



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

*Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables*

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL  
CRECIMIENTO VEGETAL EN FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)  
VAR. MANTEQUILLA

Tesis Previa a la Obtención del  
Título de Ingeniera Agrónomo

**AUTORA:**

*Andrea Carolina Castillo Yaguana*

**DIRECTOR:**

*Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión Mg. Sc.*

1859  
LOJA – ECUADOR

2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**CERTIFICACIÓN**

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS.**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo de investigación titulado **“EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. MANTEQUILLA”** de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica: **ANDREA CAROLINA CASTILLO YAGUANA**, ha sido desarrollada de acuerdo a las actividades de investigación establecidas, las mismas que cumplen a cabalidad 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, abril del 2016

.....  
Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión M. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Los miembros del tribunal de tesis, luego de proceder a realizar y verificar las observaciones realizadas en el trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. MANTEQUILLA**”, de la egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, Andrea Carolina Castillo Yaguana, ha sido revisada y en la misma se han incorporado todas las sugerencias, por lo que aprobamos su impresión y publicación

Loja, junio 2016

Ing. Bolívar Peña Merino  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Ing. Klever Chamba  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**

Ing. Pablo Álvarez  
**VOCAL DEL TRIBUNAL**

## AUTORÍA

Yo, Andrea Carolina Castillo Yaguana, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo 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 acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional- Biblioteca Virtual.

**Autora:** Andrea Carolina Castillo Yaguana

**Firma:**  .....

**Cédula:** 1105645111

**Fecha:** Loja, 07 de Julio de 2016

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.**

Yo, **Andrea Carolina Castillo Yaguana**, declaro ser autora de la tesis “**EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. MANTEQUILLA**”, como requisito para optar al grado de Ingeniera Agrónomo, autorizo 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 Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios puedan 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 del plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 07 días del mes de julio del dos mil dieciséis, firma la autora.

**Firma:**.....  
**Autora:** Andrea Carolina Castillo Yaguana  
**Número de cédula:** 1105645111  
**Dirección:** Loja.- La Argelia, ciudad Alegria.  
**Correo electrónico:** andreccy92@hotmail.com  
**Celular:** 0982975887

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director de Tesis:** Ing. Agr. Ángel Robles Carrión, Mg. Sc.  
**Tribunal de Grado:** Ing. Simón Bolívar Peña Merino, Mg. Sc.  
Ing. Klever Chamba, Mg. Sc.  
Ing. Pablo Alvarez, Mg. Sc.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios, a la Virgen y a mi familia por ser mi guía y haberme iluminado siempre mi camino.

A la Universidad Nacional de Loja, a la Carrera de Ingeniería Agronómica, así como a todos los docentes que depositaron sus conocimientos y experiencias, contribuyendo en mi formación profesional.

Además mi agradecimiento especial para el Ing. Klever Iván Granda Mora, Director inicial de tesis y al Ing. Ángel Robles Carrión, Director de la tesis, quienes con su gran conocimiento, paciencia, responsabilidad aportaron para el desarrollo de la investigación.

Al Coordinador de la Carrera de Ingeniería Agronómica Ing. Edmigio Valdivieso Caraguay, por su apoyo y sus consejos, brindados a lo largo del proceso de formación profesional.

A mis amigos y amigas por el apoyo, cariño, aprecio y apoyo brindado.

**Andrea Carolina**

## **DEDICATORIA**

Dedico a Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida, por los triunfos y por el logro de poder culminar mi carrera.

A mis padres Bethy Yaguana y Angel Castillo por su apoyo incondicional, sacrificio, apoyo, amor, amistad y confianza en todo momento para finalizar mis estudios. A mis hermanos Karen y Bryan con mucho amor y que este logro sea ejemplo para ellos.

A mi abuelita Grimaneza Díaz, tíos, tías, primos y primas quienes me han apoyado en todo momento y contribuyeron a mi formación profesional.

A mis amigos y docentes que me brindaron todo el apoyo cuando lo necesitaba y poder culminar exitosamente mi formación profesional.

**Andrea Carolina**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página.
PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN .....	ii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Generalidades e importancia de las leguminosas.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 El cultivo de fréjol.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Clasificación taxonómica .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Requerimientos edafo-climáticos .....</b>	<b>5</b>
<b>2.5 Descripción Botánica .....</b>	<b>6</b>
<b>2.6 Fréjol Variedad Mantequilla .....</b>	<b>7</b>
<b>2.7 Rendimiento .....</b>	<b>8</b>
<b>2.8 Importancia del nitrógeno .....</b>	<b>8</b>
<b>2.9 Fijación biológica del nitrógeno.....</b>	<b>9</b>
<b>2.10 Características generales de las Rizobacterias .....</b>	<b>10</b>
<b>2.10.1 Género <i>Sphingomonas</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>2.10.2 Género <i>Rhizobium</i> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.10.3 Género <i>Azotobacter</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.10.4 Género <i>Stenotrophomonas</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>2.10.5 Género <i>Ralstonia</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1 Ubicación Política .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2 Ubicación Geográfica.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.3 Ubicación ecológica .....</b>	<b>15</b>



<b>3.2 MATERIALES</b> .....	15
<b>3.3 METODOLOGÍA</b> .....	16
<b>3.3.1 Metodología para el primer objetivo:</b> .....	16
<b>3.3.2 Metodología para el segundo objetivo</b> .....	17
<b>3.3.3 Metodología para el tercer objetivo</b> .....	18
<b>3.3.4 Metodología para el cuarto objetivo</b> .....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	21
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	38
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	42
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	43
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	44
<b>9. ANEXOS</b> .....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Rizobacterias utilizadas en la producción de AIA y solubilización de fósforo. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Producción de AIA de las rizobacterias.....	21
<b>Tabla 3.</b> Aislados bacterianos con capacidad de solubilizar fosforo inorgánico en medio Pikovskaya. ....	22
<b>Tabla 4.</b> Número de raíces en semillas de frejol mantequilla inoculadas con rizobacterias .....	23
<b>Tabla 5.</b> Longitud de las raíces de frejol mantequilla inoculadas con rizobacterias.....	24
<b>Tabla 6.</b> Contenido de nitrógeno total en grano seco de fréjol mantequilla. ....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de nódulos a los 30 DDS .....	26
<b>Figura 2.</b> Peso fresco de nódulos a los 30 DDS .....	27
<b>Figura 3.</b> Peso seco de nódulos a los 30 DDS .....	28
<b>Figura 4.</b> Peso fresco de la raíz a los 30 DDS.....	28
<b>Figura 5.</b> Peso seco de la raíz a los 30 DDS .....	29
<b>Figura 6.</b> Peso fresco del follaje a los 30 DDS .....	30
<b>Figura 7.</b> Peso seco del follaje a los 30 DDS .....	30
<b>Figura 8.</b> Número de nódulos a los 30 DDS .....	32
<b>Figura 9.</b> Peso fresco de los nódulos a los 30 DDS .....	32
<b>Figura 10.</b> Peso fresco de los nódulos a los 30 DDS.....	32
<b>Figura 11.</b> Peso fresco de la raíz a los 30 DDS.....	33
<b>Figura 12.</b> Peso seco de la raíz a los 30 DDS.....	33
<b>Figura 13.</b> Peso fresco del follaje a los 30 DDS .....	34
<b>Figura 14.</b> Peso seco del follaje a los 30 DDS.....	34
<b>Figura 15.</b> Peso de vainas por planta a los 120 DDS .....	35
<b>Figura 16.</b> Peso de granos por planta a los 120 DDS.....	36
<b>Figura 17.</b> Rendimiento agrícola .....	36

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Evaluación de parámetros morfológicos en frejol mantequilla en invernadero.	25
<b>Cuadro 2.</b> Comparación de tratamientos respecto a los parámetros morfológicos en frejol mantequilla en campo.....	31

**“EVALUACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO  
VEGETAL EN FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. MANTEQUILLA”**

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre parámetros morfológicos, de nodulación, biomasa y rendimiento agrícola en frejol variedad mantequilla bajo condiciones *in vitro*, condiciones controladas y campo.

Para condiciones controladas se empleó un diseño experimental totalmente aleatorizado con 9 tratamientos y 10 réplicas, las cepas utilizadas fueron obtenidas de las condiciones *in vitro* así como las cepas que mayor cantidad de AIA produjeron y las cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico, más un tratamiento con fertilización química (urea) y un control sin inoculación ni fertilización, antes de la siembra se elaboró el inoculo. Para condiciones en campo se empleó un diseño experimental de bloques al azar con 5 tratamientos y 4 réplicas, se utilizó las mejores interacciones de las cepas obtenidas en condiciones controladas, además de un tratamiento con fertilización química (urea) y un control absoluto, antes de la siembra se elaboró el inoculo, para posteriormente realizar la peletización en las semillas.

Para la evaluación de los parámetros morfológicos y de biomasa se tomó la planta de cada maceta por tratamiento en condiciones controladas, a los 8, 15, 21 y 28 días después de la siembra (DDS) se evaluaron la altura y número de hojas, a los 30 DDS se continuaron con los parámetros de nodulación: número de nódulos (NN), peso fresco y peso seco de los nódulos (PFN, PSN), así como los parámetros de biomasa: peso fresco y peso seco del follaje (PFF, PSF), peso fresco y peso seco de la raíz (PFR, PSR). Para evaluar parámetros morfológicos, de biomasa y componentes de rendimiento en condiciones de campo se seleccionaron 5 plantas al azar de cada réplica, en los 15, 21 y 28 DDS se evaluaron la altura de plantas y número de hojas, a los 30 DDS se continuaron con los parámetros de nodulación: número de nódulos (NN), peso fresco y peso seco de los nódulos (PFN, PSN), así como los parámetros de biomasa: peso fresco y peso seco del follaje (PFF, PSF), peso fresco y peso seco de la raíz (PFR, PSR). Finalmente a los 120 DDS se evaluaron los componentes del rendimiento: 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) y para el rendimiento agrícola se tomó 40 plantas por parcela extrapolando a  $Tm\ ha^{-1}$ .

De manera general las cepas *Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*, *Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.* y *Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici* influenciaron significativamente los parámetros de nodulación y biomasa, así mismo las cepas *Ralstonia sp.*+*Rhizobium miluonense* en componente de rendimiento agrícola. Estos resultados valorizan el potencial de las cepas de las rizobacterias para su utilización como biofertilizantes y elevar las tasas de fijación de nitrógeno en el cultivo de frejol común.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate plant growth promoting rhizobacteria on morphological parameters, nodulation, biomass and crop yield in butter bean variety under *in vitro* conditions, controlled and field conditions.

For controlled conditions employed an experimental design completely randomized design with 9 treatments and 10 replicates, the strains used were obtained from the *in vitro* conditions and strains as much AIA produced and strains had the ability to solubilize inorganic phosphorus, more treatment with chemical fertilizer (urea) and a control without inoculation and fertilization before planting the inoculum was prepared. For field conditions an experimental design of randomized blocks was used with 5 treatments and 4 replicates, the best interactions strains obtained under controlled conditions was used in addition to treatment with chemical fertilizer (urea) and absolute control before seeding inoculum was developed, later to make the pelletizing seeds.

For the evaluation of morphological parameters and biomass plant in each pot was taken for treatment under controlled conditions, at 8, 15, 21 and 28 days after sowing (DAS) height and number of leaves were evaluated to 30 DDS continued with the parameters of nodulation: number of nodules (NN), fresh weight and dry weight of nodules (PFN, PSN) and parameters of biomass: fresh weight and dry weight of foliage (PFF, FHP), fresh and dry weight of the root (PFR, PSR). To evaluate morphological parameters, biomass and yield components under field conditions 5 floors are randomly selected from each replicate, in the 15, 21 and 28 DDS plant height and number of leaves were evaluated at 30 DDS they were continued with the parameters of nodulation: number of nodules (NN), fresh weight and dry weight of nodules (PFN, PSN) and parameters of biomass: fresh weight and dry weight of foliage (PFF, PSF), fresh weight and root dry weight (PFR, PSR). Finally 120 DDS yield components were evaluated: number of grains per plant (NGP), weight of pods per plant (PVP), number of pods per plant (NVP) and weight of grains per plant (PGP) and the agricultural yield 40 plants per plot extrapolating took  $Tm\ ha^{-1}$ .

Generally strains *Stenotrophomonas maltophilia* + *Rhizobium tropici*, *Ralstonia* sp. + *Rhizobium* sp. and *Stenotrophomonas maltophilia* + *Rhizobium tropici* significantly influenced the parameters of nodulation and biomass, also *Ralstonia* strains *Rhizobium* sp + *Agicola miluonense* in component performance. These results valued potential rhizobacteria strains for use as biofertilizer and raise rates of nitrogen fixation in common bean cultivation.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, leguminosas como el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) constituyen un alimento básico para el consumo humano directo, no solamente por el aporte de proteínas y minerales, sino a la vez por la superficie cultivada que garantiza la seguridad y soberanía alimentaria. El área cultivada de este grano en el país supera las 13.685 ha año<sup>-1</sup> (INEC, 2014). *Phaseolus* es una especie anual que pertenece a la familia de las Fabaceae antiguamente conocidas como leguminosas cuya propiedad es fijar el nitrógeno atmosférico a través de la absorción simbiótica planta-bacteria.

A pesar de la importancia de este cultivo para el país, los estudios relacionados con la interacción de rizobacterias-fréjol común para incrementar los rendimientos agrícolas mediante esta asociación son muy escasos (Bernal, 2004).

Por tal razón, es importante que por medio de la inoculación de cepas eficientes de rizobacterias, se logre el incremento de las tasas de fijación de nitrógeno para *P. vulgaris* (Alarcón y Ferrera, 2000). Las rizobacterias de manera general son el grupo más importante de organismos del suelo, en el cual, en condiciones favorables alcanzan números extraordinariamente elevados (100 millones de bacterias gramo de suelo<sup>-1</sup>); estas desempeñan un papel importante en la descomposición de residuos orgánicos y en la formación de humus que tienen como objetivo mejorar la calidad de los suelos, promover el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos y a la par disminuyendo las poblaciones de microorganismos inductores de enfermedades (Morales, 2010).

En general, los efectos positivos de los microorganismos en el suelo están enmarcados en el mejoramiento de las características físicas y biológicas; en el primer aspecto 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, lo que genera las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen (Sánchez *et al.*, 2011).



