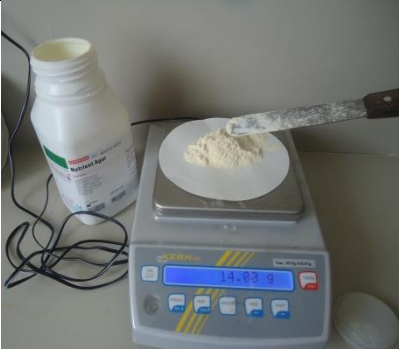



5.		<p>Pesaje de nódulos en las muestras de fréjol, laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.</p>
<b>EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS</b>		
6.		<p>Evaluación de la altura de la planta en fréjol negro, en el sector de Moraspamba-Loja, 25 de junio de 2013.</p>
7.		<p>Evaluación del número de hojas en fréjol rojo a los 7 días, en el sector de Moraspamba-Loja, 25 de junio de 2013.</p>
<b>EVALUACIÓN DE COMPONENTES DE BIOMASA</b>		
8.		<p>Zona de corte, para separar la parte foliar de la radicular en las muestras de fréjol, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.</p>



9.		<p>Enfundado e identificación de las muestras de fréjol, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.</p>
10.		<p>Ubicación de las muestras de fréjol en la estufa, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 19 de julio de 2013.</p>
<p><b>EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE RENDIMIENTO</b></p>		
11.		<p>Conteo de número de vainas por planta en fréjol rojo, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 15 de octubre</p>
12.		<p>Determinación de la longitud de vainas en fréjol rojo, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 15 de octubre de 2013.</p>
13.		<p>Peso de vainas por planta en fréjol rojo, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 15 de octubre de 2013</p>



14.		Peso de granos por vaina en fréjol negro, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 15 de octubre de 2013.
<b>TOMA DE MUESTRAS DE SUELO PARA EL RESPECTIVO ANÁLISIS.</b>		
15.		Recolección de las muestras de suelo, en el sector de Moraspamba-Loja, 15 de junio de 2013.
16.		Tamizado de muestras de suelo, Laboratorio de Suelos-Loja, 31 de enero de 2014.
<b>ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO DE SUELOS</b>		
17.		Mezcla de suelo en agitador, Laboratorio de Suelos-Loja, 03 de febrero de 2014.

18.		Obtención de pH en muestras de suelo, Laboratorio de Suelos-Loja, 03 de febrero de 2014.
19.		Obtención del extracto en bomba de vacío, Laboratorio de Suelos-Loja, 04 de febrero de 2014.
20.		Extracto empleado para la obtención de la conductividad eléctrica, Laboratorio de Suelos-Loja, 04 de febrero de 2014.
21.		Aplicación de dicromato de potasio y ácido sulfúrico a la muestra de suelo, Laboratorio de Suelos-Loja, 05 de febrero de 2014.

22.		Aplicación de la sal de Morh y viraje de color, Laboratorio de Suelos-Loja, 05 de febrero de 2014.
<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b>		
23.		Pesaje de agar nutriente, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
24.		Mezcla del reactivo para la preparación del medio de cultivo, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
25.		Elaboración dediluciones cuantitativas, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
26.		Extracción de 1 ml dedilución, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.

27.		Diluciones cuantitativas terminadas para la siembra, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
28.		Dilución en cajas petri, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
29.		Siembra de bacterias en cajas petri, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
30.		Incubación de cajas petri, Laboratorio de Biotecnología-Loja, 25 de octubre de 2013.
31.		Conteo de colonias bacterianas, Laboratorio de Sanidad Vegetal -Loja, 29 de enero de 2014.