



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:

“Efecto de la inoculación de diferentes cepas de *Rhizobium*
sobre una variedad comercial de fréjol común nativa de la
provincia de Loja”

Tesis previo a la obtención
del título de Ingeniera
Agrónomo.

Autora:

Catherine Edith Ocampo Guaycha

Director:

Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

**Loja- Ecuador
2015**



CERTIFICACIÓN

Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.
DOCENTE INVESTIGADOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO

Que el trabajo de investigación titulado “EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium* SOBRE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE FRÉJOL COMÚN NATIVA DE LA PROVINCIA DE LOJA”, realizada por la egresada, CATHERINE EDITH OCAMPO GUAYCHA, previo a la obtención del Título de INGENIERA AGRÓNOMO, ha sido revisado y se autoriza su presentación final para la calificación correspondiente.

Loja, Diciembre del 2015

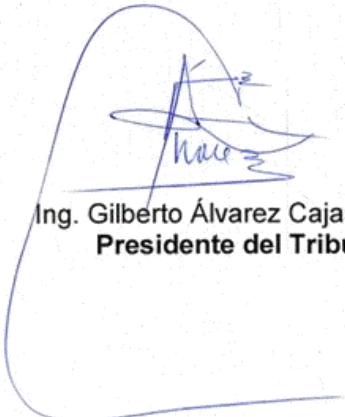

Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg. Sc.
DIRECTOR



CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los miembros del tribunal de tesis, luego de proceder a realizar y verificar las observaciones realizadas en el trabajo de investigación "EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium* SOBRE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE FRÉJOL COMÚN NATIVA DE LA PROVINCIA DE LOJA", de la egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica; Catherine Edith Ocampo Guaycha, ha sido revisada y en la misma se ha incorporado todas las sugerencias, por lo que aprobamos su impresión y publicación.


Loja, Diciembre del 2015



Ing. Gilberto Álvarez Cajas Mg. Sc.
Presidente del Tribunal



Dr. Roldan Torres Gutiérrez
Vocal del Tribunal



Ing. Ángel Robles Carrión Mg. Sc
Vocal del Tribunal

AUTORÍA

Yo, Catherine Edith Ocampo Guaycha, declaro ser la 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: Catherine Edith Ocampo Guaycha

Firma: 

Cédula: 1105033516

Fecha:

CARTA DE AUTORIZACIÓN

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

Yo, **Catherine Edith Ocampo Guaycha**, declaro ser autora de la tesis titulada: **“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium* SOBRE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE FRÉJOL COMÚN NATIVA DE LA PROVINCIA DE LOJA”** como requisito para optar al grado de: INGENIERA AGRÓNOMO, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que confines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visualidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los diez días del mes de diciembre del dos mil quince, firma la autora.

Autora: Catherine Edith Ocampo Guaycha

Número de cédula: 1105033516

Dirección: Orquídeas 27-13 entre Gardenias y Violetas

Correo electrónico: catherineocampog@gmail.com.

Teléfono: (593) 2104187

Celular: (593) 0993547214

Datos complementarios:

Directora de tesis: Ing. Klever Iván Granda Mora, Mg.Sc.

Tribunal de grado:

Ing. Gilberto Álvarez Cajas, Mg. Sc.

Dr. Roldan Torres Gutiérrez

Ing. Ángel Robles Carrión, Mg. Sc.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Nacional de Loja por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en sus aulas y a los docentes de la Carrera de Ingeniería Agronómica por su trabajo de excelencia.

A mi director de tesis, Ing. Kléver Iván Granda Mora, Mg.Sc, pilar fundamental en la construcción del presente trabajo, ya que su alta experiencia, ética y dinamismo me motivó durante todo el proceso investigativo, gracias de sobremanera por su experiencia, tiempo y dedicación.

No puedo dejar de reiterar el agradecimiento hacia mis padres y hermanos, por todo el cariño y apoyo; también a mi pequeña familia, Oscar y Sophia, por su amor y paciencia durante todo este tiempo. A mis tíos Nelly, Edwin y Mayra por ser un apoyo incondicional en mi crecimiento.

Infinitas gracias a mis amigos Shirley, María José y Rafael quienes hicieron más grata mi vida universitaria.

Y, a mis amigas del alma Michelle y Gisella por ser siempre amigas leales y sinceras.

Catherine Edith Ocampo Guaycha

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis amados padres Marco y Lelia por bríndame su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles; han sido mi referencia y modelo de valores, principios, carácter, empeño y perseverancia.

A mi Papito Viche(+) que ha sido el motor para conseguir cada uno de mis objetivos y a mi mamita Obdulia por todo su amor y ternura.

A mi hermano Augusto por ser mi amigo, por pasar momentos inolvidables y ser mi cómplice de travesuras.

A mi querida hermana Steph (+) que siempre estará presente en mis pensamientos y mi corazón, recordando cada unas de las cosas que vivimos juntas.

A Danny, que más que cuñada, es mi hermana, gracias por apoyarme siempre; a Cami, aunque aún no puedes leer, te dedico esta tesis por alegrarme mis días con tus ocurrencias y porque me has enseñado a crecer junto a ti.

A mi amado esposo Oscar, por su paciencia, comprensión, apoyo constante y su amor incondicional.

Y, a mi hija Sophia, por ser la razón y el amor de mi vida; porque tenerte me hace recordar que la vida continúa y que tú estarás aquí para que luchemos juntas. Te amo mi pequeña.

Catherine Edith Ocampo Guaycha

INDICE DE CONTENIDOS

AUTORÍA.....	ii
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades del fréjol.....	3
2.2. Taxonomía del fréjol	5
2.3. Morfología del fréjol	5
2.4. Fases fenológicas.....	8
2.5. Requerimientos edafo - climáticos	9
2.6. Importancia del nitrógeno	9
2.7. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)	10
2.8. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	12
2.9. Generalidades del <i>Rhizobium</i>	12
2.10. Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i>	14
2.11. Adhesión e infección de <i>Rhizobium</i>	15
2.12. Nodulinas del nódulo	16
2.13. Iniciación del nódulo	17
2.14. Auxinas.....	17
2.15. Sustancias sideróforas	18
2.16. Genética de la infección de las leguminosas por <i>Rhizobium</i>	18
2.17. Compuestos fenólicos en la testa del fréjol	20
2.18. Papel de los flavonoides en la interacción leguminosa– <i>Rhizobium</i>	21
2.19. Solubilización de fosfatos por <i>Rhizobium</i>	22
2.20. Bacterias del genero <i>Rhizobium</i> y sus aplicaciones a la agricultura.	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Descripción del área de estudio.....	24
3.1.1. Ubicación Política	24
3.1.2. Ubicación Geográfica	24
3.1.3. Ubicación ecológica.....	25
3.2. Materiales y equipos.....	25
3.2.1. Materiales.....	26
3.2.2. Equipos	26
3.3. Metodología.....	27
3.3.1. Metodología para el Primer Objetivo: "Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de <i>Rhizobium</i> "	27
3.3.2. Metodología para el Segundo Objetivo: "Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común"	28
3.3.3. Metodología para el Tercer Objetivo: " Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de <i>Rhizobium</i> sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas"	29
3. RESULTADOS	32
3.1. Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de <i>Rhizobium</i>	32
3.2. Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común.	34

3.3	Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de <i>rhizobium</i> sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas.	34
4	DISCUSIONES	42
5	CONCLUSIONES	46
6	RECOMENDACIONES	47
7	BIBLIOGRAFÍA	48
8	ANEXOS	56

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desarrollo del cultivo de fréjol (Hernández; 2009).	9
Figura 2. Ubicación geográfica de las áreas donde se realizaron los experimentos	25
Figura 3. Producción de auxinas (ácido 3-indol-acético) de cada cepa objeto de estudio. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.	33
Figura 4. Solubilización de fosfatos de cada una de las cepas objeto de estudio. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	33
Figura 5. Número de nódulos totales. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	36
Figura 6. Peso seco de los nódulos. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	36
Figura 7. Número de hojas en el cultivo de fréjol. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	38
Figura 8. Altura de planta en el cultivo de fréjol. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	38
Figura 9. Peso seco del follaje en el cultivo de fréjol, Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	40
Figura 10. Peso seco de la raíz en el cultivo de fréjol, Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD	40

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de fréjol que se cultivan en el Ecuador	4
Tabla 2. Fases y etapas fenológicas del cultivo de fréjol	8
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i>	14
Tabla 4. Compuestos obtenidos de la testa de fréjol var. Mantequilla	34
Tabla 5. Contenido de nitrógeno total en fréjol común var. Mantequilla.	41

**“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium*
SOBRE UNA VARIEDAD COMERCIAL DE FRÉJOL COMÚN NATIVA DE LA
PROVINCIA DE LOJA.”**

RESUMEN

Sabiendo que el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es una de las leguminosas que menor cantidad de nitrógeno fija al suelo de manera natural mediante la inoculación de la bacteria *Rhizobium*, se pretende estimular esta simbiosis *Leguminosa-Rhizobium*. Se planteó determinar el efecto de la inoculación de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos, fisiológicos y fijación de N en una variedad comercial de fréjol común nativa de la provincia de Loja. Así mismo, se cuantificó la producción de auxinas, con el método colorimétrico usándo el reactivo Salkowski y la solubilización de fosfatos por medio de la inoculación por estrías en medio de cultivo Pikovskaya modificado. Se determinaron los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común por medio del solvente de extracción propuestos por Xu (2007). Finalmente, se evaluó el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común bajo condiciones controladas, utilizando un diseño experimental totalmente aleatorio con 5 réplicas bajo invernadero. Se utilizaron 32 aislados de *Rhizobium* y un genotipo de fréjol (mantequilla), determinando que las cepas *Rhizobium leguminosarum*, son capaces de producir cantidades significativas de auxinas: 140,45 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y la cepa *Rhizobium mesoamericanum* de solubilizar fosforo inorgánico formando un halo de 2,98 mm. Los compuestos fenólicos encontrados en la testa de fréjol común corresponden a, carbohidratos, alcaloides, y saponinas. La inoculación de la cepa *Rhizobium uncultured* obtuvo 3,17% de fijación de N total en el follaje de la planta. La cantidad de nódulos a los 21 días después de la siembra (DDS) fue de 107,6 nódulos en la cepa de *Rhizobium mesoamericanum*; el peso seco de los nódulos fue de 81,82 g con la inoculación de *Rhizobium tropici*. El análisis de la biomasa se realizó a los 7, 15 y 21 DDS, a los 7 DDS el 10% de los tratamientos presentan como promedio 1 hoja, mientras que el 90% de las semillas germinadas tuvo 2 hojas. A los 15 DDS se observó la variación en la fase vegetativa, el 15% de los tratamientos presentaron 3 hojas; mientras que el 85% presentó en promedio 5 hojas. A los 21 DDS el 15% de los tratamientos tienen en promedio 6 hojas, frente al resto de tratamientos 85% que tienen 8 hojas en promedio. La altura de las plantas a los 7, 15 y 21 DDS fue de 4,2; 11,7 y 16,8 cm, respectivamente. El peso seco de la raíz (PSR), el tratamiento *Rhizobium mesoamericanum* obtuvo 283,6 g. Los resultados de esta investigación contribuyen a la evaluación de parámetros fenológicos de las diferentes cepas de *Rhizobium*, adicionalmente, se aportan elementos que permitirán reconsiderar el potencial sobre la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de fréjol común.

1. INTRODUCCIÓN

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es una planta perteneciente a la familia Fabaceae, distribuidas ampliamente por todo el mundo. Este grano es una fuente de proteína mucho más que el resto de vegetales; su adaptabilidad está entre los 800-2.500 msnm, se cultiva en valles y estribaciones en los cuales podemos encontrar diferentes tipos de suelos y climas (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, Ecuador, 2010). El alto contenido de proteínas, minerales y compuestos antioxidantes de su grano, hace del fréjol un cultivo clave para la salud y seguridad alimentaria en países en desarrollo (Sánchez *et al.*, 2014).

Las plantas leguminosas como el fréjol común son capaces de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) a través de la simbiosis con bacterias del suelo conocidas comúnmente como rizobios, contribuyendo a la nutrición y desarrollo de las plantas en suelos deficientes de nitrógeno (Drevon *et al.*, 2001 y Ribeiro *et al.*, 2015). Sin embargo, la cantidad de nitrógeno fijado en condiciones de campo es, a menudo, baja en comparación a la fijada en condiciones óptimas con otras leguminosas, tales como: arveja que fija 125 a 185 kg de N ha⁻¹ (Prieto, 2012), el chocho 400 a 900 kg de N ha⁻¹ (Peralta y Caicedo, 2001) y el haba 150 a 500 kg de N ha⁻¹ (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria ASERCA, 2000).

Las cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* han mostrado una considerable diversidad genética, lo cual sugiere que diferentes cepas de rizobios pueden asociarse en las raíces del fréjol común, siendo esta asociación uno de los factores principales de las bajas tasas de fijación de N en esta leguminosa (Granda, 2009). A nivel global, diferentes investigaciones se han llevado a cabo para determinar la eficiencia de la FBN de los rizobios en cultivos de *P. vulgaris* (Díaz, 2010). Sin embargo, la determinación del efecto que puedan ejercer estos microorganismos sobre los parámetros fenotípicos de las leguminosas, especialmente en fréjol común, son escasos y no se conoce lo suficiente sobre la compatibilidad, especificidad y eficacia de los rizobios en

la formación de nódulos, promoción de biomasa y fijación de N con su planta huésped (Soto, 2013).

Teniendo en cuenta estos aspectos, es de singular importancia la búsqueda de aislados prominentes de la bacteria *Rhizobium* que mejoren la simbiosis con fréjol común, y por ende aspectos de la FBN. Además, es una alternativa para que la planta incremente el N disponible por medio de la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno, debido a que estas bacterias convierten el N₂ (dinitrógeno atmosférico) en NH₄ (Amonio), y es otra manera de reducir la degradación ambiental por efectos de fertilización química, y con ello obtener alimentos más saludables dando valor agregado al producto (Díaz, 2010).

En Ecuador son escasas las investigaciones relacionadas a la eficiencia de la FBN en fréjol y otras leguminosas. Se han realizado algunas investigaciones en la Universidad Central del Ecuador, Escuela Politécnica de Chimborazo, INIAP, pero ninguna de estas relacionadas al fréjol, razón por la cual esta investigación aporta información respecto a la FBN en fréjol, y la importancia de su biofertilización.

Por tal motivo, el objetivo general planteado en el presente trabajo fue, determinar el efecto de la inoculación de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos, fisiológicos y fijación de N en una variedad comercial de fréjol común.

Los objetivos específicos planteados en la investigación fueron:

- Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*.
- Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común.
- Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del fréjol

Las leguminosas son plantas dicotiledóneas que pertenecen a la familia Fabaceae, que comprende 750 géneros y 16.000 – 19.000 especies, de las cuales sólo 60 especies están domesticadas y ampliamente distribuidas en todo el mundo. (Hoover y Zhou, 2003; Hedley, 2001).

Los estudios indican que el fréjol común, es originario del continente Americano, se han encontrado evidencias, con antigüedad de 5.000 a 8.000 años, en algunas regiones de México, Estados Unidos y Perú. Hay evidencias que en toda Mesoamérica se sembraban los cultivos de fréjol, que constituyó la principal fuente de alimentación de las culturas que habitaron esta región, desde hace más de 8.000 años (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas FENALCE, 2010). Además es uno de los más importantes debido a su amplia distribución en los 5 continentes, por ser complemento nutricional y por ser una principal fuente de proteína que es indispensable en la dieta alimenticia, especialmente en países latinoamericanos, tanto así que según la FAO ocupa el octavo lugar entre las leguminosas sembradas en el planeta. El fréjol ha sido un elemento tradicionalmente importante en América Latina (FAO, 2011).

En el Ecuador, principalmente en la región sierra, las leguminosas son componentes de los sistemas de producción, ya que son cultivadas en asociación, intercaladas, en monocultivos o en rotación con otros cultivos; por tal motivo juega un papel muy importante en el manejo sostenible de la agricultura y la alimentación, por lo que genera empleo, alimento e ingresos económicos a pequeños, medianos y grandes agricultores, que tratan de satisfacer la demanda interna y externa (Estévez, 2008).