Debido a que, en el Ecuador las investigaciones relacionadas con esta temática son muy escasas, se consideró conveniente llevar a cabo la presente investigación bajo condiciones controladas y en campo, mediante la co-inoculación de rizobacterias en interacción con fréjol común y determinar el efecto que puedan ejercer estos microorganismos en el desarrollo y crecimiento de este cultivo, con ello sirva de información valiosa para la selección de cepas eficientes en el desarrollo de biomasa radicular, foliar y fijación de nitrógeno y esto sea una alternativa viable como inoculantes biológicos para reducir costos de producción y el impacto ambiental asociado a la fertilización química, así como incrementar la fertilidad del suelo, valor agregado y rendimiento agrícola; razón por la cual se formularon los siguientes objetivos en esta investigación:

- Valorar la producción de ácido indól acético (AIA) y solubilización de fósforo de las rizobacterias.
- Determinar en condiciones *in vitro* el efecto de las cepas rizobacterianas sobre plántulas de fréjol común.
- Identificar el efecto de los aislados rizosféricos en parámetros de nodulación, biomasa, fijación de N en el cultivo de fréjol bajo condiciones controladas.
- Determinar el efecto de los mejores aislados, sobre parámetros morfológicos, biomasa, componentes de rendimiento y rendimiento agrícola en fréjol común bajo condiciones de campo.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Generalidades e importancia de las leguminosas**

Las leguminosas (leguminosae, fabaceae) constituyen un gran grupo de organismos vegetales, dentro de los que se destacan árboles, arbustos, hierbas y enredaderas, la familia leguminosae es la tercera familia más grande de las plantas con flores con distribución en todo el mundo (Contreras *et al.*, 2007). Existen 7.000 géneros y 14.000 especies de leguminosas y lo más probable es que se usen solo 100 leguminosas importantes para la agricultura, pero no se han analizado todas para establecer su capacidad de fijar nitrógeno (Romero, 2009).

Esta diversidad permite una notable adaptabilidad genética; por ello, cada región con sus características pedoclimáticas específicas puede cultivar una o varias especies de leguminosas con éxito (Lafarga y Delgado, 2007), su nombre deriva del latín legumen (semilla con vaina) y presentan una importancia particular en la alimentación humana (granos) y animal (forraje), además de ser fuente de maderas tropicales valiosas, drogas para la medicina, plantas ornamentales, resinas, al igual que en la economía del nitrógeno del suelo (Contreras *et al.*, 2007).

Dentro de las leguminosas el fréjol común por la superficie cultivada, es la tercera leguminosa más importante a nivel mundial, superado solamente por la soya (*Glycine max* L. Merr) y el maní (*Arachis hipogea* L.) (Cevallos, 2008). Su importancia radica por el alto contenido de carbohidratos, principalmente en forma de almidón como fuente de energía, por su contenido de fibra dietética, especialmente fibra soluble, y por el aporte de proteína, lípidos, así como de minerales y vitaminas (Silva, 2007). Además, esta leguminosa constituye un complemento nutricional al consumo de los cereales, especialmente del maíz (Pérez *et al.*, 2002).

### **2.2 El cultivo de fréjol**

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) se desarrolla en climas cálidos y templados, bajo condiciones ecológicas muy variables, de las cuales ha resultado la selección y desarrollo de una gran cantidad de genotipos cultivados con características muy

diferentes. Esta especie es sensible a la humedad ambiental, pues le afecta el frío y los cambios bruscos de temperatura; no es muy exigente en cuanto al suelo, es altamente susceptible a enfermedades, las mismas que limitan la productividad, especialmente en los trópicos (Mazón, 2009).

La importancia de este producto también radica en que la comercialización se realiza a nivel de pequeños productores, lo que amplía el incentivo para el cultivo y mejora su calidad de vida (Peralta, 2011).

El fréjol, por disponer aproximadamente un 22% de proteínas, es considerado importante componente básico en la alimentación, es relativamente económico si se lo compara con las proteínas de origen animal, especialmente la carne. Además, es una leguminosa que mejora los suelos debido a las bacterias nitrificantes que se adhieren a las raíces (Bitocchi y Nanni, 2011).

Es cultivada por sus vainas verdes, granos tiernos y granos secos, en algunos países de Latinoamérica y África se consumen las hojas y flores jóvenes y tiernas como vegetales frescos. Además, las hojas verdes, los tallos y las vainas son alimento para el ganado, al igual que los rastrojos de las plantas secas que son usados también como abono para aumentar la materia orgánica del suelo (Rodiño, 2000).

En Ecuador, el cultivo de fréjol es un componente de los sistemas de producción, principalmente en la Región Sierra, ya que son cultivados en asociación, intercalados, en monocultivo o en rotación con otros cultivos del sistema. La producción de esta leguminosa genera trabajo, empleo, alimento e ingresos económicos a pequeños, medianos y grandes agricultores, que tratan de satisfacer la demanda interna y externa y de la agroindustria artesanal o convencional (Peralta, 2011).

### **2.3 Clasificación taxonómica**

Según Valladares (2010), la clasificación taxonómica del fréjol se detalla de la siguiente manera:

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	Fabales
<b>Familia:</b>	Fabaceae
<b>Subfamilia:</b>	Faboideae
<b>Tribu:</b>	Phaseoleae
<b>Género:</b>	<i>Phaseolus</i>
<b>Especie:</b>	<i>P. vulgaris</i>
<b>Nombre científico:</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

**Nombres comunes:** fréjol, fríjol, poroto, habichuela, judía, ejote, lobia.

#### 2.4 Requerimientos edafo-climáticos

(Robles, C. 2008), sostiene que el fréjol prospera en climas fríos y cálidos, tiene variedades trepadoras y arbustivas. Se cultiva en suelos no muy salinos, con índice medio de lluvias. El mismo autor menciona que esta planta se cultiva en lugares donde el calor del sol llegue al tallo de la planta. Aunque admite una amplia gama de suelos, los más indicados son los suelos ligeros, de textura francos arcillosos y los francos arenosos, con buen drenaje y ricos en materia orgánica. En suelos fuertemente arcillosos, muy calizos y demasiado salinos vegeta deficientemente, siendo muy sensible a los encharcamientos, de forma que un riego excesivo puede ser suficiente para dañar el cultivo, quedando la planta de color pajizo y achaparrado.

(Arias *et al.*, 2007) afirma que el papel más importante de la luz está en la fotosíntesis, pero también afecta la fenología y morfología de la planta. El fréjol es una especie de días cortos, los días largos tienden a causar demora en la floración y la madurez. Cada hora más de luz por día puede retardar la maduración de dos a seis días. Los factores climáticos como la temperatura y la luminosidad no son fáciles de modificar, pero es posible manejarlos, se puede recurrir a prácticas

culturales, como la siembra en las épocas apropiadas, para que el cultivo tenga condiciones favorables.

## **2.5 Descripción Botánica**

En la primera etapa de desarrollo su sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. A los pocos días de emerger la radícula es posible ver las raíces secundarias, que se desarrollan especialmente en la parte superior o cuello de la raíz principal. Sobre las raíces secundarias se desarrollan las raíces terciarias y otras subdivisiones como los pelos absorbentes, los cuales, además se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. En general, el sistema radical es superficial, ya que el mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 20 cm de profundidad del suelo (CIAT, 2012).

Valladares (2010) considera que el tallo puede ser identificado como el eje central de la planta, el cual está formado por la sucesión de nudos y entrenudos. El tallo tiene generalmente un diámetro mayor que las ramas y puede ser erecto, semiprostrado o prostrado, según el hábito de crecimiento de la variedad. De acuerdo a su forma y su hábito de crecimiento, los cultivares se agrupan en dos tipos: los de crecimiento determinado y los de crecimiento indeterminado. Los tipos de crecimiento determinado se ramifican más, la altura total de la planta es menor (30 - 90 cm) y al comenzar la floración cesa el desarrollo de la misma.

Los de crecimiento indeterminado son los trepadores, que tienen la capacidad de seguir desarrollándose después de la floración. Debido a esta circunstancia, la altura de sus tallos puede variar desde los 50 cm hasta los 3 m. El primer par de hojas, que se origina a partir de los cotiledones, es opuesto y de forma acorazonada. Las hojas definitivas las forman tres folíolos, el central es ovoide y simétrico y los laterales, asimétricos. El tamaño varía con el cultivar y las condiciones de cultivo (Andino 2011).

Las hojas del fréjol son de dos tipos: simples y compuestas, y están insertadas en los nudos del tallo, se forman en la semilla durante la embriogénesis y caen antes de que la planta esté completamente desarrollada. Las hojas compuestas trifoliadas son las hojas típicas del fréjol, tienen tres folíolos, un peciolo y un raquis. En la inserción de las hojas trifoliadas hay un par de estipulas de forma triangular que siempre son visibles (Andino, 2011).

Las flores están organizadas en racimos, situados en las axilas de las hojas, y su color varía del blanco al morado. Aunque el fréjol produce menos flores que otras leguminosas, como la soya, cuajan en mayor proporción. Las flores, hermafroditas y completas, comienzan a desarrollarse por la parte inferior de la planta. Puesto que suelen autofecundarse, los cultivares se pueden multiplicar por semilla, sin perder las características genéticas de la planta madre a medio plazo (Araujo, 2008).

Puesto que el fruto es una vaina esta especie se clasifica como leguminosa; las vainas pueden ser de diversos colores, uniformes o con rayas, dependiendo de la variedad. Dos suturas aparecen en la unión de las valvas: la sutura dorsal, llamada placentar, y la sutura ventral. Los óvulos, que son las futuras semillas, alternan en la sutura placentar de la semilla del fréjol (CIAT, 2012).

## **2.6 Fréjol Variedad Mantequilla**

El fréjol mantequilla tiene una altura de 0,6 a 1.0 m., volviéndose duro en la madurez; hojas trifoliadas, folíolos grandes, ovalados a elíptico muy acuminados en el ápice, hasta 20 X 10 cm. glabros, verdes oscuros, brillantes, nervaduras bien marcadas; inflorescencia colgante, hasta 30 cm de largo, con 10-20 flores en abultamientos; flores grandes de 2,5 cm de largo, de color violáceo, rosado o blanco con base roja, cáliz tubulosos con los dientes muy desiguales, estandarte hasta 2,8 cm de largo, quilla recurvada hacia arriba; fruto hasta 30 X 3,5 cm ensiforme, aplastado, algo recurvado, rostrado, con 2 o 3 costillas longitudinales seca de la sutura superior, indehiscente; semillas en un número de 12-20, oblongas a redondas, algo aplastadas, 15 mm, lisas, blancas con un hilo largo de color café rodeado de una zona de color castaño. (Cueva 2007).

## **2.7 Rendimiento**

Según INEC (2014), la superficie sembrada de fréjol en cultivo solo fue de 13.685 ha. El promedio nacional de producción por hectárea de fréjol es de 1,09 t ha<sup>-1</sup>.

Según ESPAC (2014), la producción a nivel nacional de fréjol tierno fue de 17, 860 t lo que aumentó en un 61.88% respecto al año 2013, a pesar del descenso de la superficie cosechada en 23.14% con respecto al mismo periodo. Este comportamiento se debió directamente al incremento notable de los niveles de rendimiento.

Para el año 2014 la producción de fréjol seco a nivel nacional fue de 12, 607 t lo que aumentó en un 17.01% respecto al año 2013, mientras que la superficie cosechada se redujo en 19.14% con respecto al mismo periodo. Este comportamiento se debió al incremento del rendimiento en 44.71% respecto al año 2013 (0.47t ha<sup>-1</sup>).

## **2.8 Importancia del nitrógeno**

El nitrógeno es uno de los elementos minerales de mayor importancia en el metabolismo de los seres vivos. Sin embargo, a pesar que este elemento existe en cantidades apreciables en la atmósfera terrestre, la mayor parte de los suelos de la tierra responden a la fertilización nitrogenada; en especial en los trópicos donde la temperatura y la precipitación causan grandes pérdidas de este elemento (Bauer, 2001). Afortunadamente, existe un buen número de microorganismos, que en forma libre o asociadas a plantas superiores son capaces de fijar el nitrógeno elemental de la atmósfera en forma de amoníaco (Bauer, 2001).

El nitrógeno (N) es considerado el nutriente más importante para la producción vegetal por las cantidades requeridas por los cultivos y por la frecuencia con que se observan deficiencias en suelos agrícolas, es así que la agricultura de altos rendimientos depende del uso de fertilizantes nitrogenados. Las condiciones económicas del sector agropecuario tanto a nivel mundial como nacional y la necesidad de preservar el ambiente, básicamente los recursos suelo, agua y atmósfera, requieren del uso más eficiente de los nutrientes. Para maximizar la eficiencia de uso de N debemos conocer la dinámica del nutriente en el sistema

suelo-plant-atmósfera y como el manejo de suelos y cultivos afecta esta dinámica (Antón, 2004).

El suministro de nitrógeno (N) al suelo no es suficiente para compensar su creciente demanda por las plantas y organismos vivos que habitan en este planeta, haciéndose necesaria la aplicación de algún fertilizante nitrogenado (Beever *et al.*, 2007). Sin embargo, esta estrategia puede producir una creciente contaminación ambiental donde se ven afectados todos los factores actuantes, ya sean bióticos como abióticos (Urzua *et al.*, 2001).

El N es un componente esencial en sustancias básicas para la vida, tales como ácidos nucleicos y la conformación de proteínas (Harrison, 2003), por lo que el cultivo de plantas con capacidad para incorporar este elemento tanto a su metabolismo como para el adecuado comportamiento del ciclo del N en la biosfera es de vital importancia. Las plantas pertenecientes a la familia leguminosa (Fabaceae) son unas de las máximas responsables del equilibrio del N en los ecosistemas (Broughton *et al.*, 2003). Estas son capaces de realizar el proceso de fijación biológica del N (FBN) mediante la estrecha relación con bacterias del suelo comúnmente conocidas como rizobios (Weir, 2006).

## **2.9 Fijación biológica del nitrógeno**

El nitrógeno es uno de los elementos químicos esenciales para todos los seres vivos ya que forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas y, por lo tanto, es fundamental en la estructura y el metabolismo celular (Boström, 2006). Las plantas toman el nitrógeno directamente desde el suelo en forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), algo que no pueden hacer los animales, que precisan tomarlo en forma de compuestos orgánicos. Sólo algunos procariontes pueden tomar el nitrógeno directamente desde la atmósfera, vía fijación de nitrógeno, convirtiendo el nitrógeno molecular en nitrógeno asimilable por otros seres vivos (Boström, 2006).

Teniendo en cuenta que este elemento es muy abundante en la atmósfera (78.084 %), la obtención de nitrógeno directamente desde ésta es una de las vías más importantes para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, del que forman parte las



bacterias fijadoras de nitrógeno, junto con otros grupos de bacterias que llevan a cabo procesos intermedios de transformación de compuestos nitrogenados y de desnitrificación, que devuelve finalmente el nitrógeno a la atmósfera (Beever *et al.*, 2007).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) consiste en la reducción de gas N<sub>2</sub> a una molécula biológicamente disponible para plantas y microorganismos en forma de amonio, el cual es luego asimilado a moléculas orgánicas (Beever *et al.*, 2007). El nitrógeno, por su parte, se considera uno de los principales elementos reguladores de la producción primaria en los estratos superficiales y subsuperficiales de la mayoría de los sistemas marinos.

