



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE  
LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS  
DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL  
COMÚN EN LA HOYA DE LOJA”**

Tesis previa a la obtención del  
título de Ingeniera Agrónomo.

**AUTORA:**

Juliana Lilibet Cacay Soto

**DIRECTOR DE TESIS:**

Ing. Klever Iván Granda Mora. Mg. Sc.

**LOJA - ECUADOR**

**2016**



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

---

---

**CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

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 “**EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA**”, realizada por la egresada, **JULIANA LILIBET CACAY SOTO**, previo a la obtención del título de **INGENIERA AGRÓNOMO**, ha sido revisado y se autoriza su presentación final para la calificación correspondiente.

Loja, 04 de enero del 2016

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



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

---

**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 **“EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA”**, de la egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica; **Juliana Lilibet Cacay Soto**, ha sido revisada y en la misma se ha incorporado todas las sugerencias, por lo que aprobamos su impresión y publicación.

Loja, 04 de enero del 2016

**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**

2016



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

---

**AUTORÍA**

Yo, Juliana Lilibet Cacay Soto, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

**Autora:** Juliana Lilibet Cacay Soto

Firma:

Cédula: 1105165136

Fecha: Loja, 04 de enero del 2016.



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

---

---

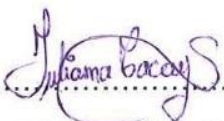
**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL  
AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O  
TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO  
COMPLETO.**

Yo, Juliana Lilibet Cacay Soto; declaro se autora de la tesis titulada "EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA", como requisito para optar al grado de: INGENIERA AGRÓNOMO, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

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

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

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 4 días del mes de enero del 2016, firma el autor.

Firma: .....

**Autora:** Juliana Lilibet Cacay Soto

**Número de Cédula:** 1105165136

**Dirección:** Loja, Carigan **Correo electrónico:** juliana.lilibet@hotmail.com

**Teléfono:** 2105371 **Celular:** 0994077542

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de Tesis:** Ing. Klever Iván Granda Mora. Mg. Sc.

**Tribunal de Grado:** Ing. Gilberto Álvarez Cajas PRESIDENTE  
Ing. Ángel Rolando Carrión Mg. Sc. VOCAL  
Ph. D. Roldán Torres Gutiérrez. VOCAL



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

---

---

## **AGRADECIMIENTO**

Manifiesto mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, a través de la Carrera de Ingeniería Agronómica; a todos y cada uno de los docentes que supieron guiar el proceso de aprendizaje con sus conocimientos y experiencia; además de formarme en lo académico, científico y humanístico siendo una muestra de ellos el Ingeniero Gilberto Álvarez Cajas, que ha sido un profesor ejemplar, amigo y sobre todo una persona que ha sabido tener paciencia ante sus estudiantes y ahora de tener la oportunidad de que sea presidente de tribunal de tesis.

Al Centro de Biotecnología quien aportó con el financiamiento, información y apoyo constante por parte del Dr. Roldan Torres y Mg. Sc. Ángel Robles, por su orientación y desarrollo de la investigación con la finalidad de llegar a los objetivos propuestos del presente trabajo de tesis.

De una manera muy sincera y especial a Ing. Mg. Sc. Klever Iván Granda Mora, en calidad de Director de Tesis quien con dedicación brindo su ayuda, paciencia y guía incondicional para que esta investigación se lleve a cabo, pero sobre todo por creer en mí.

**Juliana Lilibet**



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

---

---

## **DEDICATORIA**

Con aprecio y con lo más profundo de mis sentimientos a mi familia, empezando con mis padres Cecilia Soto y Luis Cacay, porque ellos han estado apoyándome en las decisiones que he tomado, en la formación como profesional y persona; a mis tres hermanos Edison, Jefferson y Javier Cacay Soto por formar parte de mi vida; a mis compañeras y amigas Sandra Curimilma, Jessenia Torres y Verónica Villa, a mi más que amiga, considerada como hermana Marlene Ávila, por ser una personas valiosa y contar con ella desde que inicie los estudios universitarios y que hasta ahora contamos con nuestro incondicional apoyo; y finalmente a todas esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme la ayuda incondicional que hizo posible la culminación del presente trabajo.