En el Ecuador, el fréjol ocupa el primer lugar en producción y consumo entre las leguminosas de grano comestible para consumo humano, las zonas productoras de fréjol arbustivo se localizan tanto en valles, como en las

estribaciones de la cordillera, a alturas que oscilan entre los 1.000 y 2.500 msnm y en los valles entre los 800 y 1.200 msnm (INIAP, 2010). Según el (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos – Encuestas de Superficie y Producción Agropecuaria Continua INEC-ESPAC, 2014), la superficie cultivada de esta leguminosa a nivel nacional es de 44.603 ha y la producción que se obtiene es de 30.468 TM; y en la provincia de Loja, la producción de fréjol abarca 2.271 ha con un rendimiento de 1.036 TM.

Cabe mencionar que las siembras se realizan durante los meses de febrero a abril y septiembre a noviembre en los valles, mientras que para las estribaciones se las realiza en los meses de mayo a julio, por lo que de manera general se puede consumir fréjol durante casi todo el año, como es de suponerse los pico de cosecha están localizados en los meses de junio-julio-agosto es decir cuando salen las siembras de los valles en cuanto a fréjol seco se refiere, mientras que para fréjol verde (tierno o vainita) el pico de cosecha alcanza su máximo en los meses de abril y mayo (INIAP, 2010).

Las variedades que actualmente se cultivan en el Ecuador son:

Tabla 1. Variedades de fréjol que se cultivan en el Ecuador

Nombre	Hábito *	Color de grano
INIAP 414 Yunguilla	I	Rojo moteado
INIAP 418 Jema	II	Rojo moteado
INIAP 420 Canario del Chota	I	Amarillo
INIAP 422 Blanco Belén	I	Blanco
INIAP 423 Canario	I	Amarillo (canario)
INIAP 424 Concepción	I	Morado moteado
INIAP 425 Blanco Fanesquero	I	Blanco
INIAP 427 Libertador	I	Rojo moteado
INIAP 428 Canario Guarandeño	II	Amarillo
INIAP 429 Paragachi andino	II	Rojo moteado con crema
INIAP 430 Portilla	I	Rojo moteado
INIAP 480 Rocha	I	Amarillo (canario)
INIAP 481 Rojo del Valle	II	Rojo moteado
INIAP 482 Afroandino	II	Negro
Mantequilla	II	Crema mediano

* Hábito de crecimiento I= determinado arbustivo, florece de arriba hacia abajo, Hábito de crecimiento II= indeterminado arbustivo, con una guía pequeña, florece de abajo hacia arriba.

Cabe anotar que existen otras variedades, pero que conforme se han ido realizando mejoras a las que mayormente demanda el mercado, estas han ido desapareciendo de una manera paulatina (INIAP, 2010).

2.2. Taxonomía del fréjol

Desde el punto de vista taxonómico esta especie se clasifica de la siguiente manera, Aguilar 2012.

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia:	<i>Faboidea</i>
Tribu:	<i>Phaseoleae</i>
Subtribu:	<i>Phaseolinae</i>
Género:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>vulgaris</i>
Variedad:	Mantequilla

2.3. Morfología del fréjol

Según Debouck, 1984 menciona que el estudio de la morfología del fréjol se divide en:

Raíz: La primera etapa del sistema radical está formada por la radícula del embrión, la cual se convierte posteriormente en la raíz principal o primaria. A los pocos días de la emergencia de 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 pelos absorbentes, los cuales se encuentran en todos los puntos de crecimiento de la raíz. El sistema radicular tiende a ser fasciculado, fibroso y en algunos casos pivotantes en un bajo porcentaje. En general, el sistema radical es superficial, ya que el mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 20 centímetros de profundidad del suelo.

Tallo: puede ser identificado como el eje central de la planta el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos. Se origina del meristemo apical del embrión de la semilla; desde la germinación y en las primeras etapas de desarrollo de la planta, este meristemo tiene fuerte dominancia apical y en su proceso de inserción de las hojas en el tallo.

El tallo es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, debido a pequeñas corrugaciones de la epidermis. Puede ser, semipostrado o postrado, según el hábito de crecimiento de la variedad; pero en general el tallo tiende a ser vertical ya sea que el fréjol crezca sólo o con soporte. En cuanto a la pilosidad, el tallo puede ser subglabro y pubescente. Se puede encontrar pelos cortos o pelos largos, o de ambos tamaños; pero siempre se encuentran pelos pequeños en forma de gancho, llamados pelos uncinulados fácilmente observables en las partes jóvenes. Puede ser de crecimiento determinado o indeterminado. Cuando es de crecimiento determinado las plantas son enanas y de tallos erectos de 20 a 60 cm de alto, y cuando son de crecimiento indeterminado, las plantas tienen un tutor y alcanzan de 2 a 3 metros de longitud.

Hojas: son de dos tipos simples y compuestas. Están insertadas en los nudos del tallo y las ramas. En dichos nudos siempre se encuentran estípulas que constituyen un carácter importante en la sistemática de las leguminosas. Las

hojas simples aparecen en el segundo nudo del tallo y se forman en la semilla durante la embriogénesis. Son opuestas, cordiformes, unifoliadas, auriculadas, simples y acuminadas. Estas caen antes de que la planta esté completamente desarrollada. Las estípulas son bífidas al nivel de las hojas primarias. Las hojas compuestas trifoliadas son las hojas típicas del fréjol. Tienen tres folíolos, un pecíolo y un raquis. Tanto el pecíolo como el raquis son acanalados. El folíolo central o terminal es simétrico y acuminado; los dos laterales son asimétricos y también acuminados. Los folíolos son enteros; la forma tiende a ser ovalada a triangular, principalmente cordiformes, pero sin aurículas; son glabros o subglabros.

Inflorescencia: Las inflorescencias pueden ser terminales o axilares. Desde el punto de vista botánico, se consideran como racimos de racimos, es decir, un racimo principal compuesto de racimos secundarios, los cuales se originan de un complejo de tres yemas (tríada floral) que se encuentra en las axilas formadas por las brácteas primarias y el raquis. En la inflorescencia se pueden distinguir tres componentes principales: el eje de la inflorescencia que se compone de pedúnculo y de raquis, las brácteas primarias y los botones florales.

Flor: La flor del fréjol es una flor papilionácea. En el proceso de desarrollo de dicha flor se pueden distinguir dos estados; el botón floral y la flor completamente abierta. El botón floral, bien sea que se origine en las inserciones de un racimo o en el desarrollo completamente floral de las yemas de una axila, en su estado inicial está envuelto por bractéolas que tienen forma ovalada o redonda. En su estado final, la corola que aún está cerrada sobresale y las bracteolas cubren solo el cáliz.

Fruto: es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Dos suturas aparecen en la unión de las valvas; una es la sutura dorsal, llamada placentar; la otra sutura se denomina sutura ventral. Los óvulos, que son las futuras semillas, alternan en la sutura placentar; en consecuencia, las semillas también alternan en las dos valvas. Tienen una epidermis en ocasiones cerosa, pueden ser de diversos colores, uniformes o

con rayas, existiendo una diferencia entre las vainas jóvenes o en estado inmaduro, las vainas maduras y las vainas completamente secas. El color depende de la variedad. Estas vainas pueden medir de 10-20 cm dependiendo de la variedad.

Semilla: es exalbuminosa es decir que no posee albumen, por lo tanto las reservas nutritivas se concentran en los cotiledones. Se origina de un óvulo campilótropo. Puede tener varias formas: cilíndricas, a riñonadas, esféricas u otras. Las semillas tienen una amplia variación de color (blanco, rojo, crema, negro, café, otras), forma y brillo. Cada vaina puede contener de 3 a 8 semillas.

2.4. Fases fenológicas

Se refiere a la sucesión de las diferentes etapas de la planta o de uno de sus órganos, durante su desarrollo o ciclo biológico. La sucesión y duración de las diferentes etapas aunque están determinadas genéticamente en cada variedad se ven afectadas en cierto grado por las condiciones del medio, siendo los factores del clima como temperatura, humedad, duración e intensidad de la luz, los más importantes (Hernández; 2009).

Tabla 2. Fases y etapas fenológicas del cultivo de fréjol

Fase	Etapas	Código	Días
Vegetativa	Germinación	V0	0-5
	Emergencia	V1	5-7
	Hojas primarias	V2	7-11
	Primera hoja trifoliada	V3	11-16
Reproductiva	Tercera hoja trifoliada	V4	16-23
	Prefloración	R5	23-32
	Floración	R6	32-36
	Formación de vainas	R7	36-44
	Llenado de vainas	R8	44-62
	Maduración	R9	62-77

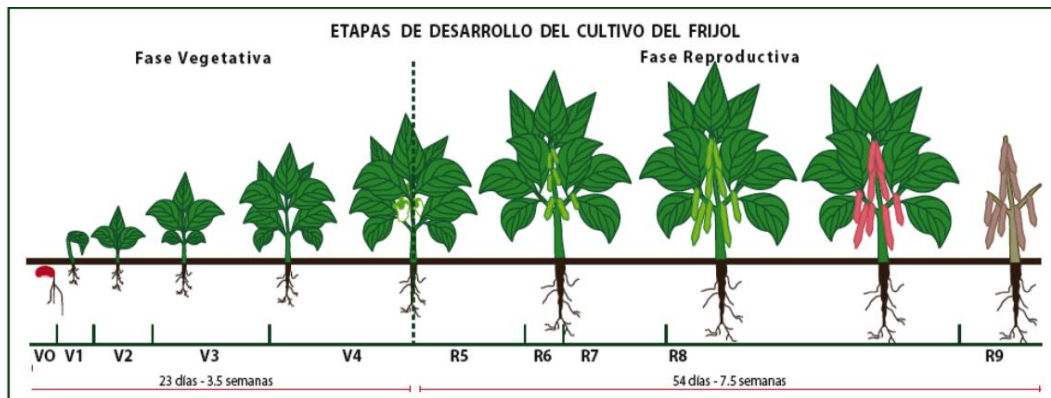


Figura 1. Etapas de desarrollo del cultivo de fréjol (Hernández; 2009).

2.5. Requerimientos edafo - climáticos

En el Ecuador las zonas productoras de fréjol, está localizado en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Bolívar y Loja, el requerimiento en cuanto a la altitud es 2.000 - 2.900 msnm. El suelo apto para el desarrollo de este cultivo es el franco, suelto, permeable con buen drenaje con un pH entre 5,5 - 6,8. Se desarrolla en zonas con temperaturas que van de 13 a 26 °C con una pluviometría de 800 – 2.000 mm anuales (Quishpe, 2012).

2.6. Importancia del nitrógeno

El nitrógeno es el principal elemento de la atmósfera. Es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros (Baca *et al.*, 2000). Sin embargo la mayoría de los seres vivos no pueden utilizar el nitrógeno atmosférico para elaborar aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, dependen del nitrógeno presente en los minerales del suelo, por lo tanto, a pesar de la gran cantidad de nitrógeno en la atmósfera, la escasez de nitrógeno en el suelo constituye un factor limitante para el crecimiento de los vegetales (Obando, 2012).

Las plantas usan nitrógeno mediante la absorción de iones de nitrato o amonio a través de las raíces, el nitrógeno es transportado fácilmente a través de la planta a partir de tejidos mayores a los tejidos más jóvenes. De manera que, una planta deficiente en nitrógeno mostrará amarilleo en las hojas más

viejas debido al subdesarrollo o destrucción de los cloroplastos y la ausencia de la clorofila verde pigmentado (Díaz, 2010).

Angus y colaboradores en el 2013 mencionan que en el suelo existe más del 90% del nitrógeno disponible en formas orgánicas, ya sea en residuos vegetales, animales, en materia orgánica del suelo o en los organismos del suelo, tales como bacterias vivas. Este nitrógeno, generalmente, no está disponible para las plantas, este se debe convertir a cualquiera de los dos compuestos orgánicos solubles, tales como aminoácidos o formas inorgánicas, como el amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), antes de que pueda ser utilizado por las plantas, este proceso se lo puede convertir en formas disponibles por microorganismos, como *Rhizobium* por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (Angus *et al.*, 2013).

2.7. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

La FBN es el mecanismo principal de aporte de N en los ecosistemas naturales y es muy importante en la Agricultura (Baca *et al.*, 2000). Es el proceso a través del cual los microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable; Puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Tronco, 2013).

La fijación biológica de nitrógeno se estima que aporta a los ecosistemas terrestres unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año, de esta cantidad 175 millones de toneladas se fijan mediante la fijación biológica, de las cuales 35 se fijan mediante fijación en vida libre y 140 mediante fijación simbiótica (Mayz, 2004).

La FBN es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general:



Esta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol de H₂ producido por mol de N₂ reducido. La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos como tasa respiratoria y protección conformacional, que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Mayz, 2004).

Freire (2012) menciona que para que tenga lugar la reducción de nitrógeno se necesita la presencia de ambos componentes, energía biológica en forma de adenosín trifosfato (ATP), iones de magnesio, poder reductor, protones y un ambiente anaerobio, debido a que la dinitrogenasa es inactivada en presencia de oxígeno. La fijación de nitrógeno consume una elevada cantidad de energía, aproximadamente 28 moléculas de ATP por molécula de luz nitrógeno reducida, que los microorganismos fotosintéticos obtienen de la energía solar.

La capacidad de los microorganismos de fijar nitrógeno se detecta mediante la prueba de la reducción del acetileno. Esta prueba se basa en que dicha función permite la disipación del poder reductor, mediando la expulsión de H₂. Esta creencia se basa en que la enzima nitrogenasa reduce además de nitrógeno molecular, otros sustratos como acetileno (C₂H₂), acidas y HCN (Covelli, 2013).

Otro método es tomar las diferencias en la acumulación de N total o el rendimiento de materia seca (MS) entre plantas fijadoras y no fijadoras (Campillo, 2003).

Las técnicas isotópicas del ¹⁵N se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones globales de la FBN, que permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y entregan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa - *Rhizobium* dado (Campillo, 2003).

2.8. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

En los sistemas agrícolas de subsistencia, el nitrógeno es un macronutriente esencial para el buen desarrollo de las plantas; es utilizado en forma de nitrato o amonio, las bacterias del género *Rhizobium* poseen la capacidad de fijar el nitrógeno, mediante una relación de simbiosis con leguminosas (Soto, 2013). La simbiosis es el resultado de la interacción muy específica entre la planta y la bacteria esto no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico, sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Baca *et al.*, 2000).

Durante la simbiosis, la planta suministra nutrientes y protección a los *Rhizobium* a cambio de nitrógeno atmosférico fijado a las leguminosas, debido que contribuyen a aumentar la fertilidad de los suelos a través de la fijación de nitrógeno; se estima que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa puede fijar de 24 hasta más de 584 kg de nitrógeno ha⁻¹ y abastecer en algunos casos hasta 90% de las necesidades de las plantas (Hernández, 2012). Lo cual es altamente importante en los países de América, donde la deficiencia de nitrógeno es uno de los factores que más limitan la producción de cultivos (Arias *et al.*, 2007). Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas (En Tao Wang, 2001).

Se estima que la simbiosis que existe entre leguminosa y *Rhizobium* pueden fijar entre un 80 al 100 % de las necesidades de nitrógeno de la planta de fréjol, tanto en su desarrollo vegetativo como en el incremento de sus rendimientos entre 3 y 5% (Pérez, 2011).

2.9. Generalidades del *Rhizobium*

Son bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, bacilos móviles Gram negativos, miden de 0,5 a 0,9 por 1,2 a 3,0 µm, a menudo contiene gránulos de β- hidroxibutirato y son pleomorfos en situaciones adversas. Es considerado

un habitante prominente de la rizosfera. *Rhizobium* sp., infecta y forma nódulos en huéspedes específicos, porque la bacteria contiene un plásmido grande que codifica la información que no se utiliza cuando crece en el suelo como organismo de vida libre, pero por otra parte, es vital para infectar a la planta huésped susceptible (Hernández *et al.*, 2012).