La fijación biológica es altamente demandante de energía. En los sistemas de fijación simbiótica, como los de *Rhizobium*-leguminosa, esta energía proviene del sol, vía fotosíntesis realizada por la planta; mientras que los fijadores de vida libre como *Azospirillum*, *Azotobacter* y otros deben extraer la energía de la materia orgánica del medio, que no siempre abunda (Abela, 2010). Se estima que los sistemas simbióticos fijan entre 75 y 300 kg de N ha por año, mientras que los no simbióticos no superarían los 15 kg de N por ha. 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, 2010).

## **2.10 Características generales de las Rizobacterias**

Las rizobacterias son un tipo de bacteria procariotas que colonizan las raíces de algunas plantas en una relación simbiótica beneficiosa para ambas partes (mutualismo). Las rizobacterias de mayor interés para la agricultura son las fijadoras de nitrógeno, que se estima proveen el 65% de los requerimientos de este nutriente por los cultivos mundiales. (INTA, 2011)

Las rizobacterias y otros microorganismos de suelo han sido estudiados como posibles reemplazantes de químicos. Estas rizobacterias, conocidas colectivamente

como PGPR, son microorganismos de suelo e incluyen especies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* entre otras (Glick, 2007).

Estas PGPR afectan el crecimiento de la planta de forma directa o indirecta. En cuanto a la promoción directa, las PGPR pueden: fijar nitrógeno; producir sideróforos, que solubilizan y secuestran el hierro del suelo y lo proveen a la planta; sintetizar distintas fitohormonas, que actúan en varias etapas del crecimiento de los vegetales; pueden tener mecanismos para la solubilización de minerales, tales como el fósforo; producir la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminasa, que hidroliza el ACC (un precursor del etileno) y por lo tanto disminuye los niveles de etileno en las plantas en desarrollo; y/o sintetizar compuestos volátiles como acetoina y el 2,3-B, que estimulan el crecimiento de la planta. (Ping *et al.*, 2004).

Los estímulos indirectos, incluyen una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe el crecimiento de los microorganismos fitopatógenos entre ellos, la producción y secreción de sideróforos, que secuestra el hierro disponible en la rizósfera y como resultado previene que cualquier patógeno vecino prolifere debido a la falta de hierro; la producción de un amplio rango de compuestos antimicrobianos (Ongena *et al.*, 2005); de cianuro de hidrógeno, que inhibe algunos hongos; la hidrólisis de ácido fusárico, que es el agente causante de daños en plantas infectadas con *Fusarium* e hidrólisis de la pared celular de hongos patógenos (Glick, 1995; Lugtenberg *et al.*, 2004); la competencia por nutrientes y nichos convenientes en la superficie de la raíz (Bais *et al.*, 2004; Timmusk *et al.*, 2005); la activación de sistemas de defensa del hospedador mediante resistencia sistémica inducida (Ongena *et al.*, 2005).

Aunque se ha demostrado la contribución de las rizobacterias en varios cultivos importantes, los mecanismos incluidos en la estimulación son todavía difíciles de encontrar en la mayoría de los casos (Sun *et al.*, 2008). Recientemente se ha

reportado que las bacterias endófitas pueden promover el desarrollo de la planta y eliminar las enfermedades de estas, probablemente de manera similar a como lo hacen las rizobacterias que promueven el desarrollo de la planta (PGPR) (Lugtenberg *et al.*, 2009). Martínez-Viveros *et al.* (2010) reportan que las PGPR realizan la promoción del desarrollo de las plantas mediante la producción de auxinas, citoquininas y giberelinas. Estos reguladores de crecimiento (PGRs) son sustancias orgánicas que influyen en los procesos fisiológicos de las plantas en concentraciones extremadamente bajas. Debido a que la concentración de señales hormonales es crítica para la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, los cambios locales de los niveles de fitohormonas pueden conducir a cambios característicos en el crecimiento y desarrollo vegetal (Torres-Gutiérrez, 2008).

#### **2.10.1 Género *Sphingomonas*.**

*Sphingomonas* es un grupo de bacterias Gram negativas con forma de bacilo, quimioheterótrofas y estrictamente aerobias, por lo general pigmentadas de color amarillo, lo cual sugiere que las bacterias de este género se adaptan bien en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular y otros contaminantes aromáticos. (Xia *et al.*, 2005)

Varios trabajos reportan la presencia de *Sphingomonas* spp. sobre superficies de plantas, se ha encontrado que este género bacteriano tiene efectos benéficos para las plantas (Enya *et al.*, 2007, Fürnkranz *et al.*, 2008, Idris *et al.*, 2004), del mismo modo, los estudios han encontrado que *Sphingomonas* spp. es uno de los factores que funcionan como estimulantes en el crecimiento de las plantas (Adhikari *et al.*, 2001, Enya *et al.*, 2007, Tsavkelova *et al.*, 2006). Nascimbém en 2010 encontró que *Sphingomonas* en el sistema radicular de maíz, participa como degradadora de fosfatos.

#### **2.10.2 Género *Rhizobium***

Los *Rhizobium* son microorganismos capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en las raíces de las plantas de la familia

Leguminosae. Algunos rizobios también son capaces de inducir nódulos en el tallo de leguminosas. (Olivares 2003).

Las bacterias del género *Rhizobium*, son bacilos que miden 0,5 - 1,0 × 1,3 – 3,0 µm. Se mueven por medio de 1 - 6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden 2 - 4 mm de diámetro a los 3 - 5 días de incubación en medio de cultivo Levadura Manitol Agar (LMA). El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacárido extracelular. Son químio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género son bacterias de rápido crecimiento productoras de ácido en LMA (Young *et al.*, 2001).

### **2.10.3 Género *Azotobacter***

*Azotobacter* es un género de bacterias de vida libre y que fijan nitrógeno atmosférico, que pertenece a la clase Gammaproteobacteria. (Setubal, 2009).

Estas son bacterias de vida libre que crecen adecuadamente en medios sin nitrógeno. Utilizan el nitrógeno atmosférico para la síntesis de sus proteínas celulares. La proteína celular se mineraliza después de la muerte de la célula, por tanto, contribuye a la disponibilidad de nitrógeno para las plantas silvestres y los cultivos agrícolas (Agronet, 2004). Se han realizado una gran cantidad de ensayos a campo donde se demuestra el efecto positivo de *Azotobacter* sobre el rendimiento de diferentes cultivos. Se han publicado los efectos sobre cultivos extensivos como maíz (Hussain *et al.*, 1987, Martínez *et al.*, 1988, Pandey *et al.*, 1998,); trigo (Zambre *et al.*, 1984, Behl 2006, Kizilkaya 2008,) y arroz (Kannaiyan *et al.*, 1980, Kennedy *et al.*, 2004).

### **2.10.4 Género *Stenotrophomonas***

*Stenotrophomonas sp.*, es un bacilo gramnegativo, recto o ligeramente curvado, no formador de esporas, que presenta un tamaño aproximado de 0,4 - 0,7 µm de ancho

por 0,7- 1,8  $\mu\text{m}$  de largo. Considerada como bacteria móvil, debe su movilidad a la presencia de varios flagelos polares. Aparecen como bacilos individuales o en parejas, no acumulando gránulos de poli- $\beta$ -hidroxi-butirato en su interior (López 2009).

En cuanto a su hábitat, *Stenotrophomonas sp* es un organismo de localización capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos; ha sido aislado en agua, en suelo, en la rizosfera de diferentes vegetales (algodón, cítricos, maíz, trigo), en animales y en alimentos (cerdos, huevos, leche y pescados congelados) (López 2009).

#### **2.10.5 Género *Ralstonia***

*Ralstonia sp*, es un patógeno de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales, ya que afecta una gran diversidad de cultivos incluidos solanáceas como el tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill), berenjena (*Solanum melongena* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) así como también bananos (*Musa spp.*), maní (*Arachis hipogea* L.), plantas ornamentales como heliconias (*Heliconia sp.*), entre otros (Agrios 1998). En estos cultivos, causa la enfermedad conocida como marchitez bacteriana.

Según Colombo 2010, cuando la bacteria afecta los cultivos de un país, región o zona, las posibilidades de diseminación son múltiples, como suelo infectado, aguas, labores culturales, etc., ya que es un patógeno del suelo y tiene la capacidad de persistir en él, aún sin el hospedante específico. Dicha capacidad va a depender de la raza presente, lo que dificulta la aplicación de medidas de control eficientes.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO

##### 3.1.1 Ubicación Política

La presente investigación se realizó en tres sectores: la primera fase de laboratorio en el centro de biotecnología, la segunda fase de condiciones controladas en el invernadero del Centro de Biotecnología sector y la tercera fase de campo en el sector “Los Molinos” de la Estación Experimental “La Argelia”.

##### 3.1.2 Ubicación Geográfica

Según CINFA (2013) Las Quintas Experimentales “La Argelia” presenta la siguiente ubicación geográfica:

- **Latitud (S):** 04°01'54''
- **Longitud (W):** 79°11'58''
- **Altitud (msnm):** 2 138

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

- **Latitud (S):** 03°23'35''
- **Longitud (W):** 79°11'55''
- **Altitud (msnm):** 2 138

##### 3.1.3 Ubicación ecológica

Según Holdridge la zona utilizada para la presente investigación, posee una precipitación de 800 milímetros de promedio anual, 16° C de temperatura media anual y una zona de vida bosque seco montano bajo (bs-MB).

#### 3.2 MATERIALES

- **Equipos:** Destilador de agua, Agitador calentador, Autoclave, Flujo laminar, Incubadora, Estufa, Incubadora giratoria, Calentador de agua, Balanza

analítica, Microscopio biológico óptico, Refrigeradora -20°C, Contador de colonias, Centrifuga, Vortex, Espectrofotómetro.

- **Reactivos:** Agar Pikosvkaya , Mannitol, Extracto de levadura, Cloruro de calcio, Sacarosa, , Sulfato de hierro, Cloruro de sodio, Alcohol, Hipoclorito de sodio, Agar Ashby, Sulfato de Magnesio, AIA Sintético. Caldo nutriente.
- **Materiales** Semilla (fréjol mantequilla), Insumos agrícolas, Macetas de experimentación, (Micropipetas 1000 ul), Puntas de micropipetas (1000 ul), Papel lumínico, Guantes de laboratorio, Cristalería EllenMeyer, Matraces, Beakers.

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 Metodología para el primer objetivo:

##### ***“Evaluar la producción de AIA y solubilización de fósforo de las rizobacterias”***

Se utilizaron cepas de rizobacterias (Tabla 1), las cuales fueron inoculadas en el medio de cultivo caldo nutriente, suplementado con 1 gr L<sup>-1</sup> de triptófano y se incubaron durante 24 y 48 horas a una temperatura de 30°C.

Se tomó 1 ml del cultivo crecido y se los transfirió a microtubos de 1,5 ml para ser centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min, seguidamente se tomó 0,5 ml del sobrenadante y se le añadió 0,5 ml de reactivo Salkowski, dejándolo a la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Luego del tiempo transcurrido se tomó 1 ml de la solubilización mezclada para transferir a microcubetas del espectrofotómetro para medir la absorbancia a 530 nm.

Para la identificación de la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos las rizobacterias fueron inoculadas por punteado en medio de cultivo Pikovskaya modificado (Zaidi *et al.*, 2009). Como resultado se tomó las cepas donde se observa un halo translúcido alrededor de la colonia.

**Tabla 1.** Rizobacterias utilizadas en la producción de AIA y solubilización de fósforo.

<b>CÓDIGO</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Lugar de aislamiento</b>
T9	<i>Rhizobium etli</i>	Loja
T12	<i>Rhizobium tropici</i>	Catamayo
Pin 2	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Pindal
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	Colaisaca
T8	<i>Rhizobium miluonense</i>	Gonzanamá
Tablón 5	SN	Saraguro
Cascajal 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Zapotillo
SAB	SN	Zapotillo
Ceiba 11	<i>Sphingomonas sp.</i>	Zapotillo
TN 11	<i>Ralstonia sp.</i>	Macará

Abreviatura. SN: Cepas sin identificar genéticamente

### 3.3.2 Metodología para el segundo objetivo

#### ***“Evaluación in vitro de las cepas bacterianas en fréjol común”***

Para la evaluación *in vitro* de las cepas bacterianas se utilizó semillas de fréjol de la variedad mantequilla, las semillas se desinfectaron con alcohol al 70 % durante 2 min y en hipoclorito de sodio al 3 % durante 5 min, finalmente se realizó cuatro lavados con agua destilada estéril para desechar cualquier residuo de los desinfectantes. Para la pre-germinación de las semillas se preparó la solución agar agua (8 g de agar para 400 ml de agua) para 30 cajas de Petri. Para cada una de las cajas se utilizó 20 ml de esta solución, en cada una de las cajas se utilizó 12 semillas y se las colocó en la incubadora a una temperatura de 28 °C.

Posterior a la germinación se inoculó 100 µL de cada cultivo bacteriano sobre cada una de las semillas. Se realizó tres replicas para cada cepa objeto de estudio. Las cajas inoculadas se sellaron y se incubaron a 30 °C y a las 72, 96 y 192 horas después de la inoculación se realizaron las evaluaciones de número y longitud de las raíces.



### 3.3.3 Metodología para el tercer objetivo.

**“Evaluar el efecto de los aislados rizosféricos en parámetros de nodulación, fisiológicos y fijación de N, en el cultivo de fréjol bajo condiciones controladas”**

#### *Montaje del experimento*

Para el montaje del ensayo en condiciones controladas se utilizaron las mejores cepas obtenidas de los estudios en condiciones *in vitro*, así como las cepas que mayor cantidad de AIA produjeron, y las cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico, más un tratamiento con fertilización química (urea) y un control sin inoculación ni fertilización. El experimento se desarrolló utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 9 tratamientos y 10 réplicas en macetas con 2 kg de sustrato en una relación 2:1:1 (tierra, arena y turba) respectivamente.

Los tratamientos utilizados fueron:

**T1=** Cascajal 4 (*Stenotrophomonas maltophilia*)

**T2=** Ceiba 11 (*Sphingomonas sp.*)

**T3=** TN 11 (*Ralstonia sp.*)

**T4=** Cascajal 4 + T12 (*Stenotrophomonas maltophilia* + *Rhizobium tropici*)

**T5=** Ceiba 11 + Col 6 (*Sphingomonas sp.* + *Stenotrophomonas melonis.*)

**T6=** TN11 + Pin .2 (*Ralstonia sp.* + *Azotobacter vinelandii.*)

**T7=** T8 (*Rhizobium miluonense*)

**T8=** Control

**T9=** Fertilización

#### *Preparación del inoculo*

Para la preparación del pre-inóculo se dispuso en tubos de 10 ml de medio caldo nutriente por cada cepa objeto de estudio y se ajustó el pH a 7 añadiendo HCl. Los tubos se incubaron a 30 °C durante 72 horas en incubadora giratoria a 250 rpm para contar con títulos mínimos de 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Al cabo del tiempo establecido se inoculó el cultivo de cada cepa en 200 ml de medio caldo nutriente para obtenerse

el inóculo final, el cual se incubó a 30 °C durante 48 horas en incubadora giratoria a 250 rpm., Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias se realizó el conteo de las células viables en cada una de las cepas. Todas las cepas contaron con títulos superiores a  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Para la realización de la inoculación y co-inoculación en las semillas directamente, se realizó aplicando 1 ml del cultivo de cada uno de los aislados en las 10 réplicas en el momento de la siembra.