**Juliana Lilibet**

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	Páginas
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iii
AUTORÍA .....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
INDICE GENERAL .....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xi
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO REFERENCIAL .....	3
2.1. Generalidades del cultivo de fréjol .....	3
2.1.1. Origen e importancia económica y social del cultivo de fréjol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
2.1.2. Clasificación taxonómica del fréjol. ....	4
2.1.3. Condiciones agroclimáticas para el cultivo de fréjol. ....	4
2.1.4. Características de las variedades de fréjol común .....	5
2.2. El nitrógeno y las plantas .....	6
2.2.1. Dinámica del nitrógeno.....	6
2.3. Bacterias diazotróficas simbióticas.....	8
2.3.1. Género <i>Rhizobium</i> .....	8
2.3.2. Clasificación taxonómica de <i>Rhizobium</i> .....	9
2.3.3. Proceso de nodulación de <i>Rhizobium</i> .....	10
2.3.4. Tipos de nódulos .....	11
2.4. Simbiosis <i>Rhizobium</i> - leguminosa.....	12
2.5. Especificidad y eficacia de las cepas de rizobios .....	12



<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	14
3.2. MATERIALES.....	15
3.2.1. Material experimental. ....	15
3.2.2. Equipos de laboratorio. ....	15
3.2.3. Materiales de laboratorio. ....	15
3.2.4. Reactivos de laboratorio.....	15
3.2.5. Materiales de campo. ....	15
3.2.6. Materiales de oficina. ....	15
3.3. METODOLOGÍA.....	16
3.3.1. Metodología para el primer objetivo .....	16
3.3.2. Metodología para el segundo objetivo.....	18
3.3.3. Metodología para el tercer objetivo .....	18
3.4. Análisis estadístico .....	21
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Efecto de la inoculación con <i>Rhizobium</i> en nodulación, morfológicos y biomasa en tres variedades de fréjol.....	22
4.1.1. Parámetros de Nodulación.....	22
4.1.2. Parámetros morfológicos.....	24
4.1.3. Parámetros de biomasa de la raíz y el follaje.....	27
4.2. Efecto de los aislados de <i>Rhizobium</i> sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (blanco belén, mantequilla y rojo percal) .....	29
4.3. Pruebas de correlación Pearson. ....	33
4.4. Propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación”.....	37
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
5.1. Efecto de los aislados sobre los parámetros de nodulación.....	40
5.2. Efecto de los aislados sobre los parámetros morfológicos.....	41
5.3. Parámetros de biomasa de la raíz y el follaje.....	42

5.4.	Efecto de los aislados de <i>Rhizobium</i> sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (blanco belén, mantequilla y rojo percal) .....	43
5.5.	Pruebas de correlación de Pearson .....	43
5.6.	Influencia de los aislados bacterianos en las propiedades microbiológicas del suelo .....	44
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>47</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>

## INDICE DE CUADROS

CONTENIDO	Páginas
<b>Cuadro 1.</b> Parámetros evaluados en el análisis físico y químico .....	19
<b>Cuadro 2.</b> Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol rojo percal, sector los molinos “la argelia” .....	37
<b>Cuadro 3.</b> Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol blanco belén, sector los molinos “la argelia” .....	38
<b>Cuadro 4.</b> Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol mantequilla, sector los molinos “la argelia”. .....	38

## INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Páginas
<b>Figura 1.</b> Formación de un nódulo indeterminado en la leguminosa .....	11
<b>Figura 2.</b> Mapa de ubicación del área de estudio.....	14
<b>Figura 3.</b> Diluciones seriadas para aislamiento de hongos, bacterias y actinomicetos.....	20
<b>Figura 4.</b> Número de nódulos para las variedades de fréjol: rojo, blanco belén y mantequilla.....	22
<b>Figura 5.</b> Peso seco y peso fresco de nódulos de la variedad de fréjol rojo percal.....	23
<b>Figura 6.</b> Peso fresco y seco de nódulos de la variedad de fréjol blanco belén.....	24
<b>Figura 7.</b> Peso fresco y seco de nódulos de la variedad mantequilla.....	24
<b>Figura 8.</b> Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol rojo.....	25
<b>Figura 9.</b> Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol blanco belén.. ...	25
<b>Figura 10.</b> Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad mantequilla.....	25
<b>Figura 11.</b> Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol rojo percal.....	26
<b>Figura 12.</b> Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol blanco belén.....	26
<b>Figura 13.</b> Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad mantequilla..	26
<b>Figura 14.</b> Peso fresco y seco de raíz de la variedad de fréjol rojo.....	27
<b>Figura 15.</b> Peso fresco y seco de raíz de la variedad blanco belén.....	27
<b>Figura 16.</b> Peso fresco y seco de raíz de la variedad mantequilla.....	28
<b>Figura 17.</b> Peso fresco y peso fresco de follaje de la variedad de fréjol rojo percal.....	28
<b>Figura 18.</b> Peso fresco y seco del follaje de la variedad de fréjol blanco belén.....	29
<b>Figura 19.</b> Peso fresco y seco de follaje de la variedad mantequilla.....	29
<b>Figura 20.</b> Número de vainas por planta de las variedades de fréjol: rojo, blanco belén y mantequilla.....	30