El *Rhizobium* que fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha añadido como inoculante durante 105 años a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos, la carencia de equipos y tecnologías adecuadas para caracterizar y clasificar a los *Rhizobios* limitaron enormemente a los científicos en épocas pasadas; no obstante, parte de la información que se tiene acerca del fenotipo y genotipo de los *Rhizobios* descansa en los resultados de las investigaciones llevadas a cabo hace más de 60 años (Villanueva, 2012). En la actualidad, la taxonomía de los *Rhizobios* se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos, y no se pueden adelantar estudios de tipo genético si no se han identificado sus propiedades fenotípicas. Se estima que los *Rhizobios* no conocidos en el mundo representan un recurso biológico porque las leguminosas son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y se encuentran distribuidas en distintos ecosistemas (Cuadrado, 2009).

En la descripción del fenotipo de estas bacterias se reportan características morfológicas y de colonias, bioquímicas, fisiológicas, patrones de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y resistencia a antibióticos, entre otras, estos datos se evalúan normalmente por un análisis de agrupamiento, la taxonomía numérica, lo cual puede ofrecer una visión detallada de la variación de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies y reconocer rasgos característicos de cada especie (Cuadrado, 2009).

La bacteria *Rhizobium* puede sobrevivir en el suelo en ausencia de leguminosas, aunque su población es generalmente más alta cuando se encuentran presentes las plantas hospedantes. Aunque algunas células bacterianas sobreviven a temperaturas más altas que las normales en el suelo,

la temperatura de la superficie puede limitar la población de las especies más susceptibles (Cuadrado, 2009). Temperaturas altas pueden reducir la supervivencia en más de 99 %, 24 horas después de la inoculación (Cuadrado, 2009). Los *Rhizobium* son mesófilos pero algunos pueden soportar bajas temperaturas de hasta 5 °C, y otras temperaturas de hasta 40 °C (Atlas R. y Bartha, R. 2008). Suelos con pH ácido o muy alcalino conduce a una pobre supervivencia de los *Rhizobium*, de igual forma, la deficiencia o el exceso de humedad puede abatir considerablemente la población de *Rhizobium* (Atlas R. y Bartha, R. 2008). La cantidad de nitratos en el suelo, es un factor importante y puede afectar a la expresión de la fijación de nitrógeno, si los nitratos están bajos, lo más seguro es que la fijación se exprese, pero si están altos, puede inhibirse la nodulación y la fijación de nitrógeno, esto se debe a que el nitrato del suelo es un inhibidor de la fijación de nitrógeno (Atlas R. y Bartha, R. 2008).

2.10. Clasificación taxonómica de *Rhizobium*

Según Weir, BS (2015), se encuentra dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Rhizobium*

Filum	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Alphaproteobacteria
Familia	Rhizobiaceae
Género	Rhizobiaceae
	<i>Rhizobium alamii</i>
	<i>Rhizobium alkalisoli</i>
	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i>
	<i>Rhizobium daejeonense</i>
	<i>Rhizobium endophyticum</i>
	<i>Rhizobium etili</i>
	<i>Rhizobium galegae</i>
Especies	<i>Rhizobium gallicum</i>
	<i>Rhizobium giardinii</i>
	<i>Rhizobium hainanense</i>
	<i>Rhizobium HERBAE</i>
	<i>Rhizobium huautlense</i>
	<i>Rhizobium indigoferae</i>
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	<i>Rhizobium loessense</i>

Rhizobium lusitanum
Rhizobium mesosinicum
Rhizobium miluonense
Rhizobium mongolense
Rhizobium multihospitium
Rhizobium oryzae
Rhizobium phaseoli
Rhizobium pisi
Rhizobium tibeticum
Rhizobium tibeticum
Rhizobium sullae
Rhizobium tropici
Rhizobium tubonense
Rhizobium undicola
Rhizobium vignae
Rhizobium yanglingense

2.11. Adhesión e infección de *Rhizobium*

Para que se realice el proceso de adhesión e infección es importante tener en cuenta a la rizósfera que es una porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. De hecho, las características físico-químicas de dicha región hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos de los cuales los más abundantes son las bacterias, en gran parte propiciado por la presencia de los exudados de la planta ricos en compuestos carbonados (Redondo *et al.*, 2014).

Según Almaraz Suárez y Ferrera Cerrato, (2007) los *Rhizobios* invaden los pelos radicales e inducen la formación de nódulos, estructuras especializadas en donde el nitrógeno molecular es reducido a amonio, la planta toma el nitrógeno reducido y la bacteria recibe a cambio carbohidratos y otros nutrimentos. La fijación del nitrógeno inicia cuando el nódulo alcanza su madurez, que puede ser entre 15 y 20 después de la infección.

Las raíces de las leguminosas secretan distintos compuestos orgánicos que estimulan el crecimiento de una microbiota variada en la rizósfera, en la superficie de los *Rhizobium* se encuentra una proteína específica de adhesión

denominada ricadhesina, en el proceso también intervienen otras sustancias como las glucoproteína llamadas lectinas y receptores específicos de la membrana citoplasmática de la planta (Madigan *et al.*, 2009).

Si se produce la adhesión las células del *Rhizobium* penetran en los pelos radicales induciendo a la formación de tubo de celulosa en la planta que se denomina tubo de infección que desciende por el pelo radical, dando lugar a la formación de bacteroides, estos quedan rodeados por porciones de la membrana de la célula vegetal y forman una estructura denominada simbiosoma, la cual da comienzo a la fijación del nitrógeno (Madigan *et al.*, 2009). Al final del proceso, los sistemas vasculares del nódulo y del tejido radical se juntan completando así la formación del nódulo (Almaraz Suárez y Ferrera Cerrato, 2007).

2.12. Nodulinas del nódulo

Tanto el desarrollo como la función nodular dependen de la expresión de los genes específicos de la bacteria y de la planta (Olivares, 2008). Un gran número de genes de la planta son específicamente inducidos durante la formación del nódulo. Los productos de estos genes, denominados nodulinas, son definidos como proteínas vegetales órgano – específicas inducidas o producidas a considerables niveles durante proceso de infección o fijación de nitrógeno (Carpio, 2014).

En la simbiosis leguminosa – *Rhizobium*, los genes de las nodulinas difieren en su distribución dentro del nódulo, así como en el tiempo en el cual se expresan (Espinosa D., 2007). De esa forma, las nodulinas se clasifican en nodulinas tempranas y nodulinas tardías. Los genes de las nodulinas tempranas se expresan antes de que ocurra la fijación de nitrógeno, mientras que la expresión de los genes de las nodulinas tardías se detecta una vez que se ha establecido la fijación de nitrógeno. Las nodulinas tempranas pueden estar involucradas en la formación del nódulo o en el proceso de infección, mientras que las nodulinas tardías deben estar involucradas en el establecimiento y mantenimiento del ambiente dentro del nódulo que hace posible la fijación de nitrógeno (Espinosa D., 2007).

2.13. Iniciación del nódulo

Básicamente, sobre las raíces de las leguminosas herbáceas se forman dos tipos de nódulos: indeterminados y determinados. El tipo de nódulo depende de la leguminosa hospedera y no de la cepa bacteriana (Espinosa D; 2007). En leguminosas de zonas tropicales, como soya, fréjol, el primordio nodular se forma a partir de divisiones celulares del córtex radical externo. En este caso, los nódulos formados son determinados o esféricos, debido a que estos no presentan un meristemo nodular persistente. En los nódulos determinados, las divisiones celulares cesan temprano durante el desarrollo del nódulo, así la forma final del nódulo se debe al alargamiento celular más que a la división celular (Espinosa D; 2007). La eficacia de los nódulos para fijar nitrógeno va asociada con la presencia de un pigmento rojo en los nódulos. Esta coloración ligeramente rosada puede ser observada con claridad cuando se cortan los nódulos en dos mitades, la misma es una hemoproteína bastante parecida a la sangre de los mamíferos, se denomina leghemoglobina (Cuadrado, 2009).

2.14. Auxinas

Las auxinas conforman un grupo dentro de los reguladores de crecimiento vegetal que se caracterizan por estimular el alargamiento celular y son producidas en condiciones naturales por ciertos tejidos vegetales y también por algunos microorganismos (Bautista, 2008).

El ácido indól acético constituye el ejemplo de auxina más importante por su amplia aplicación en la agricultura entre las que se destacan: estimulación de la división celular, iniciación de la formación de raíces, iniciación de la floración, aumento del rendimiento entre otros (Altuna, 2006). Se conoce que numerosos microorganismos como *Rhizobium* producen esta fitohormona en la rizósfera y fuera de ésta en la biorreacción, tanto en lo referente a variables nutricionales como físico-químicas (Altuna, 2006).

2.15. Sustancias sideróforas

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular secretados por las raíces de las plantas y las bacterias que actúan capturando elementos, como el hierro, en la rizósfera (Loredo, 2004). La producción de sideróforos se ha asociado con diversas bacterias de vida libre, las mismas que tiene capacidad para producir pioverdina (sideróforo fluorescente que es producido por la bacteria en condiciones de deficiencia de hierro o de otros metales, en condiciones de pH bajo, o como agente inhibidor de varios hongos fitopatógenos); la producción de pioverdina puede ser estratégica en la rizósfera, no sólo para el abastecimiento de hierro, sino, también, como una defensa contra otros microorganismos. La síntesis de sideróforos está relacionada con la síntesis de varias proteínas de la membrana, algunas de las cuales están involucradas probablemente en el transporte de hierro (Loredo, 2004).

2.16. Genética de la infección de las leguminosas por *Rhizobium*

Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas leguminosas poseen toda la información genética necesaria para que en conjunción con la planta desarrollar la formación de unas estructuras especializadas denominadas nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno atmosférico es reducido amonio y en esta forma asimilado por la planta, en el género *Rhizobium* la mayor parte de esta información genética se encuentra asociada a plásmidos de muy alto peso (Fernández, 1994).

La infección de la raíz y el desarrollo del nódulo incluyen la colonización del área cercana a la raíz conocida como rizósfera, su enlace con la raíz al sitio de la infección y la absorción de flavonoides de la planta por el *Rhizobium*, estas acciones modifican la expresión genética para iniciar la producción de factores específicos para que ocurra la infección y la nodulación (Acosta, 2000). Existen dos mecanismos de infección. En uno, *Rhizobium* invade los pequeños pelos radicales que inician el crecimiento causándoles un enrollamiento del pelo que encierra a una microcolonia de *Rhizobium*, de esta manera induce la producción de un hilo de infección con la célula del pelo radical el hilo de

infección crece en las células corticales de la raíz llevando al *Rhizobium*, el otro, ocurre a través de las células epidérmicas, las cuales no han formado pelos radicales, usualmente en el rompimiento de la integridad de la corteza causada por la emergencia de una raíz lateral, *Rhizobium* invade la raíz creciendo en los espacios intercelulares, una microcolonia causa el adelgazamiento de la pared de células corticales y crece alrededor de la bacteria, depositando materiales de la pared celular en la superficie interna de la pared y la bacteria parece crecer a través de esta barrera (Paredes, 2013).

El fréjol tiene la información genética para la infección simbiótica y para la nodulación, el papel de *Rhizobium*, en éste caso, es el de disparar el proceso, los genes de nodulación se definen como aquellos genes del *Rhizobium* que son necesarios para la nodulación (Paredes, 2013).

A los genes de nodulación se los llama genes nod de modo general, aunque comprenden genes designados como nod, nol y noe. Estos genes están agrupados en plásmidos o en una región del cromosoma. Los plásmidos que contienen la información para la asociación se llaman plásmidos pSym y en ellos se encuentran los genes responsables de la nodulación (genes nod) y los de la fijación de nitrógeno (genes nif y fix), se pueden distinguir cinco grupos de genes involucrados en la fijación del nitrógeno a nivel de la bacteria (Paredes, 2013).

- Genes “nod comunes”: nod ABC. Son genes imprescindibles para la nodulación. Su ausencia impide el proceso de infección.
- Genes “nod específicos”: nodFE, nodH, nodPQ. Son los responsables de la especificidad de huésped. Mutaciones entre ellos alteran o amplían el rango de especificidad.
- Genes responsables de la síntesis del exopolisacárido (exo), del lipopolisacárido (lps), de glucanos y de polisacáridos capsulares (antígenos K). Los productos de estos genes son importantes para la formación de los canales de infección.
- Genes que permiten una ocupación más eficiente del nódulo.

- Genes que permiten la infección de un tipo determinado de genotipo de planta (Paredes, 2013).

2.17. Compuestos fenólicos en la testa del fréjol

Sánchez, 2008 menciona que los compuestos fenólicos son sustancias químicas con estructura que consiste en un núcleo aromático con al menos un sustituyente hidroxílico libre o sustituido. Se diferencian de otros compuestos, que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético. Los vegetales acumulan compuestos fenólicos como parte de su adaptación evolutiva a la tierra. Dichos compuestos cumplen diversas funciones:

- Función estructural a nivel de pared celular
- Moléculas de defensa
- Pigmentos y aromatizantes de flores

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Paladino, 2009). Se localizan en todas las partes de las plantas y su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente (Paladino, 2009). Los fenoles están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Paladino, 2009).

Los compuestos fenólicos o taninos encontrados en la testa del fréjol son térmicamente estables y parcialmente responsables de la actividad inhibidora de la tripsina en fréjol (Mederos, 2006). Se ha encontrado que el contenido de polifenoles es independiente del almacenamiento y de la época de siembra, y que es de 7 a 11 veces mayor en la testa o tegumento que en el resto del grano. La variabilidad en el contenido de taninos está dada por la variación en

el color del grano, ya que los taninos están estrechamente relacionados con los pigmentos de la testa (Mederos, 2006).

2.18. Papel de los flavonoides en la interacción leguminosa– *Rhizobium*

La etapa de pre infección comienza antes de que la planta hospedera y la cepa de *Rhizobium* compatible se reconozcan como pareja potencial desde el punto de vista celular. Los flavonoides liberados por la raíz de la planta desempeñan básicamente dos funciones: atracción química de microorganismos e inducción de los genes de la nodulación (genes nod) de *Rhizobium* (En Tao Wang, 2001).

El papel que desempeñan los flavonoides en la raíz después de la inoculación con *Rhizobium* está relacionada con la secreción de nuevos flavonoides inductores de los genes nod en el ambiente radical, a este fenómeno se lo denomina incremento de flavonoides inductores de los genes nod o respuesta Ini (Espinosa D., 2007).

Las leguminosas excretan metabolitos secundarios hacia la rizósfera, entre ellos, flavonoides que son los más importantes en esta interacción en dependencia de la planta y la bacteria, los compuestos específicos de estos servirán como señales inductoras de los genes Nod mediante la proteína Nod D en *Rhizobium*, este es el primer nivel de especificidad en la interacción (Nápoles, 2008).

Conocidos estos determinantes genéticos y la interacción entre ellos, para extender la capacidad de fijar a otros sistemas es necesario que la bacteria elegida reconozca los exudados de su posible hospedador que puedan inducir la síntesis de un Factor Nod apto para unirse específicamente al receptor o receptores de la planta y así poder poner en marcha la cascada necesaria para llevar la infección a buen término: la deformación de los pelos radicales y su curvatura, la invasión de las células del córtex a través del canal de infección y la división de las células corticales para formar el primordio nodular, para ello hay que manipular la planta para que exude un flavonoide en concreto o manipular la bacteria para que responda al nuevo flavonoide sintetizando el Factor nod para el que la planta también debe tener el receptor adecuado para

su reconocimiento y así poderse desencadenar el proceso, por tanto, a la hora de intentar establecer una asociación entre *Rhizobium* y una planta no leguminosa habría en principio que actuar en dos direcciones: modificar la planta en el sentido de que exudara el flavonoide capaz de inducir la síntesis del Factor nod correspondiente a la cepa bacteriana en cuestión, o manipular la bacteria para que reconociera otros flavonoides inicialmente neutros para ella (Olivares, 2004).