#### *Evaluaciones del cultivo*

A los 8 días después de la siembra (DDS), se realizó la primera evaluación de los parámetros morfológicos altura en centímetros y número de hojas de las plántulas; estos parámetros de evaluación se realizaron luego a los 15, 21 y 28 días. A los 30 días (DDS) se inició con la evaluación de los parámetros de nodulación: número de nódulos (NN), peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN), peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR), peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF), para ello se tomó la planta de cada maceta por tratamiento.

#### **3.3.4 Metodología para el cuarto objetivo.**

***“Determinar el efecto de los mejores aislados, sobre parámetros morfológicos, biomasa, componentes de rendimiento y rendimiento agrícola en fréjol común bajo condiciones de campo.”***

- ***Montaje y diseño del experimento en campo***

Para el experimento en campo se utilizó las mejores interacciones de las cepas obtenidas en condiciones controladas, además de un tratamiento con fertilización química (urea) y un control absoluto, mediante un diseño experimental de bloques al azar con 5 tratamientos y 4 réplicas. Cada parcela del ensayo en campo tuvo una dimensión de 20 m<sup>2</sup>

Los tratamientos utilizados fueron:

**T1= T8 (*Rhizobium miluonense*)**

**T2= Control**

**T3= TN11 + T8 (*Ralstonia sp.* + *Rhizobium miluonense*)**

**T4= Fertilización**

**T5= TN11 (*Ralstonia sp.*)**

- ***Realización del inoculo final, peletización en las semillas y siembra en condiciones de campo***

La preparación del pre-inoculo e inoculo final se siguió los mismos pasos del acápite (3.3.3). Obtenido el inoculante final, este se depositó en fundas aluminadas con 250 g de turba como soporte y así se formó el bioinóculo final para la peletización en las semillas de fréjol. La peletización se realizó mediante una mezcla del inoculante y azúcar como adherente en las semillas.

- ***Labores agrotécnicas del cultivo y evaluación del experimento.***

Se realizaron labores agrotécnicas como desyerbas, manejo de plagas y enfermedades. A los 15 días (DDS) se realizó la primera evaluación de los parámetros morfológicos altura (cm) y número de hojas de las plántulas de fréjol. Estos parámetros de evaluación se realizaron luego a los 21 y 28 días.

A los 30 días (DDS) se inició con la evaluación de los parámetros de nodulación: número de nódulos (NN), peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN), peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR), peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF), para ello se tomó 5 plantas por parcela y tratamiento. A los 120 días (DDS) se evaluó los componentes del rendimiento para ello se tomó 5 plantas por parcela, en las que se evaluaron: número de vainas por planta, peso de vainas por plantas, número de granos por planta, peso de granos por planta. Para el rendimiento agrícola se seleccionaron 40 plantas por parcela y se pesaron los granos (Torres-Gutiérrez, 2008).

#### 4. RESULTADOS

##### **Producción de AIA y solubilización de fósforo de las rizobacterias**

En la tabla 2, se presenta los resultados de cada una de las rizobacterias en relación a la producción de ácido indól acético (AIA). Es evidente que todas las cepas tuvieron la capacidad de producir AIA en menor o mayor cantidad. De todas las cepas evaluadas se destacan como las mejoras Cascajal 4 (*Stenotrophomonas maltophilia*) y Ceiba (*Ralstonia* sp.) en relación a los demás aislados bacterianos con valores de 1,636 y 1598 ug ml<sup>-1</sup> respectivamente.

**Tabla 2.** Producción de AIA de las rizobacterias

Tratamiento	Descripción	AIA ug ml <sup>-1</sup>
T9	<i>Rhizobium etli</i>	0,244 <sup>c</sup>
T12	<i>Rhizobium tropici</i>	0,457 <sup>bc</sup>
Pin 2	<i>Azotobacter vinelandii</i>	0,603 <sup>bc</sup>
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	0,541 <sup>bc</sup>
T8	<i>Rhizobium miluonense</i>	0,6995 <sup>bc</sup>
Tablón 5	SN	0,547 <sup>bc</sup>
Cascajal 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,636 <sup>a</sup>
SAB	SN	0,5765 <sup>bc</sup>
Ceiba	<i>Sphingomonas</i> sp	1,5985 <sup>a</sup>
TN 11	<i>Ralstonia</i> sp	0,7615 <sup>b</sup>

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según TUKEY p<0,05.

La presencia de un halo traslucido alrededor de la colonia es un indicativo de que la bacteria tiene la característica de solubilizar fosfatos inorgánicos en medio solido con presencia de fosforo (Tejera-Hernández, 2013; Hernández-Leal, 2011 y Fernández, 2005). En nuestra investigación las cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fosforo inorgánico en medio Pikovskaya fueron Col 6 (*Sphingomonas melonis*) y T9 (*Rhizobium etli*) con valores medios de 5,67 y 3,50 mm de halo respectivamente, el resto de aislados tal como se detalla en la tabla 3 no tuvieron la capacidad de formar halo y por tanto de solubilizar fosforo inorgánico.

**Tabla 3.** Aislados bacterianos con capacidad de solubilizar fosforo inorgánico en medio Pikovskaya.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Solubilización de P</b>	<b>Halo (mm)</b>
T9	<i>Rhizobium etli</i>	+	3,50
T12	<i>Rhizobium tropici</i>	-	0,00
Pin 2	<i>Azotobacter vinelandii</i>	-	0,00
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	+	5,67
T8	<i>Rhizobium miluonense</i>	-	0,00
Tablón 5	SN	-	0,00
Cascajal 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	0,00
SAB	SN	-	0,00
Ceiba	<i>Sphingomonas sp</i>	-	0,00
TN 11	<i>Ralstonia sp</i>	-	0,00

Leyenda: + (Positivo) – (Negativo)

### ***Evaluación in vitro de las cepas bacterianas en fréjol común***

#### ***Número de Raíces***

En la tabla 4 se presentan los resultados en cuanto al número de raíces de las semillas de fréjol inoculas con las cepas bacterianas a las 192 horas de evaluación. Todas las rizobacterias influyen directamente en la promoción de raíces, sin embargo la cepa aislada de Colaisaca (*Sphingomonas melonis*) presenta los mejores resultados con 62 raíces en promedio y la misma difiriendo significativamente frente a las demás cepas evaluadas.

**Tabla 4.** Número de raíces en semillas de frejol mantequilla inoculadas con rizobacterias

Tratamiento	Descripción	Número de raíces
T9	<i>Rhizobium etli</i>	43,92 <sup>ab</sup>
T12	<i>Rhizobium tropici</i>	45,33 <sup>ab</sup>
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	62,83 <sup>a</sup>
T8	<i>Rhizobium miluonense</i>	50,08 <sup>ab</sup>
Tablón 5	SN	33,17 <sup>ab</sup>
Cascajal 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	40,33 <sup>ab</sup>
Ceiba	<i>Sphingomonas sp.</i>	41,00 <sup>ab</sup>
TN11	<i>Ralstonia sp</i>	37,17 <sup>ab</sup>

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según TUKEY  $p < 0,05$ .

#### **Longitud de raíces.**

En la tabla 5 se presentan los resultados en cuanto a la longitud de las raíces de las semillas de frejol. El efecto de las rizobacterias para esta variable evaluada es homogénea, ya que ninguna de las cepas ejercen un efecto marcado en el crecimiento de las raíces para *P. vulgaris*, no obstante con la inoculación de la cepa Col 6 (*Sphingomonas melonis*) se obtiene mayor longitud de la raíz (12,37 cm) en comparación con las demás cepas evaluadas.

**Tabla 5.** Longitud de las raíces de frejol mantequilla inoculadas con rizobacterias

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Longitud de raíces (cm)</b>
T9	<i>Rhizobium etli</i>	8,53 <sup>ab</sup>
T12	<i>Rhizobium tropici</i>	8,29 <sup>ab</sup>
Col 6	<i>Sphingomonas melonis</i>	12,37 <sup>a</sup>
T8	<i>Rhizobium miluonense</i>	8,30 <sup>ab</sup>
Tablón 5	SN	8,06 <sup>ab</sup>
Cascajal 4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8,35 <sup>ab</sup>
Ceiba	<i>Sphingomonas sp.</i>	11,18 <sup>ab</sup>
TN11	<i>Ralstonia sp</i>	9,45 <sup>ab</sup>

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según TUKEY  $p < 0,05$ .

***Efecto de los aislados rizosféricos en parámetros de nodulación, fisiológicos y fijación de N, en el cultivo de fréjol bajo condiciones controladas.***

En el cuadro 1, se presenta la comparación de medias para la altura y el número de hojas realizada a los 8, 15, 21 y 28 DDS. En todos los tiempos de evaluación se evidencia el efecto positivo de las rizobacterias en la altura y promoción del número de hojas, destacándose los tratamientos T5 (*Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*), T6 (*Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.*) y T7 (*Rhizobium miluonense*).

**Cuadro 1.** Evaluación de parámetros morfológicos en frejol mantequilla en invernadero.

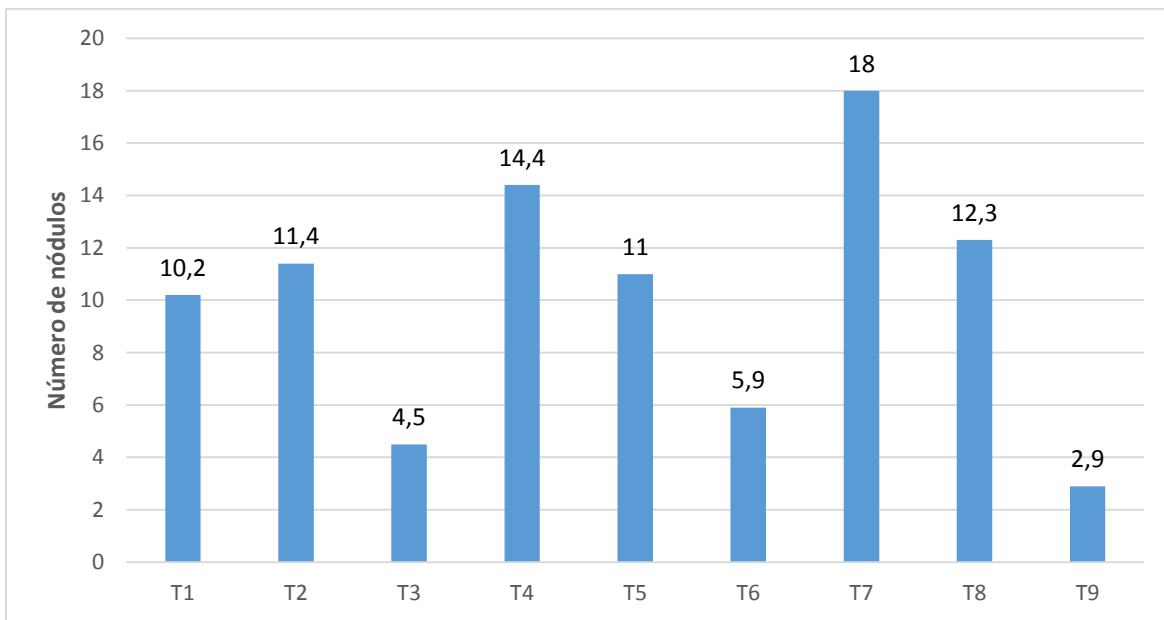
TRATAMIENTO	8 Días		15 Días		21 Días		28 Días	
	Altura (cm)	N° de hojas	Altura (cm)	N° de hojas	Altura (cm)	N° de hojas	Altura (cm)	N° de hojas
T1	5,69 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	22,62 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	25,53 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	26,34 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T2	6,98 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	21,81 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	26,60 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	26,94 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T3	5,65 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	21,23 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	24,80 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	25,64 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T4	6,41 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	21,60 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	25,70 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	28,27 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T5	7,23 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	23,23 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	26,39 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	29,37 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T6	7,01 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	22,71 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	26,94 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	29,41 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T7	6,88 <sup>a</sup>	1,8 <sup>a</sup>	24,01 <sup>a</sup>	1,9 <sup>a</sup>	32,34 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	36,50 <sup>a</sup>	7,8 <sup>a</sup>
T8	5,19 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	22,49 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	26,27 <sup>a</sup>	5 <sup>ab</sup>	29,35 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
T9	5,98 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	23,76 <sup>ab</sup>	2 <sup>a</sup>	30,43 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	36,52 <sup>a</sup>	8,1 <sup>a</sup>

**Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas sp.*), T3 (*Ralstonia sp.*), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*), T6 (*Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.*), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización).



## Número de nódulos

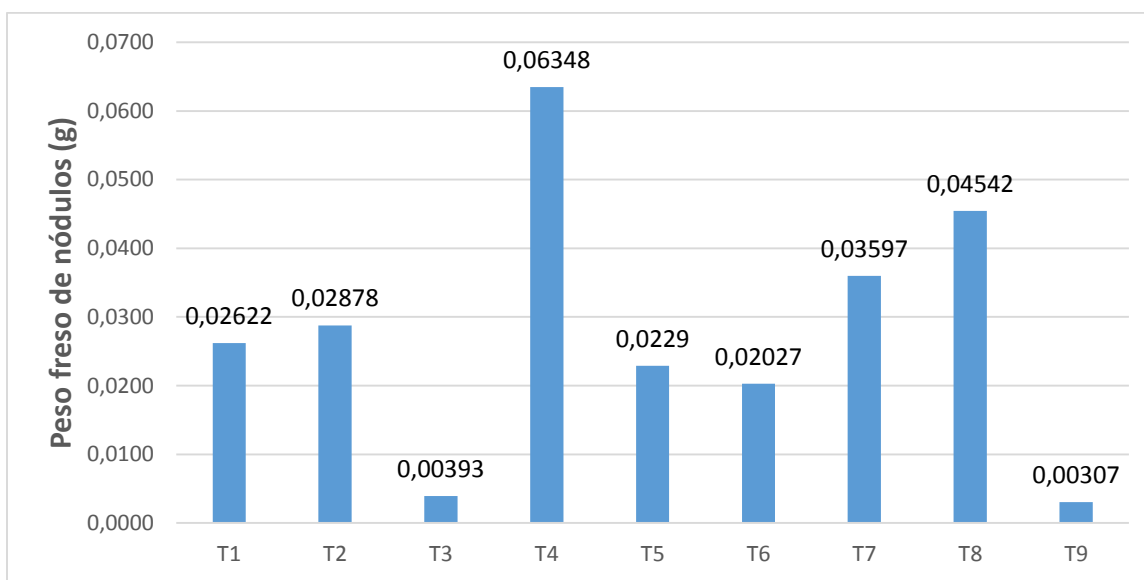
En la figura 1 se presenta los resultados del número de nódulos totales. Todas las rizobacterias ejercieron un efecto positivo en la promoción de nódulos en las raíces de frejol mantequilla, como era de esperar los tratamientos T4 y T6 presentan los mejores resultados debido a la sinergia simbiótica de *Rhizobium* con esta leguminosa, a pesar de esto, no se evidencia diferencias estadísticas significativas con los demás tratamientos evaluados.