<b>Figura 21.</b> Peso de vainas por planta de las variedades de fréjol rojo percal, blanco belén y mantequilla.....	30
<b>Figura 22.</b> Numero de granos por planta de las variedades de fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla. ....	31
<b>Figura 23.</b> Peso de granos por planta de las variedades de fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla. ....	32
<b>Figura 24.</b> Rendimiento agrícola en fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla.....	32

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE  
BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL COMÚN  
EN LA HOYA DE LOJA”**

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto benéfico de la inoculación de cepas nativas de *Rhizobium*, sobre parámetros de nodulación, morfológicos, biomasa y rendimiento agrícola en tres variedades de frejol común, así como determinar las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo antes y después en el área de experimentación bajo condiciones de campo, empleando un diseño experimental de bloques al azar con 6 tratamientos y 4 réplicas, tres tratamientos con cepas de *Rhizobium* procedentes del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja: (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), (*Rhizobium tropici*-Catamayo), (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro); un tratamiento con la cepa tipo CIAT 899 899 (*Rhizobium tropici*), un tratamiento con fertilización química (Urea) y un tratamiento sin fertilización ni inoculación. Antes de la siembra se elaboró el inóculo, para posteriormente realizar la peletización en las semillas de las variedades en estudio. Para evaluar parámetros morfológicos, de biomasa y componentes de rendimiento se seleccionaron 5 plantas al azar de cada réplica, en los 7 y 21 días después de la siembra (DDS) se evaluaron la altura de plantas y número de hojas, a los 30 DDS se continuaron con los parámetros de nodulación: número de nódulos (NN), peso fresco y peso seco de los nódulos (PFN-PSN), así como los parámetros de biomasa: peso fresco y peso seco del follaje (PFF-PSF), peso fresco y peso seco de la raíz (PFR-PSR). Finalmente a los 90 DDS se evaluaron los componentes del rendimiento: número de granos por planta (NGP), peso de vainas por planta (PVP), número de vainas por planta (NVP) y peso de granos por planta (PGP) y para el rendimiento agrícola se tomó 40 plantas por réplica y tratamiento, extrapolando a  $Tm\ ha^{-1}$ . De manera general las cepas aisladas de Gonzanamá (*Rhizobium miluonense*) y Catamayo (*Rhizobium tropici*) influenciaron significativamente los parámetros de nodulación y biomasa, asimismo la cepa aislada de Saraguro (*Rhizobium lusitanum*) en componentes de rendimiento agrícola, en todos los casos estas cepas nativas fueron superiores a los tratamientos Control y Fertilización. Estos resultados valorizan el potencial de las cepas nativas de *Rhizobium* para su utilización como biofertilizantes y elevar las tasas de fijación de nitrógeno en el cultivo de frejol común.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate the beneficial effect of inoculation of native strains of *Rhizobium* on nodulation, morphological, biomass and crop yield parameters of three common bean varieties. In addition, to determine the physical, chemical and microbiological properties of the soil before and afterwards in the area of experimentation under field conditions using a randomized experimental block design with 6 treatments and 4 replications. Three treatments were administered with *Rhizobium* strains from the Biotechnology Center of the National University of Loja (*Rhizobium miluonense* from Gonzanamá) (*Rhizobium tropici* from Catamayo) (*Rhizobium lusitanum* from Saraguro); one treatment with CIAT 899 899 type strain (*Rhizobium tropici*), another treatment with chemical fertilizers (Urea) and a third treatment without fertilization or inoculation. Before planting the inoculum was developed, to later carry out seed pelletizing of the varieties under study. Five random plants, 7 to 21 days after planting (DAP) pertaining to each replication were selected in order to evaluate the morphological, biomass and yield component parameters. Plant height and number of leaves were evaluated. 30 DAP the nodulation parameters were measured: the number of nodes (NN), fresh and dry weight of nodules (FWN-DWN) and biomass parameters: fresh weight and dry weight of foliage (FWF-DWF), fresh weight and dry weight of the root (FWR-DWR). Finally, at 90 DDS the yield components were evaluated: number of grains per plant (NGP), weight of pods per plant (WPP), number of pods per plant (NPP) and weight of grains per plant (WGP). With respect to the agricultural output 40 plants per replicate and treatment were selected, and the tons /ha-1 were extrapolated. In general, the isolated strains from Gonzanamá (*Rhizobium miluonense*) and Catamayo (*Rhizobium tropici*) significantly influenced the nodulation and biomass parameters, as did the isolated strain from Saraguro (*Rhizobium lusitanum*) with respect to the crop yield components. In all cases these native strains were superior to the fertilization treatments and controls. These results demonstrate the great potential of the native *Rhizobium* strains as a viable source of bio-fertilizers and a way to raise the nitrogen fixation rates in common bean cultivation.