2.19. Solubilización de fosfatos por *Rhizobium*

La disponibilidad de fósforo en el suelo se ha mejorado en gran medida por la producción de metabolitos que producen la reducción del pH y la liberación de fosfato de complejos orgánicos e inorgánicos (Patiño, 2010). Las deficiencias de fósforo (P) en el suelo puede limitar crecimiento de las plantas, la productividad, especialmente en las leguminosas, en donde las plantas y las bacterias simbióticas se ven afectadas, y esto puede tener un efecto perjudicial sobre formación de nódulos su desarrollo y función. La principal ventaja del uso de *Rhizobium* como un microorganismo de solubilización de fosfato es su beneficioso efecto nutricional y con ello la movilización de fosfato y la fijación de nitrógeno (Sridevi, 2009).

2.20. Bacterias del genero *Rhizobium* y sus aplicaciones a la agricultura.

La simbiosis entre la bacteria *Rhizobium* y las leguminosas tiene una gran importancia tanto en la agricultura, como en el medio ambiente. Con el avance del conocimiento, el hombre comenzó a utilizar estos microorganismos y asociaciones beneficiosas, en la actualidad los agricultores, además de rotar los cultivos, emplean microorganismos como biofertilizantes, para proteger a las plantas contra el ataque de patógenos, plagas y malezas (Madigan, 2009)

La bacteria *Rhizobium* es una de las utilizadas como biofertilizante para facilitar la asimilación de nitrógeno en los cultivos de leguminosas. Esta bacteria es un habitante común en los suelos agrícolas (Bernal, 2002). Sin embargo, para aumentar su población y, en consecuencia, la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico los agricultores agregan a las semillas, antes de la siembra, una mezcla de bacterias *Rhizobium* y otros ingredientes que facilitan

su crecimiento. Esta práctica tiene grandes beneficios ambientales ya que al favorecer la fijación simbiótica de nitrógeno, disminuye la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados y la contaminación por nitrógeno asociada al empleo de estos productos (Bernal, 2002).

También beneficia económicamente, pues debido a que muchas industrias agrícolas dependen de la cosecha de leguminosas, el hecho de que estas puedan crecer sin abonos nitrogenados hace que sea posible el ahorrarse grandes cantidades en abonos (Acuña, 2013). En la parte ambiental, los fertilizantes químicos son uno de los principales causantes del deterioro ambiental, pues causan la eutrofización de masas de aguas, la erosión de suelos y generación de lluvias ácidas. Estas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser utilizadas en remplazo de los fertilizantes nitrogenados para incrementar el crecimiento de las leguminosas, acabando con los problemas ambientales que se han venido causando (Acuña, 2013).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de estudio

3.1.1. Ubicación Política

La presente investigación se realizó en dos sectores: la fase de laboratorio se desarrolló en el Centro de Biotecnología del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional, donde se realizó la cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium* y la determinación de los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común, y, la fase de invernadero se ejecutó en el sector de los Molinos de la Estación Experimental “La Argelia”, donde se evaluó el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común.

3.1.2. Ubicación Geográfica

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

Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud
03°57'20''	79°12'47''	2 138 msnm

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

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

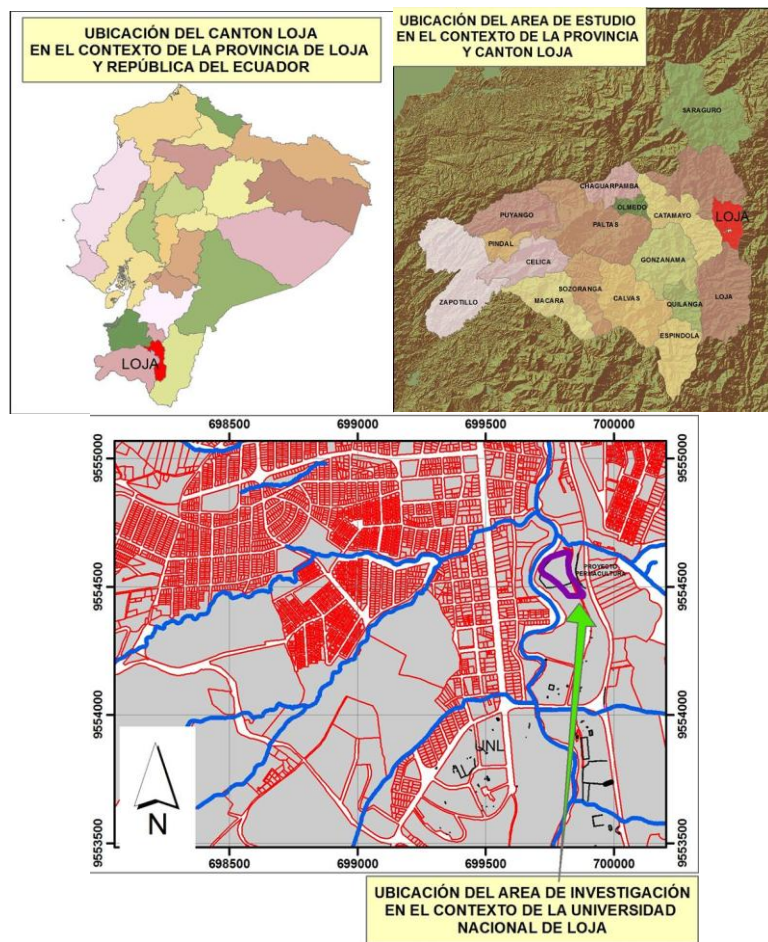


Figura 2. Ubicación geográfica de las áreas donde se realizaron los experimentos

3.1.3. Ubicación ecológica

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

3.2. Materiales y equipos

Los materiales, equipos y reactivos que se utilizó en la presente investigación permitieron el normal desarrollo de la tesis en sus diferentes fases y estuvieron a disposición en el Centro de Biotecnología y se mencionan a continuación:

3.2.1. Materiales

- Macetas de experimentación
- Turba
- Insumos agrícolas
- Semillas de fréjol
- Etiquetas
- Cámara fotográfica
- Invernadero
- Libreta de campo
- Lápiz
- Cloruro de Hierro
- Ácido sulfúrico
- Glucosa
- Nitrato de potasio
- Cloruro de potasio
- Manditol
- Sulfato de magnesio
- Cloruro de magnesio
- Cloruro de sodio
- Fosfato di-potásico
- Extracto de levadura
- Ácido clorhídrico
- Ácido acético
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- Agar
- Acetona acidificada
- Cloruro de aluminio
- Nitrito de sodio
- Hidróxido de sodio
- Metanol
- Catequina
- Equipos de laboratorio
- Reactivo Folin-Ciocalte

3.2.2. Equipos

- Destilador de agua
- Agitador calentador
- Autoclave
- Flujo laminar
- Incubadora
- Estufa
- Incubadora giratoria
- Calentador de agua
- Balanza analítica
- Microscopio óptico
- Refrigeradora 4°C
- Contador de colonias
- Centrifuga
- Vortex
- Espectrofotómetro (JENWAY 6505 UV/VIS, UK)

3.3. Metodología

3.3.1. Metodología para el Primer Objetivo: "Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*"

El análisis se centró en la producción de auxinas AIA (ácido 3-indol acético) por cada uno de los aislados de *Rhizobium* que se obtuvieron en el Centro de Biotecnología. Esta determinación se realizó por el método colorimétrico usándose el reactivo Salkowski (12 g L⁻¹ de FeCl₃ en 7,9 M de H₂SO₄) (Glickman y Dessaux, 1995).

Se inocularon cada una de las cepas de *Rhizobium* en medio de Extracto de Levadura Manditol (ELM) líquido suplementado con 2,5 g L⁻¹ de triptófano. Las cepas se incubaron durante 72 h a una temperatura de 30 °C. Se tomó 1 ml del cultivo bacteriano crecido y se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 ml, los que se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min. Luego se tomaron 0,5 ml del sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo y se le añadió 0,5 ml del reactivo Salkowski, dejándose a la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Luego del tiempo transcurrido, 1 ml de la solución mezclada se transfirió a cubetas del espectrofotómetro (JENWAY 6505 UV/VIS, UK) para medir la absorbancia a 530 nm. Paralelamente se elaboró una curva patrón con AIA sintético en concentraciones de 5 µg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹.

Para verificar la capacidad de las cepas de *Rhizobium* de solubilizar fosfatos inorgánicos, estas se inocularon por estrías en medio de cultivo Pikovskaya (Nopparat *et al.*, 2009). Luego del 72 horas de incubación y a una temperatura de 30°C se tomó asépticamente cepas donde se observó un halo translúcido alrededor de la colonia bacteriana y se midió el halo de cada cepa.

3.3.2. Metodología para el Segundo Objetivo: “Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común”

- **Extracción de compuestos fenólicos**

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos mediante el solvente de extracción propuestos por Xu *et al.*, (2007). A 1 g de harina de fréjol liofilizada se le adicionó 10 ml de acetona acidificada al 70 % con 0.5 % de ácido acético protegiendo de la luz y agitando durante 24 h. Después se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, para obtener el sobrenadante.

- **Determinación de fenoles totales**

Se empleó el método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton *et al.*, (1999). En un tubo de ensayo, se colocó 40 µl del extracto obtenido de la muestra anterior, posteriormente se le adicionó agua destilada hasta completar un volumen de 500 µl, se agito el tubo y se le añadió 250 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se agito. Se dejó en reposo por 5 minutos y se añadió 1,25 ml de carbonato de sodio al 20 % a cada tubo. Posteriormente, se observó el cambio de coloración en los tubos por triplicado.

- **Determinación de taninos condensados**

Para la cuantificación de taninos condensados se tomaron muestras del extracto acetónico antes mencionado. Se cuantificaron los taninos condensados de acuerdo al ensayo de la vainillina de Desphande *et al.*, (1985). A 100 µl del sobrenadante obtenido del extracto de fréjol se agregó 500 µl de una solución (1:1) de vainillina al 1% en metanol y HCl 8%. Posteriormente, se preparó un blanco al cual se le se le adicionaron 100 µl de metanol y 500 µl de HCl al 4%. Luego, se observó el cambio de coloración en los tubos por triplicado.

- **Determinación de flavonoides totales**

Para la cuantificación de flavonoides totales se realizó la técnica descrita por Liu *et al.*, (2002); esta técnica se basa en la capacidad del AlCl_3 para formar quelatos con flavonoides; sin embargo, algunos de estos quelatos son inestables a pH ácidos, por lo cual la reacción se llevó a cabo en un medio básico. A 100 μl extracto de fréjol se agregó 1,250 μl de agua y 75 μl de una solución de NaNO_2 5 %, los tubos se agitaron durante 6 min y, a continuación se adicionó 150 μl de AlCO_3 al 10 %, se agitó nuevamente durante 5 min y se agregó a la reacción 500 μl de NaOH 1M y 525 μl de agua; se dejó en incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se observó el cambio de coloración en los tubos por triplicado.

3.3.3 Metodología para el Tercer Objetivo: “ Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas”

- **Montaje de los ensayos**

El experimento en condiciones controladas se realizó utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 5 réplicas bajo invernadero, teniendo en cuenta 33 aislados de *Rhizobium* y el genotipo a analizar. Se monitoreó la temperatura, humedad relativa, riego, incidencia de plagas y enfermedades y el sustrato a aplicar. Las macetas contenían 2 kg de sustrato en una proporción 2:1:1 (tierra, arena y turba), el cual se esterilizó a 121 °C por 2 horas previo a la siembra de las semillas e inoculación de los aislados.

Los tratamientos evaluados fueron los aislados bacterianos de *Rhizobium* determinados por cada una de las zonas de muestreo a nivel de la provincia de Loja y que dieron los mejores resultados en la producción de AIA orgánico y solubilización de fosfatos así como un tratamiento con fertilización mineral y un control sin fertilización y sin inoculación.

- **Realización del inóculo e inoculación**

Para la realización del inóculo todas los aislados se sembraron en medio ELM (Manitol 10 g; MgSO₄ 7H₂O 0.2 g; NaCl 0.05 g; K₂HPO₄ 0.2 g; extracto de levadura 0.3 g;). Para la preparación del pre-inóculo se dispuso de 10 ml del medio antes referido y se ajustó el pH a 7 añadiendo HCl. Los tubos se incubaron a 30 °C durante 72 h en incubadora zaranda para contar con títulos mínimos de 10⁸ UFC ml⁻¹. Al cabo del tiempo establecido se inocularon los cultivos de cada cepa en 500 ml para obtenerse el inóculo final, el cual se incubó a 30 °C durante 24 h en incubadora zaranda. Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias se realizó el conteo de las células viables en cada uno de los aislados. Todas las cepas contaron con títulos de 10⁹ UFC ml⁻¹ para la realización de la inoculación en las semillas. Este último paso se realizó aplicando 1 ml del cultivo de cada uno de los aislados en las 5 réplicas objeto de estudio en el momento de la siembra.

- **Evaluaciones**

A partir de los 7 días de la siembra se evaluó la altura (cm) y el número de hojas de las plantas. Estas evaluaciones se continuaron a los 15 y 21 días, respectivamente. A los 21 días después de la siembra se evaluaron los parámetros morfológicos y la biomasa nodular: número de nódulos totales (NN) y peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN en gramos) (FAO, 1995); además de la biomasa de la raíz y el follaje: peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR) y el peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF en gramos). Para los análisis se dispuso de 5 muestras por cada tratamiento.

La fijación de nitrógeno (% N total) se realizó utilizando la parte aérea de las plantas, el cual se determinó mediante el método de Kjeldahl (Herrera *et al.*, 1980).

- **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS v.21 IBM. Previamente, se realizaron análisis de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas para posteriormente determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos mediante un análisis de varianza simple (One Way ANOVA), empleando la prueba de Tukey HSD con un nivel de significación $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*.

En la Figura 4, se muestran los análisis de la producción de auxinas AIA (ácido 3-indol acético) por cada uno de los tratamientos, evidenciándose que hay diferencias significativas entre éstos. Los tratamientos COL6 (*Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae*), NAM1 (*Rhizobium mesoamericanum*), TUR2 (*Rhizobium leguminosarum*), CNPAF512 (*Rhizobium etli*) tienen los valores más altos (137.3 ug ml⁻¹ en promedio) en cuanto a producción de auxinas, representando el 12% de los tratamientos, una diferencia importante en relación con el resto de aislados.

En el otro extremo, con valores bajos se encuentran los tratamientos con menor resultado en cuanto a la producción de auxinas como son CB1 (*Rhizobium tropici*), VP1 (*Rhizobium etli* *bv. mimosae*), RA11 (*Rhizobium tropici*), lo que representa el 9%, con la característica que la producción de auxinas en estos tratamientos se encuentra por los 15.5 ug ml⁻¹.

La Figura 4, muestra los análisis de solubilización de fosfatos en donde los tratamientos con menor variación estadística fueron los NAM2 (*R. mesoamericanum*) y LP2 (*R. tropic*), marcando un diámetro de halo de 2,97 y 2,71 mm, respectivamente, lo que advierte una diferencia significativa frente a los tratamientos, PIN1 (*R. etli*) y CNPAF512 (*R. etli*) que presentan un diámetro de halo 0,62 y 0,87 mm, respectivamente esta variación se debe a la solubilización de fósforo inorgánico en medio de cultivo Pikovskaya.

El 70% de los tratamientos durante el tiempo de incubación no formaron un halo, lo que demuestra su incapacidad para solubilizar fosfatos.