**Figura 1.** Número de nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.)T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización)

### Peso fresco de nódulos.

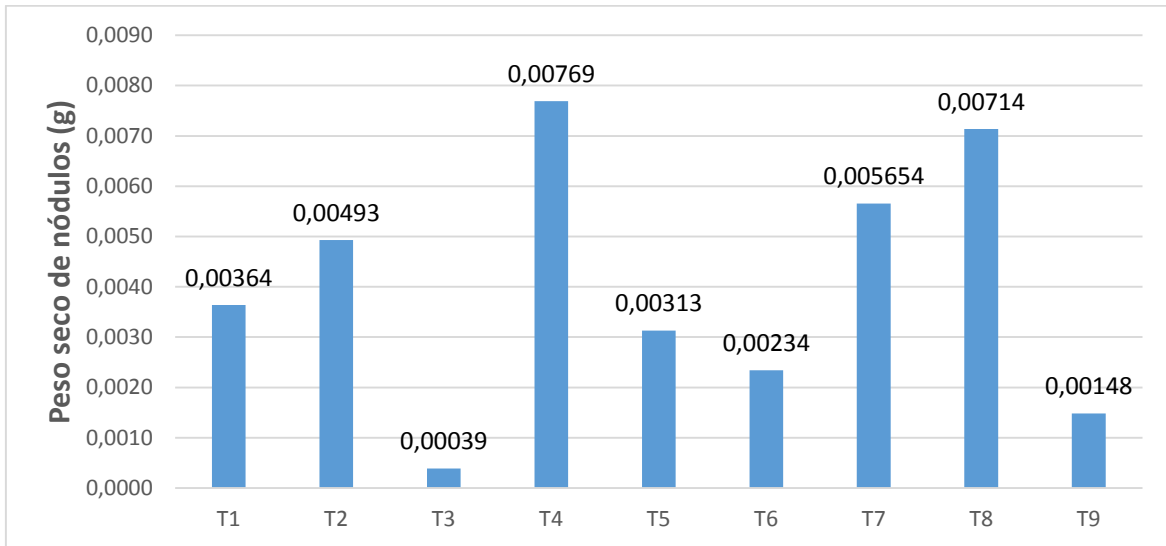
En la figura 2 se muestra los resultados para la variable peso fresco de los nódulos (g). De todos los tratamientos evaluados el tratamiento T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*) presentó los mejores resultados con valores de 0,0634 mientras que T9 (Fertilización) los valores más bajos.



**Figura 2.** Peso fresco de nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas sp.*), T3 (*Ralstonia sp.*), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*), T6 (*Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.*), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**

### Peso seco de nódulos

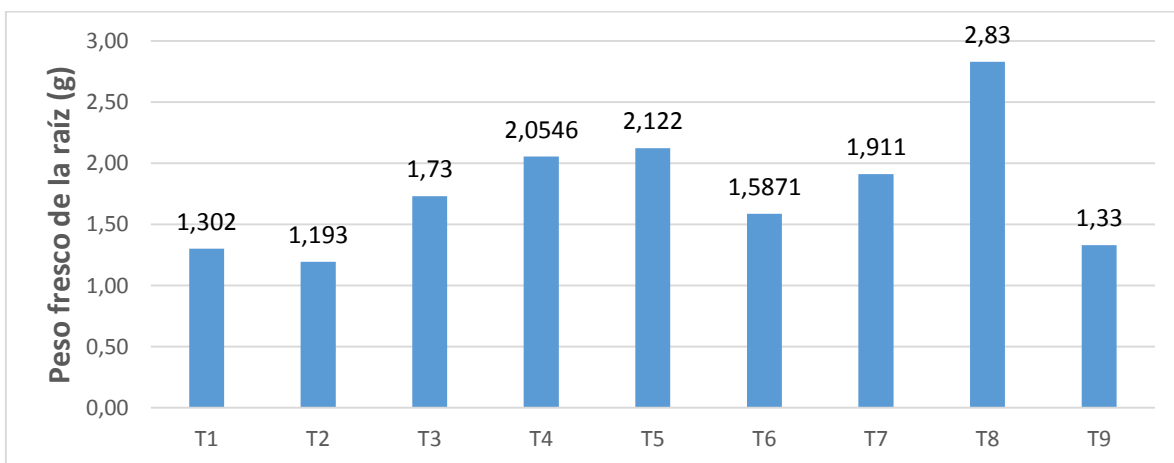
En la figura 3 se muestran los resultados para la variable peso seco de nódulos (g), los mejores resultados se obtiene con la coinoculación de las cepas T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*) y sorpresivamente T8 (Control) con valores de 0,00769 y 0,00714 g respectivamente.



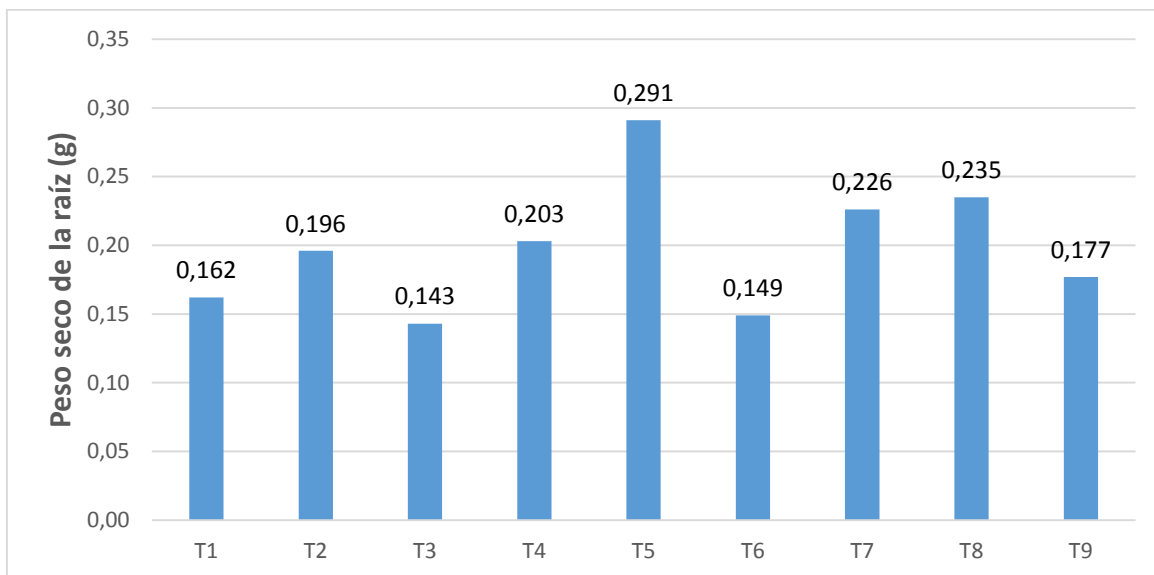
**Figura 3.** Peso seco de nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p<0,05$  Tukey.**

### Peso fresco y seco de la Raíz

En la figura 4 y 5 se presentan los resultados del peso fresco y seco de la raíz, en relación al peso fresco de la raíz no existe diferencias significativas en los tratamientos evaluados, mientras que para el peso seco de la raíz, el tratamiento T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.) presentó los mejores resultados con valores de 0,29 g.



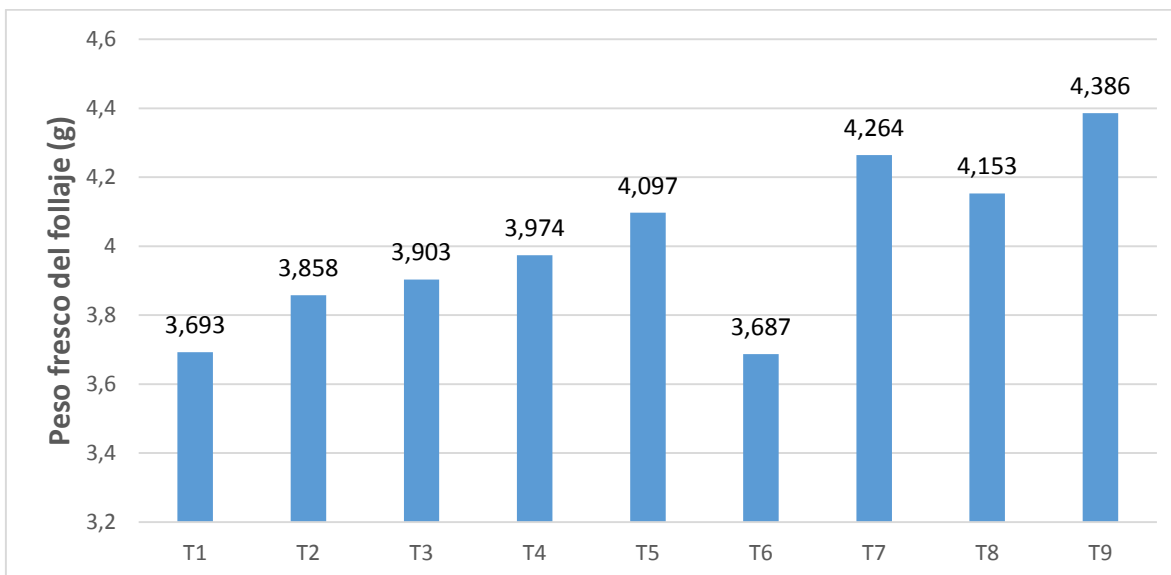
**Figura 4.** Peso fresco de la raíz a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p<0,05$  Tukey.**



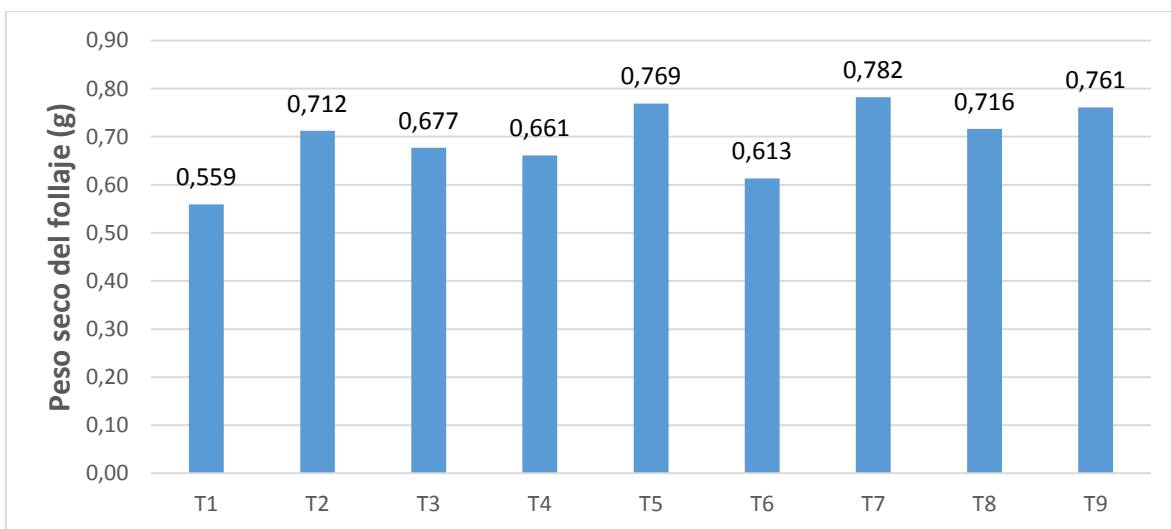
**Figura 5.** Peso seco de la raíz a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**

### Peso fresco y seco del follaje

En la figura 6 y 7 se muestran los resultados del peso fresco y seco del follaje, con respecto al peso fresco del follaje no se evidencia diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que para el peso seco del follaje los tratamientos T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*) y T9 (Fertilización) ejercieron un efecto positivo en la promoción de biomasa con respecto a los demás tratamientos.



**Figura 6.** Peso fresco del follaje a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**



**Figura 7.** Peso seco del follaje a los 30 DDS. **Tratamientos:** T1 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T2 (*Sphingomonas* sp.), T3 (*Ralstonia* sp.), T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*), T8 (Control), T9 (Fertilización). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**

**Efecto de los mejores aislados, sobre parámetros morfológicos, biomasa, componentes de rendimiento y rendimiento agrícola en fréjol común bajo condiciones de campo**

En el cuadro 2, se presenta la comparación de medias para la altura y el número de hojas realizada a los 15, 21 y 28 DDS. En todos los tiempos de evaluación para el número de hojas no hay diferencias estadísticas entre tratamientos, no así para la altura de las plantas, sin embargo a los 15, 21 y 28 DDS el tratamiento fertilización difiere significativamente frente a los demás tratamientos, seguido de T8 (*Rhizobium miluonense*) y TN11 (*Ralstonia* sp.) quienes presentan los mejores resultados.

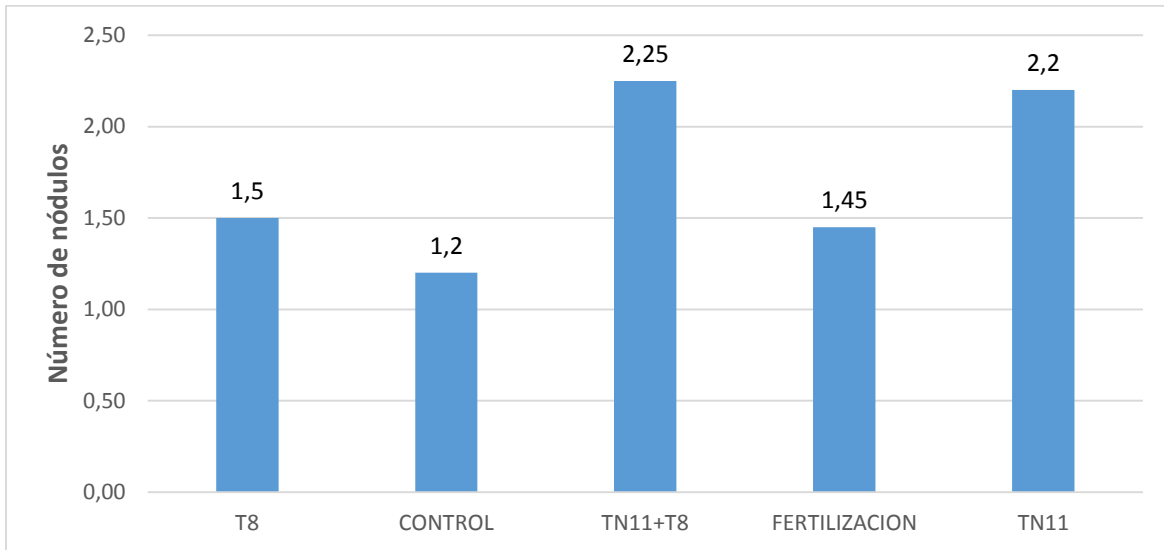
**Cuadro 2.** Comparación de tratamientos respecto a los parámetros morfológicos en frejol mantequilla en campo

Tratamiento	15 DDS		21 DDS		28 DDS	
	Altura (cm)	N° de hojas	Altura (cm)	N° de hojas	Altura (cm)	N° de hojas
T8	16,22 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>a</sup>	17,14 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	18,16 <sup>b</sup>	8,0 <sup>a</sup>
Control	15,56 <sup>c</sup>	1,8 <sup>a</sup>	16,72 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	17,8 <sup>b</sup>	8,0 <sup>a</sup>
TN11+T8	15,9b <sup>c</sup>	1,8 <sup>a</sup>	17,56 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	18,44 <sup>b</sup>	8,0 <sup>a</sup>
Fertilización	16,54 <sup>a</sup>	1,8 <sup>a</sup>	19,04 <sup>a</sup>	5,4 <sup>a</sup>	20,44 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>
TN 11	15,46 <sup>c</sup>	1,8 <sup>a</sup>	17,82 <sup>b</sup>	5,0 <sup>a</sup>	20,42 <sup>a</sup>	8,0 <sup>a</sup>

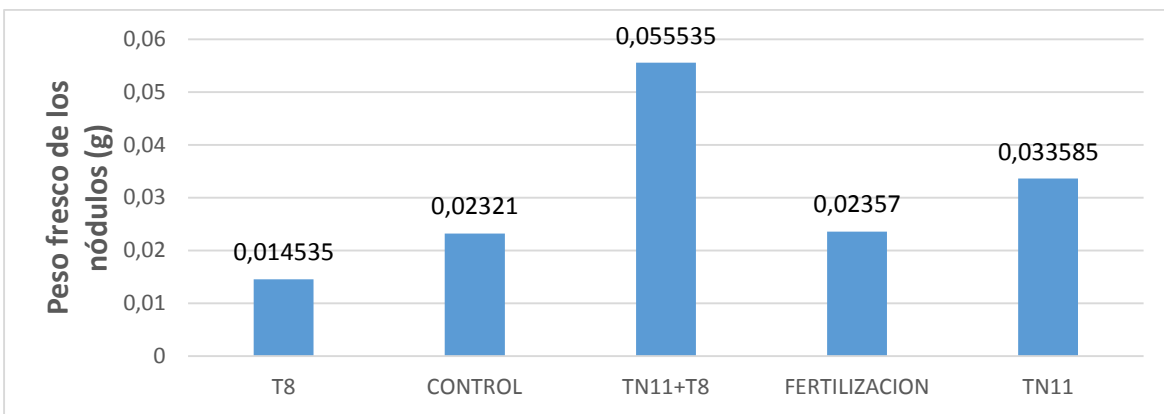
**Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), Control, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), Fertilización y TN 11 (*Ralstonia* sp.). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

**Número de nódulos, peso fresco y seco de nódulos**

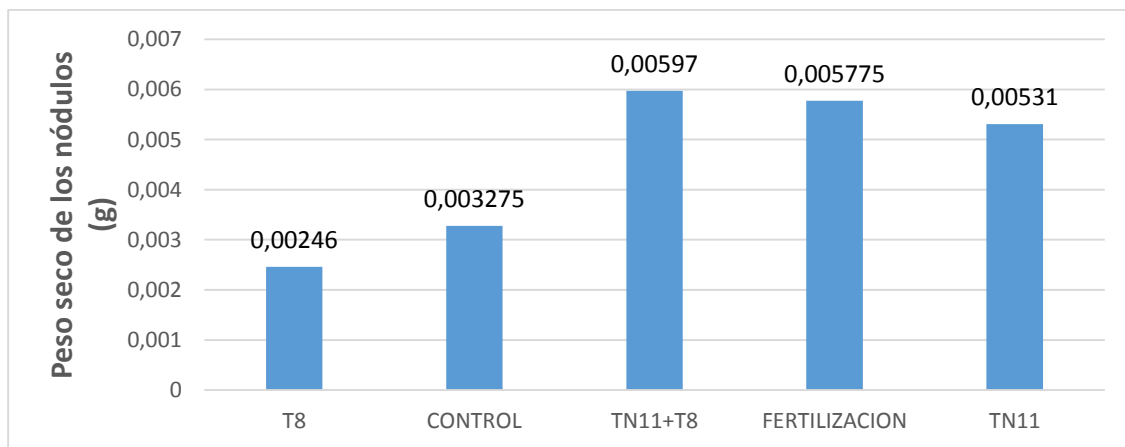
En la figura 8, 9 y 10 se presentan los resultados para los parámetros de nodulación, correspondientes a número de nódulos totales, peso fresco y seco de nódulos (g) para cada uno de los tratamientos y la comparación entre tratamientos para cada variable evaluada. A los 30 DDS no se evidencia diferencias significativas, lo que indica que cada uno de los tratamientos responden de igual forma a las cepas inoculadas, control y fertilización.



**Figura 8.** Número de nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **CONTROL**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **FERTILIZACIÓN**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).



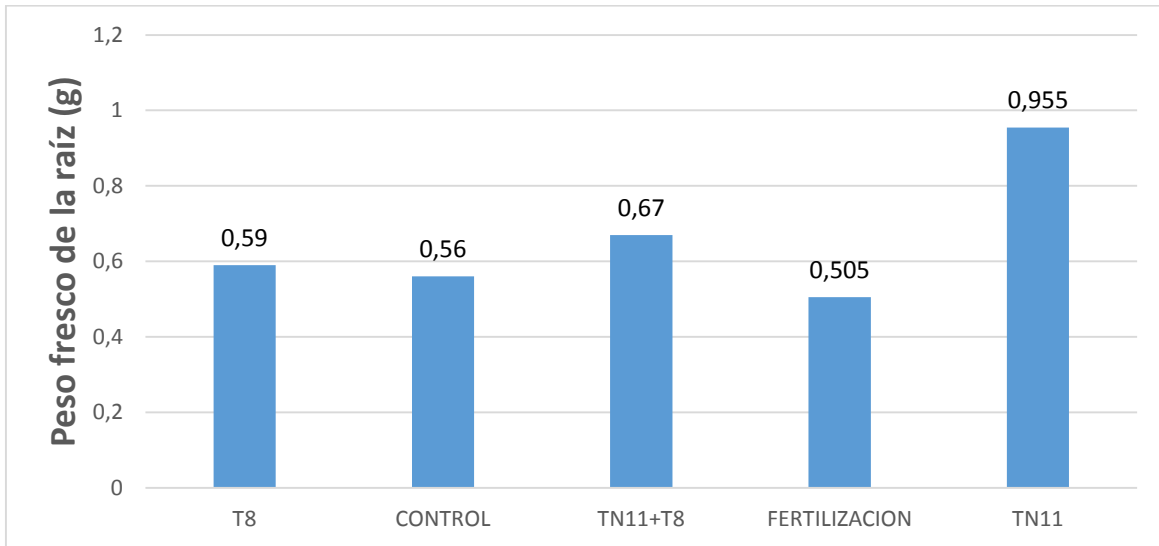
**Figura 9.** Peso fresco de los nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **CONTROL**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **FERTILIZACIÓN**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).



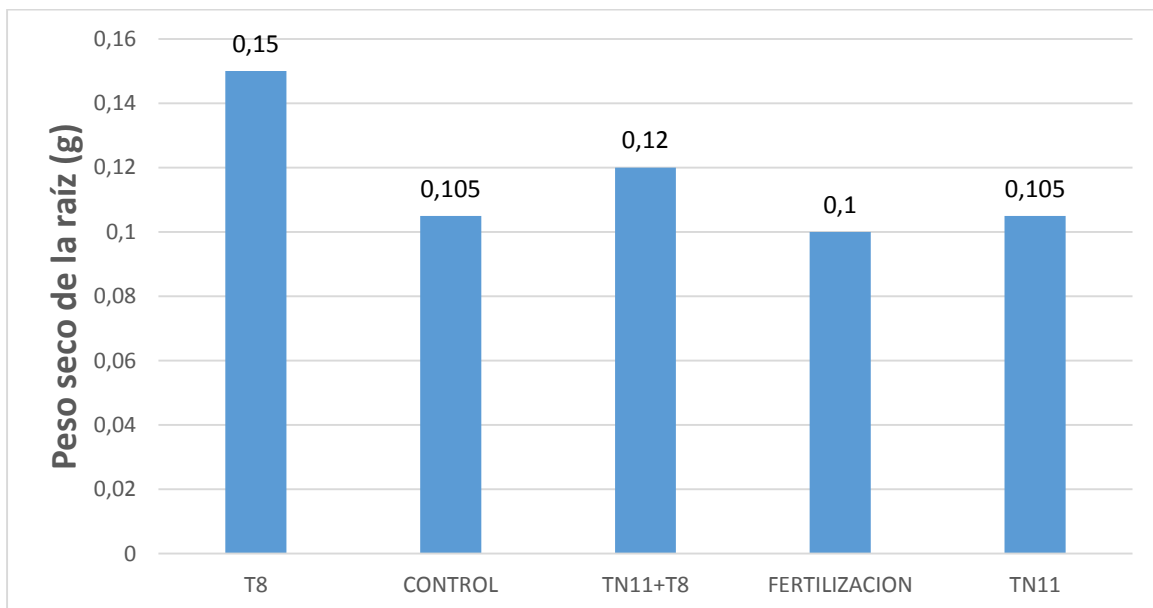
**Figura 10.** Peso fresco de los nódulos a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **CONTROL**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **FERTILIZACIÓN**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).

## Peso fresco y seco de la raíz

En la figura 11 y 12 se indican los resultados con respecto a los parámetros fisiológicos: peso fresco y seco de la raíz (g) evaluados a los 30 DDS en campo, Como se evidencia para ambas variables evaluadas no existe diferencias significativas en los tratamientos evaluados. Sin embargo el tratamiento TN11 (*Ralstonia* sp) y T8 (*Rhizobium miluonense*) presentan los mejores resultados.



**Figura 11.** Peso fresco de la raíz a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).

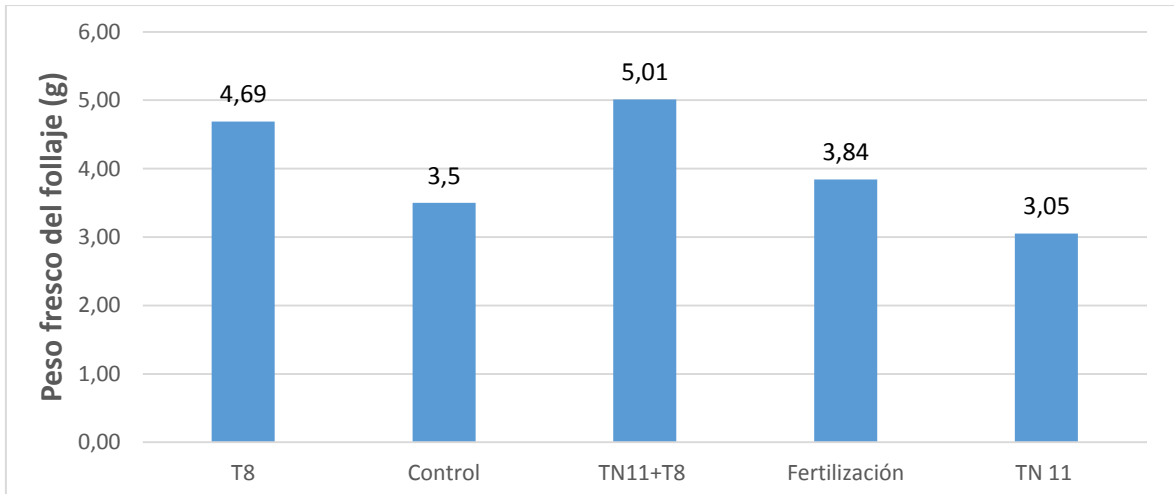


**Figura 12.** Peso seco de la raíz a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).

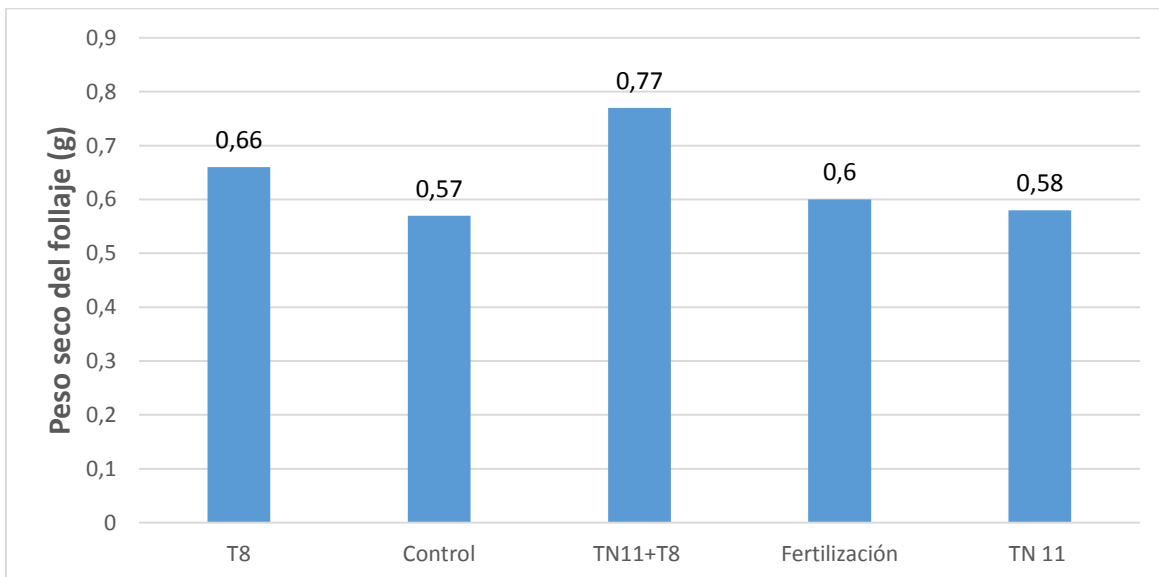


### Peso fresco y seco del follaje

En la figura 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos en campo del peso fresco y seco del follaje (g). Para ambas variables evaluadas la inoculación doble con TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*) presenta los valores más altos con respecto al control y la cepa TN11 (*Ralstonia* sp.), siendo estos últimos tratamientos los que presentan los valores más bajos.