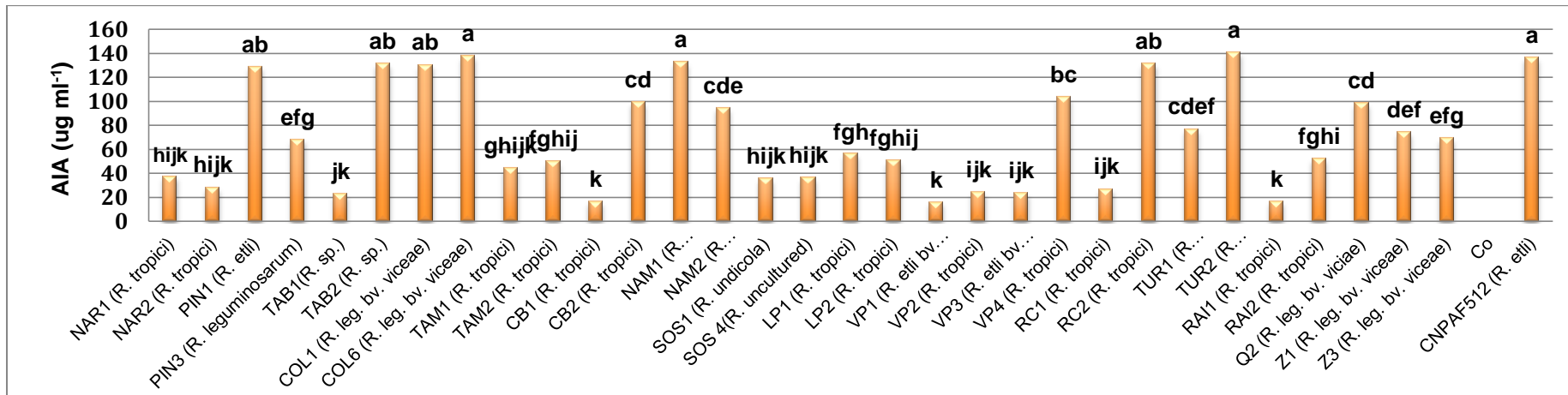


Figura 3. Producción de auxinas (ácido3-indol-acetico) de cada cepa objeto de estudio. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

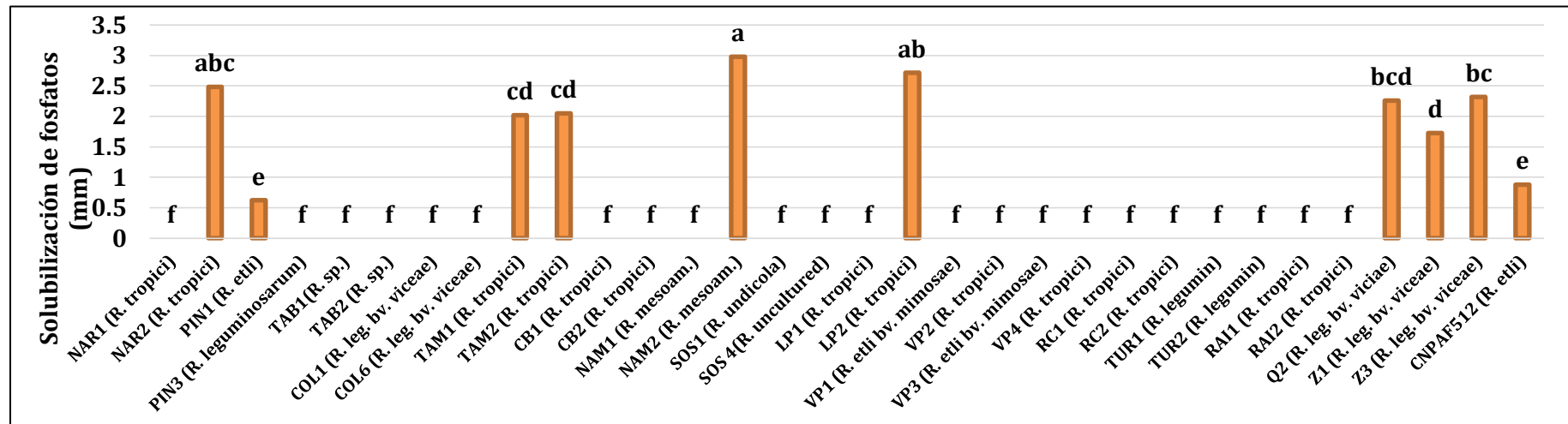


Figura 4. Solubilización de fosfatos de cada una de las cepas objeto de estudio. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD

3.2 Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común.

Se presentan los resultados obtenidos en extracto acuoso de la testa de fréjol común (Tabla 4), observándose la presencia abundante de fenoles, mismos que poseen una acción antioxidante.

Tabla 4. Compuestos obtenidos de la testa de fréjol var. Mantequilla

Compuestos	Mantequilla
Saponinas	++
Carbohidratos	++
Fenoles	++
Alcaloides	++
Flavonoides	-
Cumarinas	-

Presencia de CF: moderado (+) abundante (++); Ausencia de CF (-)

Se encontraron alcaloides que son compuestos orgánicos nitrogenados de carácter alcalino, también se encontraron carbohidratos que son universalmente utilizados por las células para la obtención de energía metabólica y, la formación de almidones y saponinas, glucósido esencial para las plantas; además, se pudo observar la ausencia de flavonoides y cumarinas que son compuestos antioxidantes, este defecto reduce la palatabilidad y valor nutricional de los granos de fréjol.

3.3 Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas.

3.3.1 Efecto de los aislados bacterianos sobre los parámetros de nodulación.

En las figuras 6 y 7, se exponen los parámetros de nodulación, correspondientes al número de nódulos totales (NN) y peso seco de nódulos

(PSN) para cada uno de los tratamientos analizados por cada variable evaluada.

- **Número de nódulos totales**

Los tratamientos con mayores valores de número de nódulos totales (figura 6) fueron: NAM1 (*R. mesoamericanum*), COL6 (*R. leguminosarum. bv. viceae*), VP1 (*R. etli bv. mimosae*), VP3 (*R. etli bv. mimosae*), NAR2 (*R. tropici*), VP2 (*R. tropici*), TUR2 (*R. leguminosarum*) y TAM2 (*R. tropici*). El tratamiento, control como era de esperar, no presenta nódulos.

- **Peso seco de nódulos**

Los resultados obtenidos de la variable de peso seco de los nódulos (figura 7), evidencian que el tratamiento RC2 (*R. tropici*) presenta el valor más representativo; mientras que sin mayor diferencia por otra parte, los tratamientos NAM1 (*R. mesoamericanum*) y LP1 (*R. tropici*); los tratamiento con menor peso de nódulos secos fueron el RC1 (*R. Tropici*), TUR1 (*R. leguminosarum*) y CNPAF512 (*R. etli*).

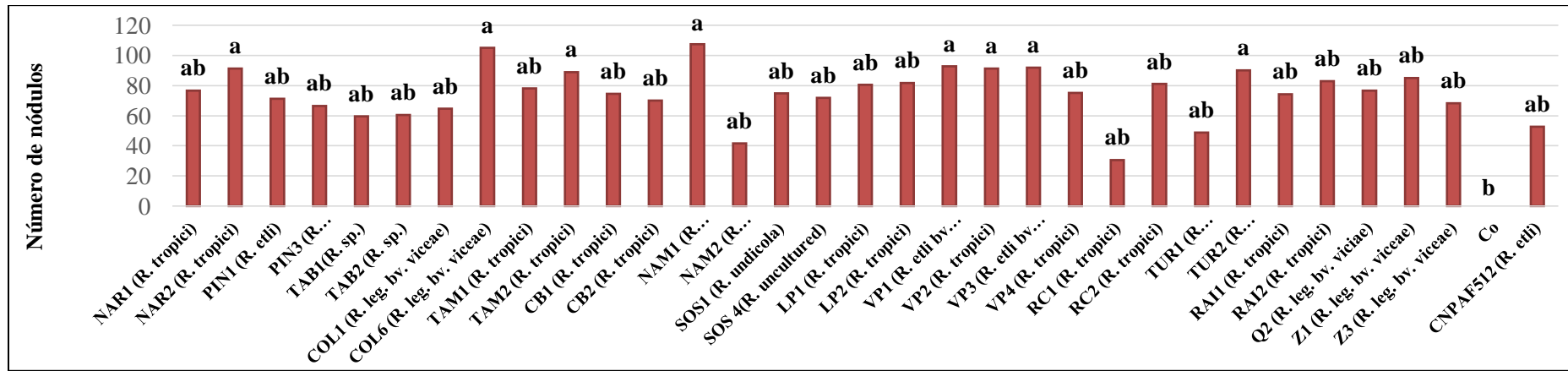


Figura 5. Número de nódulos totales. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

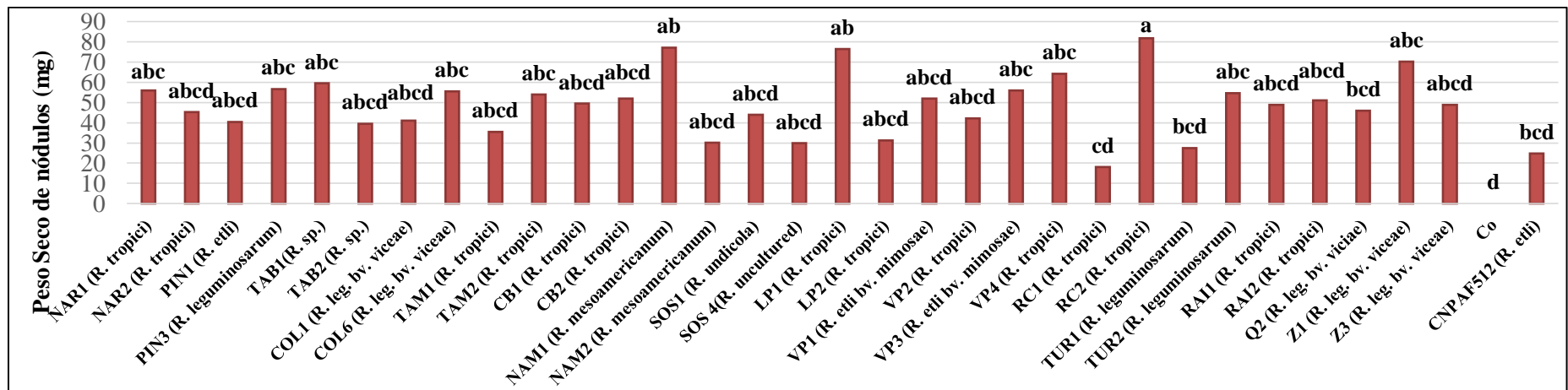


Figura 6. Peso seco de los nódulos. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

- **Parámetros morfológicos**

En las figuras 8 y 9, se indican las evaluaciones del número de hojas y la altura de las plantas de fréjol a los 7, 15 y 21 días después de la siembra (DDS).

La figura 8, corresponde al número de hojas de cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos de evaluación 7, 15 y 21 DDS, donde a los 7 DDS se pudo evidenciar una diferencia en la etapa de germinación de los tratamientos PIN1 (*R. etli*), PIN3 (*R. leguminosarium*) CNPAF512 (*R. etli*) y el Co que presentaron menos de 1 hoja, mientras que el resto de tratamientos presentaron 2 hojas en promedio; a los 15 DDS se pudo observar una variación en la fase vegetativa en los tratamientos TAM1 (*R. tropici*), CB1 (*R. tropici*), CB2 (*R. tropici*), Q2 (*R. leg. bv. viciae*), Co, los cuales presentaron 3 hojas en promedio, a diferencia del resto de tratamientos que presentaron en promedio 5 hojas; a los 21 DDS la tendencia en el desarrollo vegetativo del cultivo sigue con las mismas características, esto debido a que los tratamientos con deficiencia en el desarrollo vegetativo a los 7 DDS siguen con retraso a los 21 DDS, presentando en promedio 6 hojas, frente al resto de tratamientos que tienen 8 hojas en promedio.

Así mismo los resultados de la altura (figura 9) de las plantas, se evaluaron a los 7, 15 y 21 DDS. A los 7 DDS el mejor tratamiento corresponde a Z3 (*R. leg. bv. viciae*) con 4,2cm, mientras CB2 (*R. tropici*) y el tratamiento control tienen 1,3cm de altura; a los 15 DDS, los mismos tratamientos tuvieron similar desarrollo, es decir, Z3 (*R. leg. bv. viciae*) creció 11,7cm, mientras que CB2 (*R. tropici*) y el tratamiento control aumentaron 7,3cm; a los 21 DDS, el tratamiento NAR1 (*R. tropici*) y Z3 (*R. leg. bv. viciae*) presentaron una altura de 16,8cm mientras CB2 (*R. tropici*) 12,3cm y el tratamiento control 11,8cm.

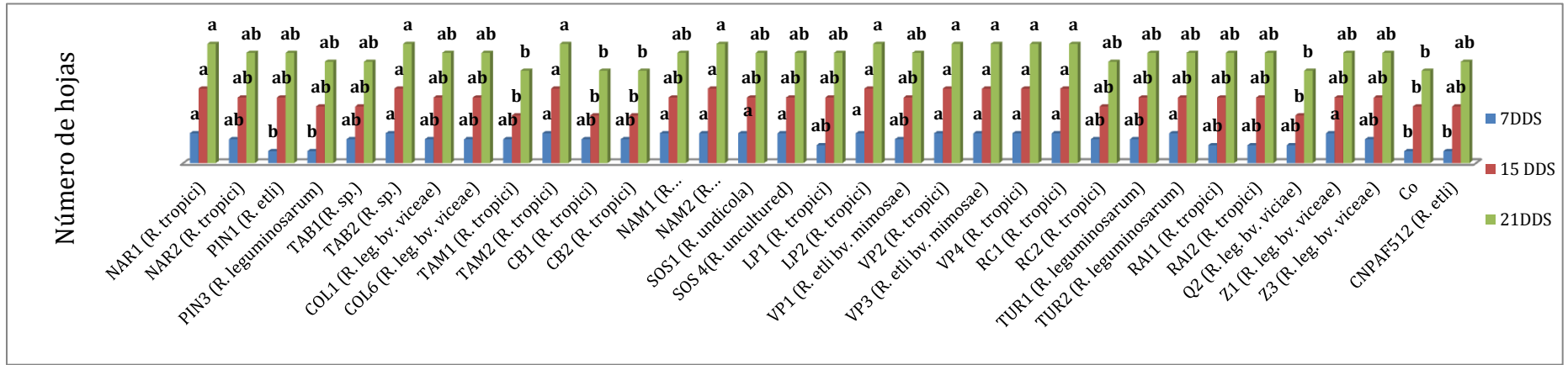


Figura 7. Número de hojas en el cultivo de fréjol. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

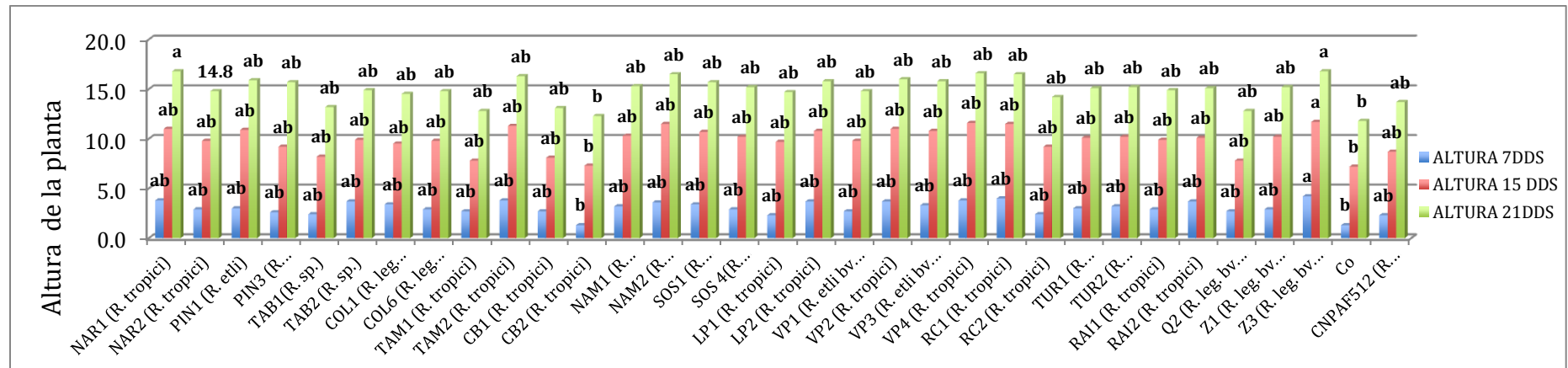


Figura 8. Altura de planta en el cultivo de fréjol. Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

- **Biomasa**

Como se puede apreciar en la figura 10, ninguno de los aislados bacterianos, ni el tratamiento fertilización ejercen un efecto marcado en el peso seco del follaje, por tanto, no se evidencian valores significativos en ninguno de los tratamientos evaluados.