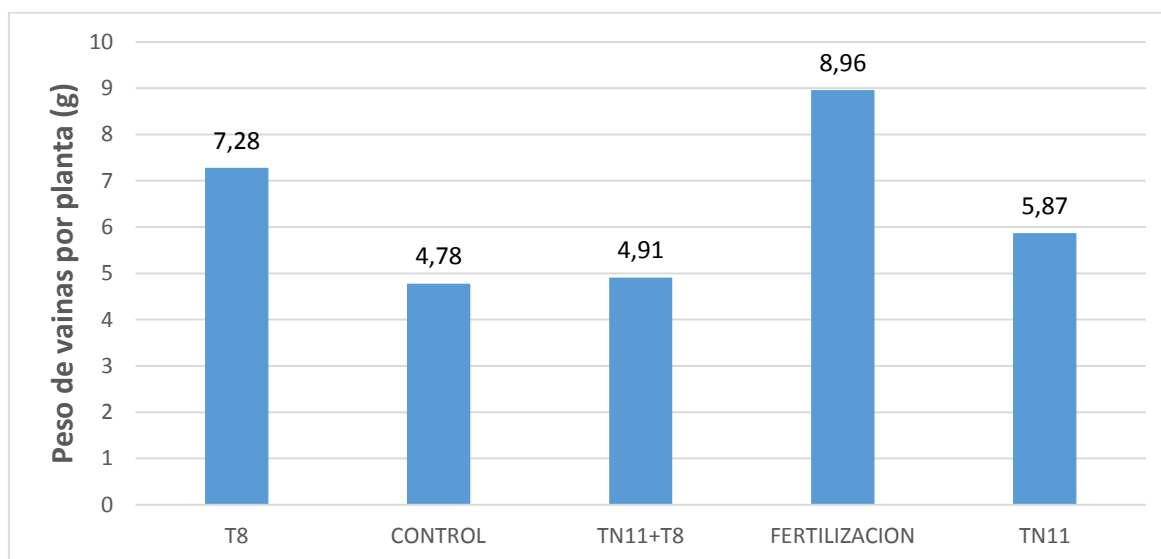
**Figura 13.** Peso fresco del follaje a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**



**Figura 14.** Peso seco del follaje a los 30 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**

### Peso de vainas por planta

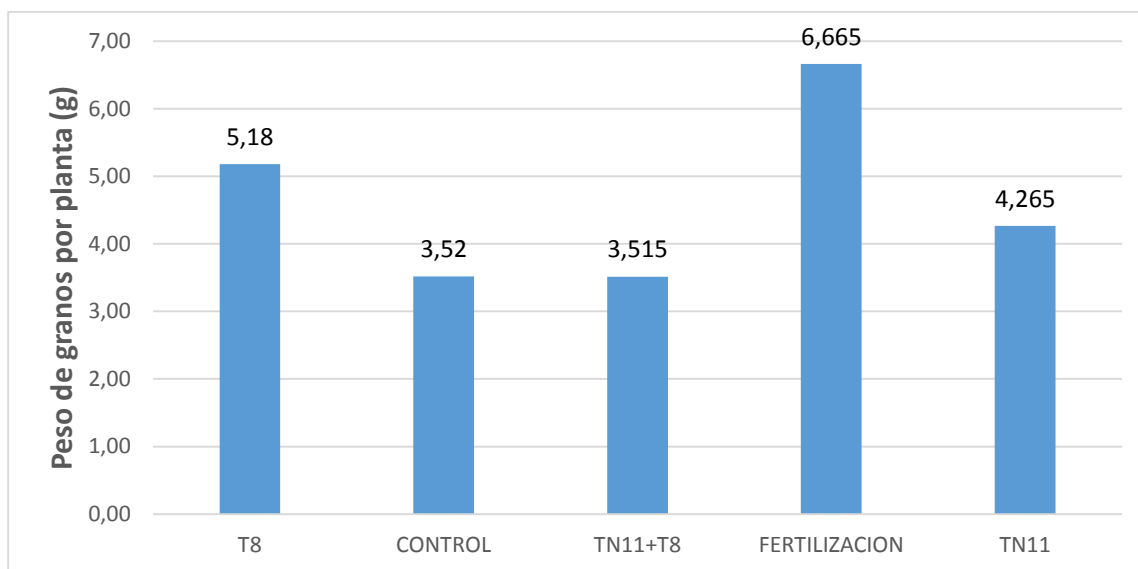
En relación a los componentes del rendimiento. En la figura 15 se presenta los resultados con respecto al peso de vainas por planta, donde el tratamiento Fertilización presenta los mejores resultados, con valores de 8,9 g, en relación con los tratamientos Control y T8 (*Rhizobium miluonense*) quienes presentan los valores más bajos.



**Figura 15.** Peso de vainas por planta a los 120 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.). Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.

### Peso de granos por planta

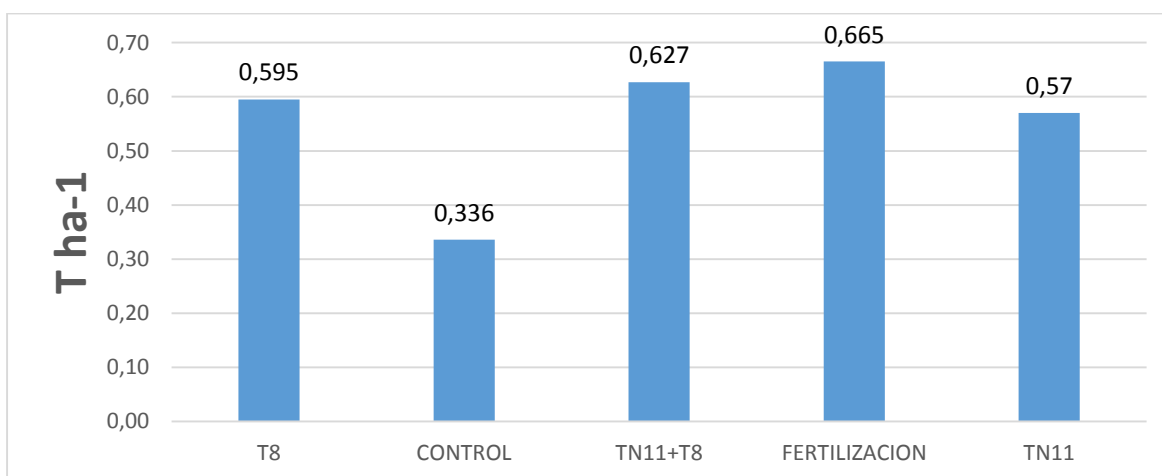
En la figura 16 se presenta los resultados del peso de granos por planta, siendo el tratamiento Fertilización el que presenta los mejores resultados con valores de 6,66 g, el mismo que difiere significativamente frente a los tratamientos control y la combinación de TN11+T8, y no así con los demás tratamientos evaluados.



**Figura 16.** Peso de granos por planta a los 120 DDS. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.). **Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  Tukey.**

### Rendimiento agrícola

Los valores correspondientes al rendimiento agrícola se presentan en la figura 17, a pesar de no haber diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, se destaca el tratamiento con Fertilización química, el cual presenta un rendimiento promedio de  $0,665 \text{ TM ha}^{-1}$ , mientras que el tratamiento Control presentó los valores demás bajos de  $0,336 \text{ TM ha}^{-1}$ .



**Figura 17.** Rendimiento agrícola. **Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), **Control**, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), **Fertilización**, TN 11 (*Ralstonia* sp.).

En la tabla 6 se presentan los resultados en cuanto al contenido de nitrógeno total en grano seco de fréjol mantequilla, en donde el tratamiento TN 11 (*Ralstonia* sp.) obtuvo los valores más altos de 3,97 %., seguido del tratamiento Fertilización y T8 (*Rhizobium miluonense*).

**Tabla 6.** Contenido de nitrógeno total en grano seco de fréjol mantequilla.

TRATAMIENTO	%N
T8	3,84
Control	3,67
TN11+T8	3,83
Fertilización	3,95
TN11	3,97

**Tratamientos:** T8 (*Rhizobium miluonense*), Control, TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*), Fertilización, TN 11 (*Ralstonia* sp.).

## 5. DISCUSIÓN

### ***Producción de AIA y solubilización de fósforo de las rizobacterias***

Las cepas que produjeron la mayor cantidad de ácido indol acético (AIA) fueron Cascajal 4 (*Stenotrophomonas maltophilia* y Ceiba (*Ralstonia* sp.), la cepa que produjo la menor cantidad de AIA fue (*Rhizobium etli* con 0,244 ug ml<sup>-1</sup>). Comparando con el estudio realizado por Altuna *et al.*, (2006) en el que, la concentración de AIA máxima alcanza una media de 446,3 ug ml<sup>-1</sup>, es decir, incrementos del 31 % con respecto al control. Santillana *et al.*, (2005) en su estudio menciona que el 47% de las cepas de *Rhizobium* presentaron efecto estimulante sobre semillas de fréjol resultando en una mejor germinación, posiblemente, debido a la habilidad de los *Rhizobium* para producir hormonas como el ácido indol-acético sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas.

Los análisis de solubilización de fosfatos indican que se obtuvo un halo de 5,67 mm en el tratamiento Col 6 (*Sphingomonas melonis*), y 3,50 en el tratamiento T9 (*Rhizobium etli*); comparando con otros estudios realizados, Sridevi *et al.*, (2007) inocularon cepas de *Rhizobium* en medio Pikovskaya y se incubaron durante nueve días y encontrándose índices de solubilización que van desde 2,40 a 2,70 mm.

En cuanto al número de raíces y longitud de raíces la cepa de Col 6 (*Sphingomonas melonis*) presenta los mejores resultados con 62 raíces y una longitud de 12,37 cm en comparación con las demás cepas evaluadas.

### ***Efecto de los aislados rizosféricos en parámetros de nodulación, fisiológicos y fijación de N, en el cultivo de fréjol bajo condiciones controladas***

Para la altura de la planta y número de hojas en condiciones controladas se evidenció un efecto positivo de las rizobacterias en la promoción y desarrollo de las plantas de fréjol, destacándose los tratamientos T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.) y T7 (*Rhizobium miluonense*), lo que corrobora Burdman *et al.*, (2000) al manifestar el efecto beneficioso de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre los cultivos de leguminosas y en específico la inoculación con cepas de *Rhizobium*

En cuanto a los parámetros de nodulación, todas las rizobacterias influyeron significativamente en la formación de nódulos en las raíces de fréjol mantequilla, dando como mejores resultados la inoculación doble con las cepas de T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*) y T6 (*Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.*). El tratamiento T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*) presentó los mejores resultados para el peso fresco de los nódulos con valores de 0,0634 e igualmente para el peso seco de los nódulos con valores de de 0,00769 demostrando que hubo una interacción beneficiosa entre *Rhizobium* con la leguminosa. Obando (2012), afirma que los efectos positivos de la inoculación con *Rhizobium* es estimuladora de crecimiento esto dado por un mayor número y peso de nódulos lo que se traduce en mayor fijación de nitrógeno, y por ende, un aumento significativo del contenido de macronutrientes y micronutrientes. Subia (2002) afirma que el peso seco de los nódulos permite inferir que a mayor nodulación, mayor absorción de nitrógeno, por parte de las plantas. El género *Stenotrophomonas* ha sido reportado por Liba *et al.*, (2006) como el género que tiene la capacidad de fijar nitrógeno.

En el análisis del peso fresco de la raíz no demuestra diferencia significativas en los tratamientos evaluados, mientras que en el peso seco de la raíz el tratamiento T5 (*Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*) presentó los mejores resultados con valores de 0,29 g. La inoculación de la bacteria *Rhizobium* no prolifera el desarrollo de la raíz, ya que la raíz es una fuente muy importante para el desarrollo del *Rhizobium* ya que esta bacteria tiende a inocularse en esta parte de la planta.

En el peso fresco del follaje no se evidencia diferencias significativas, mientras que en el peso seco del follaje los tratamientos T5 (*Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*), T7 (*Rhizobium miluonense*) y T9 (Fertilización) ejercieron un efecto positivo en la promoción de biomasa con respecto a los demás tratamientos. Sierra *et al.*, (2012) determinó que al emplear cepas aisladas de *Rhizobium* en fréjol existió una diferencia significativa en el incremento de la biomasa foliar. Según Cruz (2014), las diferencias en los pesos secos de follaje sugieren diferencias en crecimiento y desarrollo debidas a sus características

genéticas y expresiones fenotípicas bajo las condiciones del ensayo, independientes de los efectos de cepa o de la interacción cepa por genotipo.

Los resultados obtenidos al evaluar la fijación de N (%N total), muestran el efecto directo de asimilación de N por parte de la planta, demostrando así la estrecha compatibilidad existente entre los parámetros de nodulación y biomasa foliar para que se incorporen adecuadas cantidades de N proveniente de la atmósfera en las plantas inoculadas. Como se aprecia en la tabla 6 la inoculación con la cepa TN11 (*Ralstonia* sp) obtuvo los mayores valores de fijación de N total en el follaje de la planta con 3,97%, seguido de fertilización.

### ***Efecto de los mejores aislados, sobre parámetros morfológicos, biomasa, componentes de rendimiento y rendimiento agrícola***

Para la altura de la planta y número de hojas en condiciones de campo el tratamiento fertilización difiere significativamente frente a los demás tratamientos, la inoculación de la bacteria *Rhizobium* no acelera ni retrasa el ciclo vegetativo del cultivo significativamente.

En cuanto a los parámetros de nodulación, correspondientes a número de nódulos totales, peso fresco y seco de nódulos (g) para cada uno de los tratamientos y la comparación entre tratamientos para cada variable evaluada no se evidencia diferencias significativas. Cruz, (2000) menciona que las variaciones en el número de nódulos sugieren una variación en la expresión fenotípica de la respuesta a la inoculación.

En el peso fresco de la raíz no demuestra diferencias significativas en los tratamientos evaluados, mientras que en el peso seco de la raíz el tratamiento T8 (*Rhizobium miluonense*) presentó los mejores resultados con valores de 0,15 g. Esto debido a la asimilación de nutrientes hacia la parte foliar por parte de las bacterias hacia la raíz.

En relación al peso fresco y seco del follaje el tratamiento con la coinoculación de TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*) presentó los valores más altos para ambas variables. García, (2014) concuerda que al emplear cepas aisladas de

*Rhizobium* en fréjol determinó que de acuerdo al análisis de varianza realizado, existió una diferencia significativa en el incremento de la biomasa foliar.

En cuanto a los componentes de rendimiento. Para el peso de vainas por planta (PVP) y el peso de granos por planta (PGP) el tratamiento Fertilización presenta los mejores resultados, con valores de 8,9 g, y 6,66 respectivamente difiriendo significativamente en relación a los demás tratamientos. Valdivia (2011) menciona que la optimización de las bacterias como *Rhizobium* en la fijación de N<sub>2</sub> y absorción de otros elementos nutritivos estimulan el desarrollo vegetal y por ende sus componentes de rendimiento como en el caso del fréjol. El número de granos por planta son los componentes del rendimiento más estables y están más relacionados con las características propias del cultivar (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2004).

En cuanto al rendimiento agrícola el tratamiento de fertilización presentó un valor de 0,665 TM ha<sup>-1</sup> mientras que el tratamiento de Control obtuvo un valor de 0,336 TM ha<sup>-1</sup>, Serrano *et al.*, (2005), reporta en cuanto al rendimiento, que 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). Según INEC (2014), la producción media nacional de fréjol es de 1,09 t/ha.

Los resultados obtenidos al evaluar el contenido de nitrógeno total, muestra que el efecto de la asimilación de N por parte de la planta, existe compatibilidad entre los parámetros de nodulación y biomasa foliar para que se incorporen adecuadas cantidades de N proveniente de la atmósfera en las plantas inoculadas. En la investigación el tratamiento TN 11 (*Ralstonia* sp.) obtuvo un valor de 3,97.



## 6. CONCLUSIONES

- Las cepas Cascajal 4 (*Stenotrophomonas maltophilia*), y Ceiba (*Ralstonia* sp.) son capaces de producir cantidades significativas de AIA y las cepas Col 6 (*Sphingomonas melonis*) y T9 (*Rhizobium etli*) son capaces de solubilizar fósforo inorgánico.
- La inoculación con la cepa aislada de Colaisaca (*Sphingomonas melonis*) originó mayor número y longitud de raíz de las semillas de frejol variedad mantequilla *in vitro*.
- En todos los procesos de evaluación se evidenció que los tratamientos T4 (*Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*), T5 (*Sphingomonas* sp.+*Stenotrophomonas* sp.), T6 (*Ralstonia* sp.+*Rhizobium* sp.), T7 (*Rhizobium miluonense*) y T9 (Fertilización) influyeron significativamente en los parámetros de nodulación en el cultivo de fréjol variedad mantequilla en invernadero.
- La inoculación de las cepas T8 (*Rhizobium miluonense*) y TN11+T8 (*Ralstonia* sp. + *Rhizobium miluonense*) causó mayor peso seco de la raíz, peso fresco y seco del follaje en comparación con el resto de las cepas inoculadas, control y fertilización bajo condiciones de campo.

## 7. RECOMENDACIONES

- Seguir realizando investigaciones en campo sobre este tema, con el fin de emplear las cepas *Stenotrophomonas maltophilia*+*Rhizobium tropici*, *Sphingomonas sp.*+*Stenotrophomonas sp.*, *Ralstonia sp.*+*Rhizobium sp.* y *Rhizobium miluonense* ya que estas presentaron los mejores resultados en los parámetros de nodulación.
- Realizar ensayos de campo con las mejores cepas obtenidas en condiciones controladas para validar los resultados de estimulación fenotípica y fijación de nitrógeno.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abela, J. 2010. Importancia y función de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en el cultivo de la soya.
- AGRONET SOFTWARE PVT. LTD. 2004. "Azotobacter".
- Alarcon, A. Ferrera, R. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la Agricultura. Agricultura Técnica en México.
- Andino Villafuerte. 2011. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo ESPOCH
- Antón M. 2004. Interacciones microorganismos - suelo - planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud
- Araujo, J. 2008. Botánica sistemática. Facultad de Recursos Naturales ESPOCH
- Arias, J; Rengifo, T; Jaramillo, M. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de fréjol voluble. Colombia: Ctp Print Ltda., 2007.
- Bais H.P., Fall R. y Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol.
- Bauer, T. 2001. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*
- Beever D., Brentrup F., Eveillard P., Fixen P., Heffer P., Herz B., Larson R., Pallière R. 2007. Sustainable Management of the Nitrogen Cycle in Agriculture and Mitigation of Reactive Nitrogen Side Effects. International Fertilizer Industry Association. Paris, France ISBN 2-9523139-1-1. pp.
- Behl, R.; Narula, N.; Vasudeva, M.; Sato, A.; Shinano, T.; Osaki, M. 2006 Harnessing wheat genotype x *Azotobacter* strain interactions for sustainable wheat production in semiarid tropics. Tropics 15(1):121-133.
- Bernal J., TORRES M., VALENCIA S., MARTINEZ P. 2004. "Insolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp, producers of índole-3-Acetic acid and Sideriphores, from Colombian Rice Rhizophere". Revista Latinoamericana de Microbiología.

- Boström KH. 2006. Nitrogen Fixation Among Marine Bacterioplankton. Department of Biology & Environmental Science, University of Kalmar.
- Broughton, W. J.; Hernandez, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P. y anderleyden, J. Beans (*Phaseolus* spp.), model food legumes. *Plant Soil* 2003.
- Cevallos, D. “Evaluación de la adaptabilidad de 20 Variedades y Líneas de Fréjol Arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) de grano Rojo y Amarillo en el Valle de Intag, Imbabura. 2007”. Tesis De Ingeniero Agropecuario, Santo Domingo –Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, 2008.
- CIAT 2012. Centro Internacional de Agricultura Tropical; Palmira– Colombia.
- 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 *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del Municipio de Sampués, Departamento de Sucre. Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias. Sucre, Colombia.
- Cueva Guarnizo, H. S., & Cueva Guarnizo, H. S. (2007). Evaluación de dos variedades de fréjol (mantequilla y yunguilla) con la aplicación de abonos orgánicos en Amaluza-Espíndola (Doctoral dissertation).
- Enya, J.; Shinohara, S.; Tsukiboshi, T.; Negishi, H.; Sumaya, K.; Tsushima, S. 2007. Culturable Leaf-Associated Bacteria on Tomato Plants and Their Potential as Biological Control Agents. *Microbial Ecology* 53: 524–536.
- Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J. y McConkey B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26:227-242.
- Glick E. y Dessaus Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for Indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*
- Hussain, A.; Arshad, M.; Hussain, A.; Hussain, F. 1987. Response of maize (*Zea mays*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized and unfertilized conditions. *Biol Fertil Soil*

- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC). 2014. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continúa. Ecuador.
- INTA; Inoculantes mejorados; Revista de Investigaciones Agropecuarias; Ciudad de Buenos Aires; 31 de enero de 2011.
- Kannaiyan, S.; Govindarajan, K.; Lewin, H. 1980. Effect of foliar spray of *Azotobacter chroococcum* on rice crop. *Plant Soil* 56:487-490.
- Kennedy, R.; Choudhury, A.; Kecskés, L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:1229-1244.
- Kizilkaya, R. 2008. Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecol Eng* 33:150-156.
- Lafarga A.; Delgado J. 2007. Leguminosas. Navarra, España. ITG Agrícola.
- López, M. 2009. “estudio microbiológico de nuevas alternativas en el tratamiento de “*Stenotrophomonas maltophilia*” Madrid, 2009
- Lugtenberg, B., Bloemberg, G., Bolwerk, A., van den Broek, D., Cazorlalopez, F., Chin-A-Woeng, T., Eijkemans, K., Kamilova, F., Kuiper, I. y Mulders, I. 2009. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St Paul, Minnesota, USA.
- Martínez, L. Jaime, M.; Martín, G.; Fernández, R.; Nasif, A. 1988. Incremento de productividad en fréjol, mediante inoculación con microorganismos fijadores libres de nitrógeno. II Reunión Científico Técnica- Biología del Suelo- Fijación biológica del Nitrógeno. Universidad Nacional de Catamarca – Facultad de Ciencias Agrarias.
- Martínez-Viveros R., Dibut B., Ríos Y. 2010. Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta, La Habana,
- Morales, P. 2010. Los Microorganismos del Suelo. Granos andinos.
- Nascimbém, A.; Galdiano. J.; Campanharo. C.; Carareto A.; Macedo, L. 2010. Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. *Bragantia*

- Ongena M., Jacques P., Toure Y., Destain J., Jabrane A., y Thonart P. 2005b. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 29-38.
- Pandey A, Sharma E, Palni L. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. Soil Biol Biochem 30: 379- 384.
- Peralta, E, 2011. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos (PRONALEG-GA), INIAP. Mejoramiento genético del fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador.
- Pérez H., P.; Esquivel E., G., et al. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de fréjol del altiplano subhúmedo de México. Caracas, Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)
- Ping L., y Boland W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. TRENDS in Plant Science. Polymeric Substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. Environ Sci Technol Rai SN, Gaur AC (1988) Characterization of *Azotobacter* spp. and effect of *Azotobacter* and *Azospirillum* as inoculant on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant Soil
- Robles, C. Informe Técnico de cultivos. Guayaquil: Sica-Magap, 2008
- Rodiño M., A. 2000. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis de doctorado. Pontevedra, España.
- Romero R., G. 2009. Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de nitrógeno de cepas de "*Rhizobium*", asociadas a Pueraria (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), como cultivo cobertura de la Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias. Santo Domingo, Ecuador.
- Silva, C., Vinuesa, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: El caso de los Rhizobios.

- Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis.
- Torres-Gutiérrez R. 2008. Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertationes de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven. 155 pp.
- Tsavkelova, A.; Klimova, S.; Cherdyntseva, T. and Netrusov A. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Applied Biochemistry and Microbiology
- Valladares. 2010. Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano.
- Weir, B. 2006. Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. School of Biological Sciences. The University of Auckland. New Zealand.
- Xia, Y.; MIN, G.; Rao, Z.; Luv, J.; Liu, X.; Duan, J. 2005. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. Biodegradation 16: 393–402. European y Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2004. Diagnostic protocols for regulated pest. Bulletin 34:155-157.
- Young, J.; Kuykendall, L.; Martínez, E.; Kerr, A.; Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 89–103. Consultado el 2 de Julio del 20015.
- Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M. y Oves M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. p 263-284.
- Zambre, M.; Konde, K.; Sonar, K. (1984) Effect of *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense* inoculation under graded levels of nitrogen on growth and yield of wheat. Plant Soil

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba de Tukey para los parámetros nodulación en condiciones de invernadero.

Tratamiento	NN	PFN	PSN
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10,2 <sup>a</sup>	0,0262ab	0,0036ab
<i>Sphingomonas sp.</i>	11,4 <sup>a</sup>	0,0288ab	0,0049ab
<i>Ralstonia sp.</i>	4,5 <sup>a</sup>	0,0039b	0,0004b
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> + <i>Rhizobium tropici</i>	14,4 <sup>a</sup>	0,0635 <sup>a</sup>	0,0077 <sup>a</sup>
<i>Sphingomonas sp.</i> + <i>Stenotrophomonas sp.</i>	11 <sup>a</sup>	0,0229ab	0,0031ab
<i>Ralstonia sp.</i> + <i>Rhizobium sp.</i>	5,9 <sup>a</sup>	0,0203ab	0,0023ab
<i>Rhizobium miluonense</i>	18 <sup>a</sup>	0,0360ab	0,0057ab
Control	12,3 <sup>a</sup>	0,0454ab	0,0071 <sup>a</sup>
Fertilización	2,9 <sup>a</sup>	0,0031b	0,0015ab

**Anexo 2.** Prueba de Tukey para los parámetros biomasa del cultivo: peso fresco de raíz, peso seco de raíz, peso fresco del follaje, y peso seco del follaje en condiciones de invernadero.

Tratamiento	PFR	PSR	PFF	PSF
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,30 <sup>a</sup>	0,16bc	3,69 <sup>a</sup>	0,56b
<i>Sphingomonas sp.</i>	1,19 <sup>a</sup>	0,20bc	3,86 <sup>a</sup>	0,71ab
<i>Ralstonia sp.</i>	1,73 <sup>a</sup>	0,14c	3,90 <sup>a</sup>	0,68ab
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> + <i>Rhizobium tropici</i>	2,05 <sup>a</sup>	0,20bc	3,97 <sup>a</sup>	0,66ab
<i>Sphingomonas sp.</i> + <i>Stenotrophomonas sp.</i>	2,12 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	4,09 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>
<i>Ralstonia sp.</i> + <i>Rhizobium sp.</i>	1,59 <sup>a</sup>	0,15bc	3,68 <sup>a</sup>	0,61ab
<i>Rhizobium miluonense</i>	1,91 <sup>a</sup>	0,23abc	4,26 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>
Control	20,83 <sup>a</sup>	0,24ab	4,15 <sup>a</sup>	0,72ab
Fertilización	1,33 <sup>a</sup>	0,18bc	4,38 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>



**Anexo 3.** Prueba de Tukey para los parámetros de nodulación en condiciones de campo.

Tratamiento	NN	PFN	PSN
T8	1,50 <sup>a</sup>	0,014535 <sup>a</sup>	0,00246 <sup>a</sup>
Control	1,20 <sup>a</sup>	0,02321 <sup>a</sup>	0,003275 <sup>a</sup>
TN11+T8	2,25 <sup>a</sup>	0,055535 <sup>a</sup>	0,00597 <sup>a</sup>
Fertilización	1,45 <sup>a</sup>	0,02357 <sup>a</sup>	0,005775 <sup>a</sup>
TN11	2,20 <sup>a</sup>	0,033585 <sup>a</sup>	0,00531 <sup>a</sup>

**Anexo 4.** Prueba de Tukey para los parámetros biomasa del cultivo: peso fresco de raíz, peso seco de raíz, peso fresco del follaje y peso seco del follaje en condiciones de campo

Tratamiento	PFR	PSR	PFF	PSF
T8	0,59 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	4,69ab	0,66ab
Control	0,56 <sup>a</sup>	0,105 <sup>a</sup>	3,50c	0,57b
TN11+T8	0,67 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	5,01 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>
Fertilización	0,505 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	3,84bc	0,6ab
TN11	0,955 <sup>a</sup>	0,105 <sup>a</sup>	3,05c	0,58b

**Anexo 5.** Prueba de Tukey para la variedad mantequilla sobre el rendimiento en toneladas por hectárea.

T8	95,325 a
Control,	53,875 a
TN11+T8	100,35 a
Fertilización	106,4 a
TN 11	91,325 a

**Anexo 6. Evidencia fotográfica del trabajo en laboratorio, invernadero y campo.**



**A)** Preparación del inóculo. **B)** Inoculación de las rizobacterias en condiciones de invernadero. **C)** Germinación de las plantas de fréjol en condiciones de campo. **D)** evaluación de parámetros de nodulación y biomasa. **E)** Exposición de resultados en el quinto ciclo de la carrera de Ingeniería Agronómica.