En la figura 11, se presentan los valores del peso seco de la raíz (PSR); siendo la incubación con NAM1 (*R. mesoamericanum*) el tratamiento que presenta los mejores resultados, con un peso de 283,6 mg, lo que difiere significativamente del tratamiento VP4 (*R. Tropici*), cuyo peso seco de la raíz fue de 120,44 mg un peso más bajo que el testigo correspondiente a 137,92 mg.

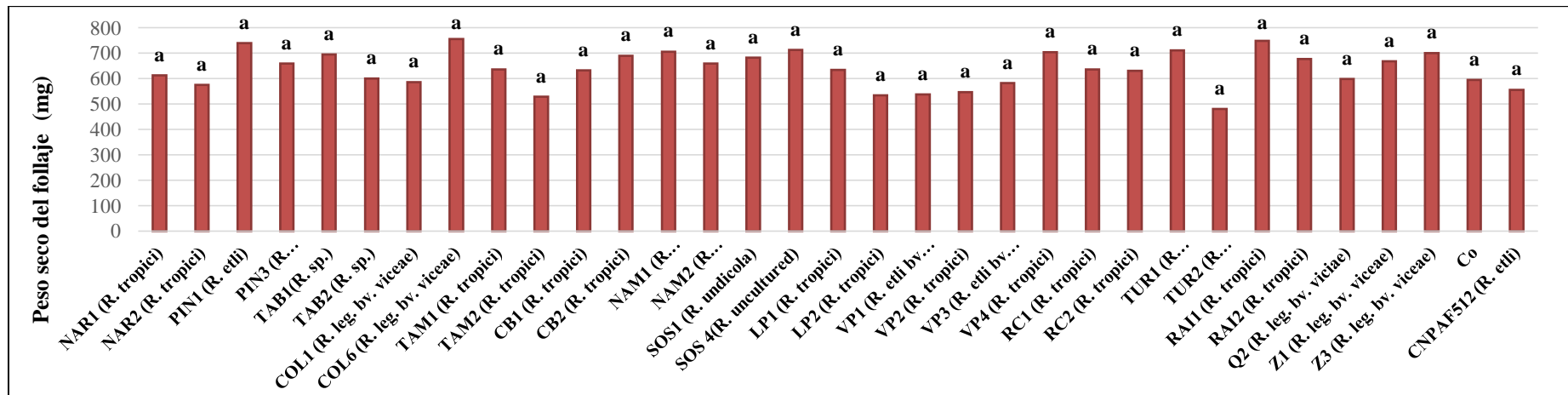


Figura 9. Peso seco del follaje en el cultivo de fréjol, Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

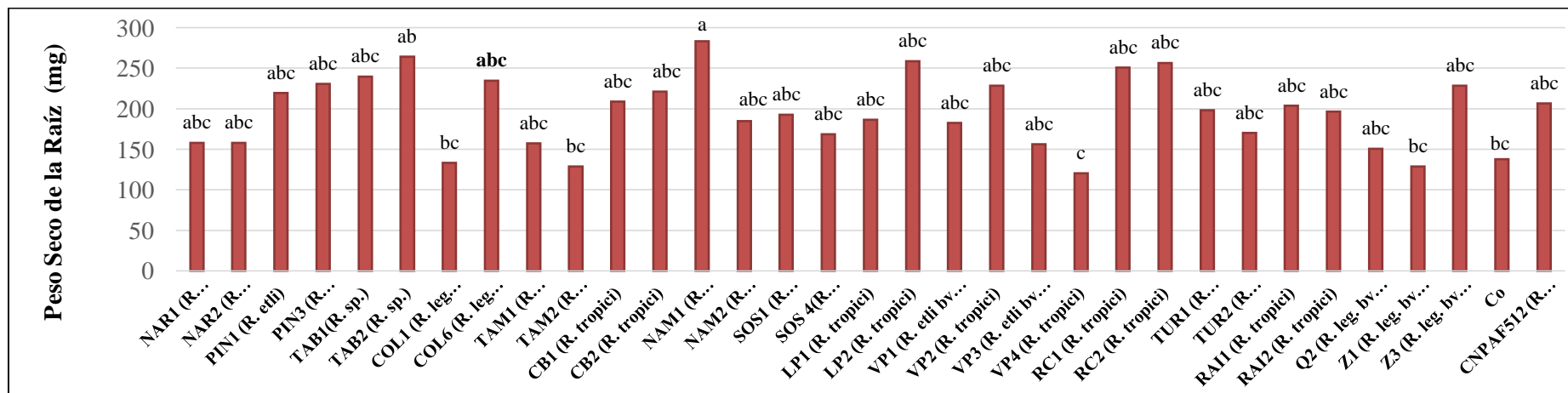


Figura 10. Peso seco de la raíz en el cultivo de fréjol, Letras iguales en las columnas no difieren estadísticamente para $p \leq 0.05$, según la prueba de Tukey HSD.

- **Contenido total de nitrógeno**

En la Tabla 5, se muestran los resultados del porcentaje de N fijado por el fréjol común, de acuerdo a cada tratamiento evaluado.

Tabla 5. Contenido de nitrógeno total en fréjol común var. Mantequilla.

Tratamiento	% N Total
NAR1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,29
NAR2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,77
PIN1 (<i>Rhizobium. etli</i>)	3
PIN3 (<i>Rhizobium. leguminosarum</i>)	2,44
TAB1 (<i>Rhizobium. sp.</i>)	2,8
TAB2 (<i>Rhizobium. sp.</i>)	2,62
COL1 (<i>Rhizobium leg. bv. viceae</i>)	2,39
COL6 (<i>Rhizobium leg. bv. viceae</i>)	3,04
TAM1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,63
TAM2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,88
CB1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,57
CB2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,48
NAM1 (<i>Rhizobium mesoamericanum</i>)	3,08
NAM2 (<i>Rhizobium mesoamericanum</i>)	2,47
SOS1 (<i>Rhizobium undicola</i>)	2,74
SOS 4(<i>Rhizobium uncultured</i>)	3,17
LP1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,61
LP2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,71
VP1 (<i>Rhizobium etli bv. mimosae</i>)	2,97
VP2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	3,08
VP3 (<i>Rhizobium etli bv. mimosae</i>)	2,54
VP4 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,47
RC1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,7
RC2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,75
TUR1 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	2,51
TUR2 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	2,93
RAI1 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,59
RAI2 (<i>Rhizobium tropici</i>)	2,97
Q2 (<i>Rhizobium leg. bv. viciae</i>)	2,17
Z1 (<i>Rhizobium leg. bv. viceae</i>)	2,27
Z3 (<i>Rhizobium leg. bv. viceae</i>)	2,91
Co	2,5
CNPAF512 (<i>Rhizobium etli</i>)	2,56

4 DISCUSIONES

4.1 Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*

Todas las cepas evaluadas presentaron valores altos en la producción de auxinas (ácido 3-indol-acético), mismos que se encuentran en el rango de 132,71 a 140,45 $\mu\text{g ml}^{-1}$; las mejores cepas correspondieron a: (COL6; 137,87477 $\mu\text{g ml}^{-1}$), (NAM1; 132,718232 $\mu\text{g ml}^{-1}$), (TUR2; 140,453039 $\mu\text{g ml}^{-1}$), (CNPAF512; 136,401473 $\mu\text{g ml}^{-1}$), esta producción elevada de auxinas, a diferencia del resto de tratamientos, facilita que se sintetice de mejor manera la fijación de nitrógeno. Comparando con el estudio realizado por Altuna *et al.*, (2006) en el que, la concentración de AIA máxima se alcanza a las 40 y 44 horas, alcanzando una media de 446.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 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 las semillas de tomate 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 2,97 mm en el NAM2 (*R. mesoamericanum*) el mismo que difiere significativamente frente al resto de tratamientos evaluados; 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.

4.2 Determinar los compuestos fenólicos de la testa de fréjol común.

Los compuestos fenólicos obtenidos a partir de la testa de fréjol, indican la presencia abundante de fenoles, alcaloides, carbohidratos y saponinas, los mismos componentes importantes para el establecimiento de la simbiosis leguminosa-bacteria. Estos resultados concuerdan con los reportados por Ocho, *et al.*, (2010), cuya investigación refleja las semillas de *Phaseolus*

vulgaris contienen alcaloides, flavonoides, glucósidos, polifenoles, saponinas, esteroides, taninos y terpenos, que son los principales grupos fitoquímicos con actividad biológica.

4.3 Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas.

En cuanto a los parámetros de nodulación, los resultados obtenidos a los 21DDS, están en los valores de 89 a 107,6 nódulos por planta, siendo los mejores tratamientos los NAM1 (*R. mesoamericanum*), COL6 (*R. leguminosarum. bv. viceae*), VP1 (*R. etli bv. mimosae*), VP3 (*R. etli bv. mimosae*), NAR2 (*R. tropici*), VP2 (*R. tropici*), TUR2 (*R. leguminosarum*) y TAM2 (*R. tropici*); El tratamiento con mejor peso seco de los nódulos es el RC2 (*R. tropici*), con un valor de 81,82 g demostrando que hubo una interacción beneficiosa entre las cepas de *Rhizobium* con la leguminosa, a este enunciado lo corrobora Obando (2012), quien 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. Otros investigadores como Casa (2014), también reportan aumentos significativos del número y peso seco de nódulos, 558 nódulos y de 1.73 gr por planta, respectivamente. Lo que anteriormente citado, demuestra que la presente investigación se encuentra dentro de promedios aceptables.

En cuanto al número de hojas por, cada uno de los tratamientos a los 7, 15 y 21 DDS tenemos que, a los 7 DDS hay una variación en la germinación de las semillas de fréjol debido a que el 10% de los tratamientos (PIN1 (*R. etli*), PIN3 (*R. leguminosarium*) CNPAF512 (*R. etli*) y el Co) presentan en promedio 1 hoja, mientras que el 90% de las semillas germinadas presentaron 2 hojas; a los 15 DDS se observó una variación en la fase vegetativa, el 15% en los tratamientos TAM1 (*R. tropici*), CB1 (*R. tropici*), CB2 (*R. tropici*), Q2 (*R. leg. bv. viceae*), Co, presentaron 3 hojas, a diferencia del 85% de los tratamientos que presentaron

en promedio 5 hojas; hay que tomar en consideración que el tratamiento que mantiene una deficiencia en el desarrollo vegetativo es el tratamiento control; a los 21 DDS la tendencia en el desarrollo vegetativo del cultivo sigue con las mismas características, el 15% de los tratamientos presenta en promedio 6 hojas, frente al resto de tratamientos 85% que tienen 8 hojas en promedio, aquí se puede observar que los tratamientos TAM1 (*R. tropici*), CB1 (*R. tropici*), CB2 (*R. tropici*), Q2 (*R. leg. bv. viciae*), Co, son los que presentan retraso vegetativo; en términos generales se podría decir que la inoculación de la bacteria *Rhizobium* no acelera ni retrasa el ciclo vegetativo del cultivo significativamente, pero, por lo expresado en párrafos anteriores, el beneficio de la inoculación se vería en el rendimiento del cultivo.

En cuanto a la altura de las plantas a los 7, 15 y 21 DDS, mediante la inoculación con las cepas NAR1 (*R. tropici*), TAB2 (*R. sp.*), TAM2 (*R. tropici*), NAM2 (*R. mesoamericanum*), LP2 (*R. tropici*), VP2 (*R. tropici*) y VP3 (*R. etli bv. mimosae*), se obtuvieron valores promedio de 4,2; 11,7 y 16,8 cm, respectivamente, destacándose que en todos los tiempos de evaluación se comprobó un crecimiento homogéneo de las plantas. Granda *et al.*, (2014) en estudios similares al nuestro determinó homogeneidad en variedades de fréjol común (rojo y negro) debido al efecto de la cepa *Rhizobium phaseoli* para promover la producción de diferentes fitohormonas y, por ende, al crecimiento de la planta, con valores de 10,98 a 11,93 y 10,99 a 11,93 cm para fréjol rojo y negro, respectivamente.

El peso seco del follaje, no se vio influenciado con ninguno de los tratamientos evaluados ya que no se evidenció diferencias estadísticas significativas; en promedio, el PSF para esta variable evaluada fue de 636,24 g por planta. Contrario a nuestros resultados, Casa (2014) obtuvo un promedio general de 26.14 g por planta, resultados muy por debajo del promedio reportado en nuestra investigación.

En relación al peso seco de la raíz (PSR), el tratamiento que obtuvo mejor resultado fue el NAM1 (*R. mesoamericanum*) con 283,6 g; mientras que el tratamiento con menor peso seco de raíz fue el VP4 (*R. tropici*) con 120.44 g, el

tratamiento control tiene un peso de raíz de 137.92 g. Con estos valores se podría decir que la inoculación de la bacteria *Rhizobium* no prolifera el desarrollo de la raíz, pero si hay que tomar en cuenta 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.

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 5 la inoculación con la cepa SOS4 (*R. uncultured*) obtuvo los mayores valores de fijación de N total en el follaje de la planta con 3,17%, seguido de VP2 (*R. tropici*). Estos resultados revisten gran importancia si se tiene en cuenta que son pocos los reportes de inoculación de cepas de *Rhizobium* en fréjol común que logran incorporar N mayor al 3 % basado en las tasas de N fijado.

5 CONCLUSIONES

- La producción de auxinas y solubilización de fosfatos por parte de las cepas nativas de: *Rhizobium leguminosarum. bv. viceae*, *Rhizobium mesoamericanum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, son capaces de producir cantidades significativas de auxinas y las cepas NAM2 (*R. mesoamericanum*) de solubilizar fósforo inorgánico.
- Los compuestos fenólicos encontrados en la testa de fréjol común variedad Mantequilla son: carbohidratos, fenoles, alcaloides, y saponinas.
- Las cepas VP2 (*R. tropici*), VP3 (*R. etli bv. mimosae*) fueron las que promovieron mejores capacidades de crecimiento vegetal en cuanto a los parámetros evaluados como número de nódulos y biomasa.
- La inoculación con la cepa RC2 (*Rhizobium tropici*) tuvo un marcado efecto, beneficioso en comparación con el resto de las cepas inoculadas con base al peso de nódulos secos, lo que demuestra que hubo una eficaz fijación de nitrógeno.

6 RECOMENDACIONES

Comprobar si la disponibilidad de compuestos obtenidos y producción de fitohormonas en el cultivo de fréjol, varía en función de los pisos altitudinales y si esta variación es significativa en el rendimiento del cultivo.

Realizar ensayos en condiciones controladas con la inoculación de los compuestos fitoquímicos obtenidos para determinar el efecto sobre la simbiosis *Rhizobium*-fréjol.

Realizar ensayos de campo con las mejores cepas obtenidas en condiciones controladas para validar los resultados de estimulación fenotípica y fijación de nitrógeno.

Realizar charlas de capacitación con agricultores productores de fréjol y otras leguminosas, con la finalidad de hacerles conocer este proceso de fertilización fitoquímica, que es una alternativa eficiente en comparación con la fertilización química.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C. (2000). Los árboles fijadores de nitrógeno y sus mecanismos biológicos. *Revista Narración de la Ciencia*. 3(1) pp. 23-27
- Acuña, O. (2013). El uso de biofertilizantes en la agricultura. Laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos; Centro de Investigaciones Agronómicas pp. 2-20
- Aguilar, F. (2012). "Evaluación de cinco variedades de frijol ejotero (*Phaseolus Vulgaris L.*) con sistema de riego por goteo en la comunidad de berlin municipio de cordoba, Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Región Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana. pp 2-40
- Altuna, B., Michelena, G., Castillo, G., Silvano, S., and Armenteros, S. (2006), Evaluación de diferentes sistemas de fermentación para la producción de ácido indolacético por *Rhizobium sp*, *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba*. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 15(3) pp. 45-50.
- Andriulo, A., Reynoso, L. and Portela, S., (2010), Guía de buenas prácticas para el manejo de nutrientes (N y P), en la pampa ondulada: desarrollo de índices de riesgo empresarial contaminación por N y P. el INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Angus J., Baldock, J., Farrell, M., and Norton, R. (2013). Maximising Nitrogen Availability To Crops. Rob Norton. Plant-Available Nitrogen Fact Sheet. International Plant Nutrition Institute Australia and New Zealand, based at Horsham.

- Arias, J., Jaramillo, M., and Rengifo, T. (2007), Manual técnico del buenas prácticas agrícolas en la producción de Fríjol voluble. CORPOICA, Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias "La Selva". © FAO 2007.
- ASERCA., Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, ASERCA. (2000). El haba y su carácter multifuncional en la agricultura. Usos alternativos del cultivo de haba. Gobierno de México. pp 2-30
- Baca, B., Soto, L., and Pardo, M. (2000), Fijación Biológica de Nitrógeno Revista Elementos, Ciencia y Cultura. Elementos.buap.mx; 38(7) pp 43-45.
- Barrios, M. (2009), La Simbiosis Rhizobio-Leguminosa. Árboles Fijadores de Nitrógeno y su Importancia en los Ecosistemas. XXII Jornadas Forestales de Gran Canaria. pp. 10-15
- Bernal, G., Suárez, A., Pérez, M., and Campaña, D. (2002), Inoculación de la Semilla de Leguminosas con la Bacteria *Rhizobium*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. Estación Experimental Santa Catalina. Plegable 195.
- Bernal, G., Suárez, A., Campaña, D., Jerez, M., Salvador, C., Graham, P., and Aguilar, M. (2003). "Selección de cepas de rhizobium adaptadas a condiciones de campo, y su uso como inoculantes de leguminosas de la sierra y costa Ecuatoriana". Microbiología de Suelos. Centro de Investigación Agropecuaria pp.10-30
- Campillo, R., Urquiaga, S., Pino, I., and Montenegro, A. (2003). Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del ^{15}N . Scielo. Agric. Téc. 63 (2) pp 4-5.

- Contreras, J., Flores, A. and Rodríguez, R. (2009), La fijación biológica de nitrógeno por microorganismos; su importancia en la agricultura y conservación del medio ambiente, Departamento de Investigación de Alimentos Facultad de Ciencias Químicas, UA de C. Revista de divulgación científica Ciencia Cierta. Uadec.mx.
- Covelli, J. (2013). Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: Aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Tesis Doctoral Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Depto. Cs. Biológicas Biológicas Instituto de Biotecnología y Biología Molecular pp. 10-15
- Cuadrado, B., Rubio, G and Santos, W. (2009), Caracterización de Cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (Con Habilidad De Nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol Caupí (*Vigna Unguiculata*) Como Potenciales Bioinóculos. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas Grupo de Investigación en Microbiología y Sistemas Simbióticos, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Cartagena.
- Debouck, D., (1984), Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). Centro Internacional de Agricultura Tropical 2ª edición. Google Books pp. 9-44
- Es Tao, W., Martínez, J. and López, I. (2001), *Rhizobium* y su destacada Simbiosis con Plantas. Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Estévez, C. and Murgueitio, P. (2008). Perfil del Fréjol. Coordinadora del Centro de Información e Inteligencia Comercial – CICO de CORPEI Pontificia Universidad Católica de Ibarra, PUCE Ibarra. 3 (1) pp. 15-20.
- Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas FENALCE. (2010). Importancia de los cultivos representados por FENALCE. El cultivo del frijol: Historia e Importancia. 1 (3) pp 8-15.
- Fernández, M. and Rodríguez, H. (2005), El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos icidca. sobre los derivados de la caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 39(3) pp. 27-34
- Freire, R. (2012). Evaluación del potencial biofertilizante de tres consorcios de cianobacterias en el crecimiento y valor nutricional de pasto reygrass anual (*Lolium multiflorum*) a nivel de cámara de invernadero. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador
- Granda, K., Ochoa, M., Ruilova, V., Guamán, F., and Torres, R. (2014). Evaluación de cepas nativas de rhizobium sobre parámetros fenotípicos en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L). Centro de Biotecnología. Universidad Nacional de Loja. 3(1) pp. 2-4
- Granda, K., Colás, A., Cupull R., , Gutiérrez, Y. and Torres., R. (2009). Caracterización e identificación genética de aislados de Rhizobium en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Facultad de Ciencias

Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas 36(4) pp. 5-14

Hernández, V. (2009). Caracterización proteómica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 2 (1) pp. 1-27

Hernández, J. and Cubillos, P. (2012), Aislamiento de cepas de *Rhizobium* Spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el centro biotecnológico del caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. 3(1) pp. 2-6

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. (2010). Manual Agrícola de fréjol y otras leguminosas. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina.

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP-PRONALEG-GA. (2009). Leguminosas de grano comestible. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina pp. 2-3

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos – Encuestas de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2014). INEC-ESPAC. Instituto Nacional de Estadística y Censos.

Loredo, C., López, L. and Espinosa, D. (2004), Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Terra Latinoamericana. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica 22 (2) pp. 225-239.






































































































































































- Madigan, T., Martinko, P. and Dunlap P. (2009). Biología de los microorganismos. Pearson Education S. A., Madrid, España. pp. 123-200
- Marra, L., Oliveira, S., Soares, C., and Moreira, F. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Revista Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, 68(5) pp 16-20
- Mayz, J. (2004). Fijación Biológica De Nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Laboratorio de Rizobiología, Campus Juanico, Maturín, Estado Monagas. 4(1) pp.1-20.
- Mederos, Y. (2006), Indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). 3(1) . *Revista Científica UDO Agrícola*, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Laboratorio de Rizobiología, Campus Juanico, Maturín, Estado Monagas pp 2-3
- Obando, D. (2015). “Respuesta fisiológica del frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *azotobacter* y *rhizobium* en suelos del departamento del Cesar”. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias-Énfasis Fisiología de Cultivos Bogotá, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. pp 10-50
- Ocho L., Kouakou H., Brou D., Kouadio J. and Gnakri, D. (2010) Evaluation of bioactive components in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (fabaceae) cultivated in Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*. 1Université d'Abobo-Adjamé, UFR Sciences et Technologie des Aliments, Laboratoire de Nutrition et de Sécurité Alimentaire 31(1) pp. 1928-1934.
- Olivares, J. (2009), Fijación biológica de nitrógeno, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

- Paladino, S., (2006), Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis. pp. 39-50.
- Paredes, M. (2010), Aislamiento y caracterización de bioquímica metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato. *Biblio.colpos.mx*. 3(1) pp. 5-10
- Patiño, C. (2010), Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del Cauca. estudio de biodiversidad y eficiencia, Tesis de Posgrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional De Colombia, pp.17-72
- Peralta, E. and Caicedo, C. (2001). Cultivo de chocho *Lupinus mutabilis*; fitonutrición, plagas y enfermedades en el Ecuador. Quito, EC. Programa Nacional de Leguminosas, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (PRONALEG-INIAP). pp 34-40
- Perdomo, C. and Barbazán, M. (2014), Nitrógeno. Facultad de Agronomía Universidad de la República Uruguay. pp. 30-40
- Pérez, A., Grisales, T. and Fuentes, J. (2011), Determinación de morfotipos nativos de rhizobium asociados a la leguminosa *teramnus volubilis* sw en fincas ganaderas del municipio de tolú en el departamento de sucre. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 1(1) pp.2-10
- Prieto, M. (2012). Pautas para el manejo del cultivo de arveja. AER INTA Arroyo Seco. Revista electrónica Todo agro.

- Santillana, N., Arellano, C., and Zúñiga, D. (2005). Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *SciELO. Ecol. apl.* 4(1) pp. 47-51
- Sánchez, E., Ortega, M., Gonzáles, V., Camacho, M. and Kohashi, J. (2008). Crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, inducido por diversas soluciones salinas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5) pp. 753-763
- Soto, J., Borbor, G., Borbor, V. (2011), Identificación y Caracterización De Cepas De *Rhizobium* Nativas En La Provincia De Santa Elena. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Estatal Península de Santa Elena. pp. 23-30.
- Sridevi, M. and Mallaiah, K. (2009). Phosphate Solubilization By Rhizobium Strains. Short Communication. *Indian J Microbiol* 49. pp.98-102.
- University Charles, (2015). HSC Online - The Role Of Nitrogen In Agricultural Production Systems. *Hsc.csu.edu.au*. pp. 15-20
- Villanueva, E. and Quintana, A. (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.* 1(1) pp 1-10
- Weir, B. (2012), La taxonomía actual de *Rhizobium*. | *Nz Rhizobia*; *Rhizobia.Co.Nz.* 1(1) pp. 2-20.

8 ANEXOS

Anexo 1 Esquema del ensayo en condiciones controladas

TRATAMIENTO	R1	R2	R3	R4	R5
NAR1					
NAR2					
PIN1					
PIN3					
TAB1					
TAB2					
COL1					
COL6					
TAM1					
TAM2					
CB1					
CB2					
NAM1					
NAM2					
SOS1					
SOS4					
LP1					
LP2					
VP1					
VP2					
VP3					
VP4					
RC1					
RC2					
TUR1					
TUR2					
RAI1					
RAI2					
Q2					
Z1					
Z3					
CO					
CNPAF512					

Anexo 2 Tratamientos y réplicas utilizados en el experimento

Tratamiento	Localidad	Organismo
NAR1	Paltas	<i>(Rhizobium tropici)</i>
NAR2	Paltas	<i>(Rhizobium tropici)</i>
PIN1	Pindal	<i>(Rhizobium etli)</i>
PIN3	Pindal	<i>(Rhizobium leguminosarum)</i>
TAB1	Calvas	<i>(Rhizobium sp.)</i>
TAB2	Calvas	<i>(Rhizobium sp.)</i>
COL1	Calvas	<i>(Rhizobium leg. bv. viceae)</i>
COL6	Calvas	<i>(Rhizobium leg. bv. viceae)</i>
TAM1	Catamayo	<i>(Rhizobium tropici)</i>
TAM2	Catamayo	<i>(Rhizobium tropici)</i>
CB1	Catamayo	<i>(Rhizobium tropici)</i>
CB2	Catamayo	<i>(Rhizobium tropici)</i>
NAM1	Gonzanamá	<i>Rhizobium mesoamericanum</i>
NAM2	Gonzanamá	<i>(Rhizobium mesoamericanum)</i>
SOS1	Sozoranga	<i>(Rhizobium undicola)</i>
SOS 4	Sozoranga	<i>(Rhizobium uncultured)</i>
LP1	Celica	<i>(Rhizobium tropici)</i>
LP2	Celica	<i>(Rhizobium tropici)</i>
VP1	Loja	<i>(Rhizobium etli bv. mimosae)</i>
VP2	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
VP3	Loja	<i>(Rhizobium etli bv. mimosae)</i>
VP4	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
RC1	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
RC2	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
TUR1	Loja	<i>(Rhizobium leguminosarum)</i>
TUR2	Loja	<i>(Rhizobium leguminosarum)</i>
RAI1	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
RAI2	Loja	<i>(Rhizobium tropici)</i>
Q2	Saraguro	<i>(Rhizobium leg. bv. viciae)</i>
Z1	Saraguro	<i>(Rhizobium leg. bv. viceae)</i>
Z3	Saraguro	<i>(Rhizobium leg. bv. viceae)</i>
Co	...	Testigo
CNPAF512	...	<i>(Rhizobium etli)</i>

Anexo 3 Parámetros morfológicos en las diferentes etapas de crecimiento del fréjol

Tratamiento	7DDS		15 DDS		21DDS	
	Alt (cm)	No. H	Alt (cm)	No. H	Alt (cm)	No. H
T1	3,8	2,0	11,0	5,0	16,8	8,0
T2	2,9	1,6	9,8	4,4	14,8	7,4
T3	3,0	0,8	10,9	4,4	15,9	7,4
T4	2,6	0,8	9,2	3,8	15,7	6,8
T5	2,4	1,6	8,2	3,8	13,2	6,8
T6	3,7	2,0	9,9	5,0	14,9	8,0
T7	3,4	1,6	9,5	4,4	14,5	7,4
T8	2,9	1,6	9,8	4,4	14,8	7,4
T9	2,7	1,6	7,8	3,2	12,8	6,2
T10	3,8	2,0	11,3	5,0	16,3	8,0
T11	2,7	1,6	8,1	3,2	13,1	6,2
T12	1,3	1,6	7,3	3,2	12,3	6,2
T13	3,2	2,0	10,3	4,4	15,3	7,4
T14	3,6	2,0	11,5	5,0	16,5	8,0
T15	3,4	2,0	10,7	4,4	15,7	7,4
T16	2,9	2,0	10,2	4,4	15,2	7,4
T17	2,3	1,2	9,7	4,4	14,7	7,4
T18	3,7	2,0	10,8	5,0	15,8	8,0
T19	2,7	1,6	9,8	4,4	14,8	7,4
T20	3,7	2,0	11,0	5,0	16,0	8,0
T21	3,3	2,0	10,8	5,0	15,8	8,0
T22	3,8	2,0	11,6	5,0	16,6	8,0
T23	4,0	2,0	11,5	5,0	16,5	8,0
T24	2,4	1,6	9,2	3,8	14,2	6,8
T25	3,0	1,6	10,1	4,4	15,1	7,4
T26	3,2	2,0	10,2	4,4	15,2	7,4
T27	2,9	1,2	9,9	4,4	14,9	7,4
T28	3,7	1,2	10,1	4,4	15,1	7,4
T29	2,7	1,2	7,8	3,2	12,8	6,2
T30	2,9	2,0	10,2	4,4	15,2	7,4
T31	4,2	1,6	11,7	4,4	16,8	7,4
T32	1,3	0,8	7,2	3,8	11,8	6,2
T33	2,3	0,8	8,7	3,8	13,7	6,8
ERROR ESTÁNDAR	0,731023	0.35505	10.517	0,54272	103.778	0,54272

Anexo 4 Parámetros morfológicos en las diferentes etapas de crecimiento con la prueba de Tukey HSD

Tratamiento	7DDS		15 DDS		21DDS	
	Alt. (cm)	No. H	Alt (cm)	No. H	Alt (cm)	No. H
T1	3,8 ^{ab}	2,0 ^a	11,0 ^{ab}	5,0 ^a	16,8 ^a	8,0 ^a
T2	2,9 ^{ab}	1,6 ^{ab}	9,8 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,8 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T3	3,0 ^{ab}	0,8 ^b	10,9 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,9 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T4	2,6 ^{ab}	0,8 ^b	9,2 ^{ab}	3,8 ^{ab}	15,7 ^{ab}	6,8 ^{ab}
T5	2,4 ^{ab}	1,6 ^{ab}	8,2 ^{ab}	3,8 ^{ab}	13,2 ^{ab}	6,8 ^{ab}
T6	3,7 ^{ab}	2,0 ^a	9,9 ^{ab}	5,0 ^a	14,9 ^{ab}	8,0 ^a
T7	3,4 ^{ab}	1,6 ^{ab}	9,5 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,5 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T8	2,9 ^{ab}	1,6 ^{ab}	9,8 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,8 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T9	2,7 ^{ab}	1,6 ^{ab}	7,8 ^{ab}	3,2 ^b	12,8 ^{ab}	6,2 ^b
T10	3,8 ^{ab}	2,0 ^a	11,3 ^{ab}	5,0 ^a	16,3 ^{ab}	8,0 ^a
T11	2,7 ^{ab}	1,6 ^{ab}	8,1 ^{ab}	3,2 ^{ab}	13,1 ^{ab}	6,2 ^{ab}
T12	1,3 ^b	1,6 ^{ab}	7,3 ^b	3,2 ^{ab}	12,3 ^b	6,2 ^{ab}
T13	3,2 ^{ab}	2,0 ^{ab}	10,3 ^{ab}	4,4 ^b	15,3 ^{ab}	7,4 ^b
T14	3,6 ^{ab}	2,0 ^a	11,5 ^{ab}	5,0 ^a	16,5 ^{ab}	8,0 ^a
T15	3,4 ^{ab}	2,0 ^a	10,7 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,7 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T16	2,9 ^{ab}	2,0 ^a	10,2 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,2 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T17	2,3 ^{ab}	1,2 ^{ab}	9,7 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,7 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T18	3,7 ^{ab}	2,0 ^a	10,8 ^{ab}	5,0 ^a	15,8 ^{ab}	8,0 ^a
T19	2,7 ^{ab}	1,6 ^{ab}	9,8 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,8 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T20	3,7 ^{ab}	2,0 ^a	11,0 ^{ab}	5,0 ^a	16,0 ^{ab}	8,0 ^a
T21	3,3 ^{ab}	2,0 ^a	10,8 ^{ab}	5,0 ^a	15,8 ^{ab}	8,0 ^a
T22	3,8 ^{ab}	2,0 ^a	11,6 ^{ab}	5,0 ^a	16,6 ^{ab}	8,0 ^a
T23	4,0 ^{ab}	2,0 ^a	11,5 ^{ab}	5,0 ^a	16,5 ^{ab}	8,0 ^a
T24	2,4 ^{ab}	1,6 ^{ab}	9,2 ^{ab}	3,8 ^{ab}	14,2 ^{ab}	6,8 ^{ab}
T25	3,0 ^{ab}	1,6 ^{ab}	10,1 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,1 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T26	3,2 ^{ab}	2,0 ^a	10,2 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,2 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T27	2,9 ^{ab}	1,2 ^{ab}	9,9 ^{ab}	4,4 ^{ab}	14,9 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T28	3,7 ^{ab}	1,2 ^{ab}	10,1 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,1 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T29	2,7 ^{ab}	1,2 ^{ab}	7,8 ^{ab}	3,2 ^b	12,8 ^{ab}	6,2 ^b
T30	2,9 ^{ab}	2,0 ^a	10,2 ^{ab}	4,4 ^{ab}	15,2 ^{ab}	7,4 ^{ab}
T31	4,2 ^a	1,6 ^{ab}	11,7 ^a	4,4 ^{ab}	16,8 ^a	7,4 ^{ab}
T32	1,3 ^b	0,8 ^b	7,2 ^b	3,8 ^b	11,8 ^b	6,2 ^b
T33	2,3 ^{ab}	0,8 ^b	8,7 ^{ab}	3,8 ^{ab}	13,7 ^{ab}	6,8 ^{ab}
Error estándar	0,731023	0,35505	10,517	0,54272	103,778	0,54272

Anexo 5 Parámetros morfológicos, Nódulos, Biomasa y % de Nitrógeno

Trat.	Código	Localidad	NN	PFN	PSN	PSR	PSF	% Total N
1	NAR1 (<i>R. tropici</i>)	Paltas	76,8	463,66	55,98	158,12	612	2,29
2	NAR2 (<i>R. tropici</i>)	Paltas	91,4	478,52	45,2	157,9	574	2,77
3	PIN1 (<i>R. etli</i>)	Pindal	71,4	362,4	40,42	219,3	738,8	3
4	PIN3 (<i>R. leguminosarum</i>)	Pindal	66,6	546,22	56,62	230,54	658	2,44
5	TAB1 (<i>R. sp.</i>)	Calvas	59,6	508,72	59,46	239,84	694	2,8
6	TAB2 (<i>R. sp.</i>)	Calvas	60,4	392,26	39,54	264,16	600	2,62
7	COL1 (<i>R. leg. bv. viceae</i>)	Calvas	64,6	385,1	41,08	133,12	586	2,39
8	COL6 (<i>R. leg. bv. viceae</i>)	Calvas	105	381,14	55,48	234,38	755,2	3,04
9	TAM1 (<i>R. tropici</i>)	Catamayo	78,2	496,34	35,42	157,34	636	2,63
10	TAM2 (<i>R. tropici</i>)	Catamayo	89	482,48	53,88	128,66	528	2,88
11	CB1 (<i>R. tropici</i>)	Catamayo	74,6	360,92	49,44	208,58	632	2,57
12	CB2 (<i>R. tropici</i>)	Catamayo	70,2	360,46	52,02	221,06	690	2,48
13	NAM1 (<i>R. mesoamericanum</i>)	Gonzanamá	107,6	581,16	77,12	283,6	706	3,08
14	NAM2 (<i>R. mesoamericanum</i>)	Gonzanamá	41,6	238,12	30,2	184,86	658	2,47
15	SOS1 (<i>R. undicola</i>)	Sozoranga	74,8	380,44	44	192,7	682	2,74
16	SOS 4(<i>R. uncultured</i>)	Sozoranga	71,8	351,32	29,86	168,3	712	3,17
17	LP1 (<i>R. tropici</i>)	Celica	80,4	522,06	76,42	186,18	634	2,61
18	LP2 (<i>R. tropici</i>)	Celica	81,8	280,32	31,28	258,7	534	2,71
19	VP1 (<i>R. etli</i> <i>bv. mimosae</i>)	Loja	92,8	440,26	51,88	182,78	538	2,97
20	VP2 (<i>R. tropici</i>)	Loja	91,2	430,04	42,2	228,42	546	3,08
21	VP3 (<i>R. etli</i> <i>bv. mimosae</i>)	Loja	92	591,04	55,9	156,3	582	2,54
22	VP4 (<i>R. tropici</i>)	Loja	75,2	492,34	64,1	120,44	704	2,47
23	RC1 (<i>R. tropici</i>)	Loja	30,6	158,08	18,08	251	636	2,7
24	RC2 (<i>R. tropici</i>)	Loja	81	610,02	81,82	256,56	630	2,75
25	TUR1 (<i>R. leguminosarum</i>)	Loja	48,8	298,74	27,48	198,32	710	2,51
26	TUR2 (<i>R. leguminosarum</i>)	Loja	90,2	399,86	54,52	169,98	480	2,93
27	RAI1 (<i>R. tropici</i>)	Loja	74,4	409,96	48,94	203,62	748	2,59
28	RAI2 (<i>R. tropici</i>)	Loja	82,8	461,26	51,1	196,46	676	2,97
29	Q2 (<i>R. leg. bv. viciae</i>)	Saraguro	76,8	465,52	45,9	150,66	598	2,17
30	Z1 (<i>R. leg. bv. viceae</i>)	Saraguro	85	512,02	70,26	128,94	668	2,27
31	Z3 (<i>R. leg. bv. viceae</i>)	Saraguro	68,4	466,3	48,9	228,44	700	2,91
32	Co		0	0	0	137,92	593,8	2,5
33	CNPAF512 (<i>R. etli</i>)		52,6	266,48	24,82	206,64	556	2,56

Anexo 6 Tríptico de exposición de Resultados

Resultados para el segundo objetivo:

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en extracto acuoso para la testa de fréjol común, donde se puede observar la presencia abundante de fenoles, alcaloides, carbohidratos y saponinas y la ausencia de flavonoides y cumarinas

Tabla 2. Compuestos fenólicos obtenidos de la testa de fréjol en extracto acuoso

Compuestos fenólicos (CF)	Mantequilla
Saponinas	++
Carbohidratos	++
Fenoles	++
Alcaloides	++
Flavonoides	-
Cumarinas	-

Presencia de CF: moderado (+) abundante (++); Ausencia de CF (-)

Resultados para el tercer objetivo:

En la investigación se utilizó un genotipo de fréjol común de la provincia de Loja (mantequilla), en el cual se evaluó el efecto de diferentes cepas de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, biomasa y fijación de nitrógeno con el fin de determinar la eficiencia en condiciones controladas en la hoya de Loja.



Resultados para el tercer objetivo:

Número de Nódulos Totales

Se evidenció la presencia de nódulos en las raíces, comprobando la compatibilidad entre Leguminosa-*Rhizobium*. En la Figura 3 se muestra el número de nódulos totales al final del experimento, en donde los tratamientos con mayor número de nodulaciones y homogeneidad son los tratamientos: T13-NAM1 (R. mesoamericanum), T8-COL6 (R. leg. bv. viceae), T19-VP1 (R. etli bv. mimosae), T21-VP3 (R. etli bv. mimosae), T2-NAR2 (R. tropici), T20-VP2 (R. tropici), T26-TUR2 (R. leguminosarum), T10-TAM2 (R. tropici), sin embargo, el tratamiento control T32 presenta una diferencia significativa al no presentar nódulos.

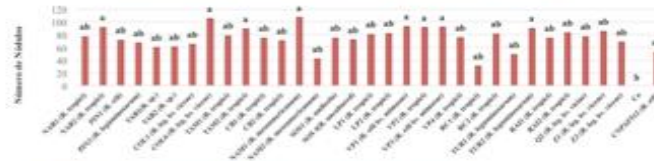
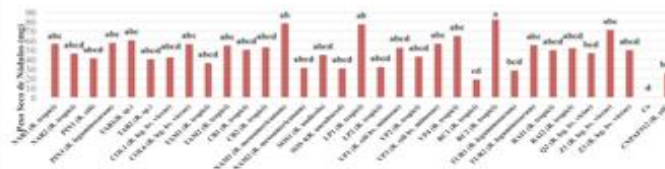


Figura 3.- Número de Nódulos por tratamiento

Peso Seco de Nódulos

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos en la variable de peso seco de los nódulos en la que se pudo observar que el tratamiento T24-RC2 (R. tropici) difiere significativamente sobre el tratamiento testigo T32.



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

Tesis:

“Efecto de la inoculación de diferentes cepas de *Rhizobium* sobre una variedad comercial de fréjol común nativa de la provincia de



Autora:
Catherine Ocampo Guaycha
Director:
Ing. Iván Granda Mora Mg. Sc.

Loja – Ecuador
2015

INTRODUCCIÓN

El fréjol (*Phaseolus vulgaris*) es una planta perteneciente a la familia de las leguminosas las mismas que están distribuidas ampliamente por todo el mundo y es una fuente de proteína mucho más que el resto de vegetales, su adaptabilidad esta entre los 800-2 500 msnm se cultiva en valles y estribaciones en los cuales podemos encontrar diferentes tipos de suelos y climas (INIAP, 2010).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y asociación con los vegetales; sin embargo, sólo una pequeña proporción de especies son capaces de hacerlo, debido a que las más eficaces son aquellas que están asociadas directamente con las plantas (Baca et al, 2000). Las bacterias del genero *Rhizobium* tienen diferentes mecanismos de producción como son los nódulos que son estructuras especializadas donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno que son controladas por fitohormonas como son las auxinas que regulan la producción de hormonas por parte de la planta (Contreras, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de la inoculación de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos, fisiológicos y fijación de N en variedad comercial de fréjol común.

Objetivo Específicos

- Cuantificar la producción de auxinas y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*.
- Determinar compuestos fenólicos de la testa de fréjol común.
- Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas.

METODOLOGÍA

Metodología para el primer objetivo:

- "Cuantificación de la producción de auxinas, y solubilización de fosfatos de las cepas nativas de *Rhizobium*"
 - El análisis de la producción de auxinas AIA, se realizó por el método colorimétrico usándose el reactivo Salkowski.
 - Para verificar la capacidad de las cepas de *Rhizobium* de solubilizar fosfatos inorgánicos, estas se inocularon por estrías en medio de cultivo Pikovskaya modificado (Nopparat et al., 2009).

Metodología para el segundo objetivo:

- "Determinar compuestos fenólicos de la testa de fréjol común"

Se extrajo los compuestos fenólicos mediante el solvente de extracción, luego se cuantificaron los fenoles totales en el cual se empleo el método de Folin Ciocalteu, descrito por Singleton et al., (1999), con las muestras del extracto acetónico, y a continuación se realizó la cuantificación de flavonoides totales con la técnica descrita por Liu et al., (2002).

Metodología para el tercer objetivo:

- "Evaluar el efecto de diferentes cepas nativas de *Rhizobium* sobre la formación de nódulos, biomasa radical, foliar y la fijación de nitrógeno en una variedad de fréjol común, bajo condiciones controladas"



El experimento se realizó utilizando un diseño experimental totalmente aleatorizado con 33 tratamientos y 5 réplicas bajo invernadero. Las semillas utilizadas fueron de fréjol Mantequilla

RESULTADOS

Resultados para el primer objetivo:

En la Figura 1, se muestran los análisis de la producción de auxinas AIA (ácido 3-indol acético) por cada uno de los tratamientos, evidenciándose que hay diferencias significativas entre éstos.

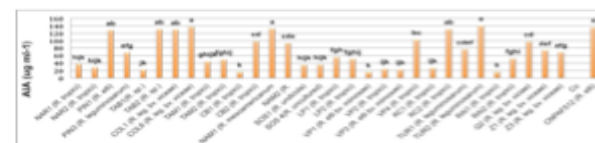


Fig.1 Producción de Auxinas; Los tratamientos T8, T13, T26, T33 tienen los valores más altos en cuanto a producción de auxinas, cuya diferencia es importante en relación con el resto de aislados; en el otro extremo, con valores bajos se encuentran los tratamientos con menor resultado en cuanto a la producción de auxinas como son T11, T19, T27.

En la figura 2 se muestran los análisis de solubilización de fosfatos en donde el tratamiento T14-NAM2 (*R. mesoamericanum*) marcó un diámetro del halo de 2,97875 mm, esto muestra una diferencia significativa frente al resto de tratamientos ya que solubilizó fósforo inorgánico en medio de cultivo Pikovskaya.

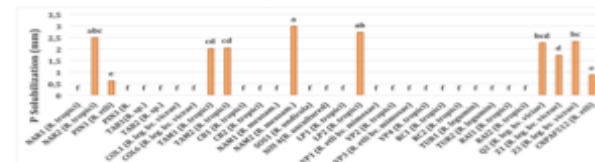


Fig. 2. Solubilización de fosfatos.

Anexo 7 Evidencia Fotográfica

“Efecto de la inoculación de diferentes cepas de *Rhizobium* sobre una variedad comercial de fréjol común nativa de la provincia de Loja.”



Fig. 1 Esterilización de sustrato previo al llenado de macetas, Sector Moraspamba, 2015



Fig. 2 Preparacion de la semilla para la postero siembra, Laboratorio de Biotecnología, 2015.



Fig. 3 Llenado de tarrinas y colocación en el sitio de experimento, Secto los Molinos, 2015



Fig. 4 Siembra de fréjol mantequilla, Sector los Molinos, 2015.



Fig. 5 Inoculación directamente en las semillas de fréjol, Sector los Molinos, 2015.



Fig. 6 Toma de las muestras de campo, se las color en fundas de papel y fueron etiquetadas con su respectivo código, Sector los Molinos, 2015.



Fig. 7 Las Muestras transportadas al laboratorio del Centro de Biotecnología para ser evaluadas, 2015.



Fig. 8 Tomando en cuenta los parámetros de evaluación se procedió al lavado de las muestras para la extracción de los nódulos y su posterior pesaje en fresco y en seco, Laboratorio de Biotecnología, 2015.



Fig. 9 Muestras de la biomasa de la raíz y el follaje que se tomaron los datos del peso en fresco y en seco, Laboratorio de Biotecnología, 2015.

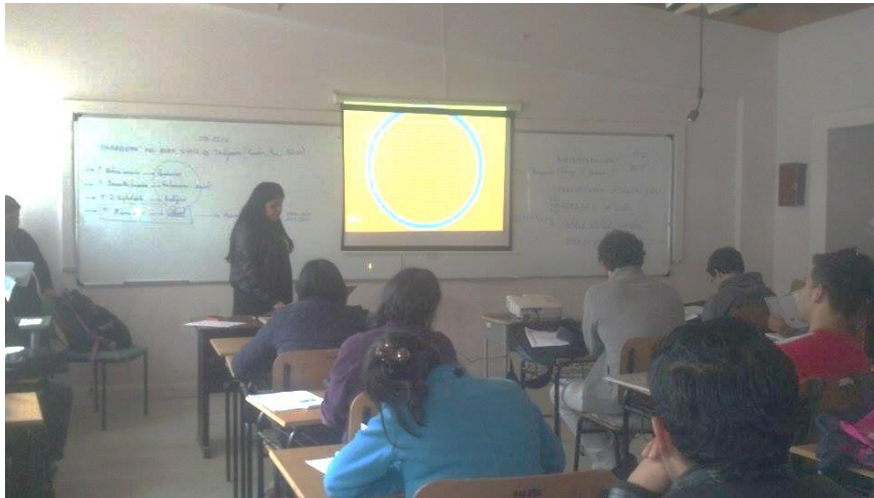


Fig. 10 Socialización de resultados de Tesis. Carrera de Ingeniería Agronómica, 2015.