## I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el cultivo de fréjol es una de las leguminosas más consumidas y de interés agrícola por su fácil cultivo, en el 2013 se sembraron 38 858 ha de fréjol en el país, de las cuales 11 176 ha fueron de cultivo solo y 27 682 ha en asocio, cuya producción total fue de 10 774 t. La productividad del fréjol seco fue  $602 \text{ kg ha}^{-1}$ , mientras que de fréjol tierno fue  $1 109 \text{ kg ha}^{-1}$ , según cifras del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos - Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria INEC- ESPAC, 2013).

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 (Zaccardelli *et al.*, 2013). Este proceso contribuye a la nutrición y desarrollo de las plantas en suelos deficientes de nitrógeno (López-Guerrero *et al.*, 2012). A pesar de la importancia agronómica de este proceso, la cantidad de nitrógeno fijado por el fréjol común en condiciones de campo, es a menudo baja, en comparación con la fijada por otras leguminosas (Remans *et al.*, 2008). Se ha demostrado en varias investigaciones que el éxito de la interacción simbiótica depende en gran medida de la competitividad, especificidad, compatibilidad y eficacia de los rizobios con su leguminosa huésped (Naveed *et al.*, 2012 y Michiels *et al.*, 1998). Estos aspectos son determinantes en el cultivo del fréjol común, ya que es bien conocido que es una leguminosa promiscua en la infección con cepas de *Rhizobium*, el cual puede ser colonizado por varias especies de este género en una misma planta (Ribeiro *et al.*, 2013).

Precisamente las cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos de fréjol común han mostrado una considerable diversidad genética, lo cual sugiere que diferentes cepas nativas de rizobios pueden asociarse a las raíces del fréjol común (López-Guerrero *et al.*, 2012 y Mnasri *et al.*, 2007). A nivel global, diferentes investigaciones se han llevado a cabo para determinar la identidad de sociedades bacterianas ligadas al proceso de fijación simbiótica del nitrógeno (FSN) (Trabelsi *et al.*, 2011), sin embargo, trabajos similares son muy escasos en regiones andinas como Ecuador (Bernal, 2006). A pesar de

ser centro de origen y domesticación de *Phaseolus vulgaris* (Beebe *et al.*, 2013) no se conoce lo suficiente sobre la compatibilidad, especificidad y eficacia de rizobios en la formación de nódulos, promoción de biomasa y fijación de N con su planta huésped (Yadegari *et al.*, 2010), mucho menos en la estimulación de parámetros fenotípicos y rendimiento agrícola de la leguminosa (Fentahun *et al.*, 2013 y Chanway *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos aspectos, es de singular importancia la realización de ensayos que se centren en dilucidar la capacidad de mejorar la simbiosis de estos microorganismos con frejol común y por ende aspectos cruciales en la FBN, tales como la nodulación, fijación de N, estimulación del crecimiento de las plantas y rendimiento agrícola para este cultivo.

La importancia de esta investigación mediante estudios de interacción *Rhizobium*-leguminosa, radica en la obtención de combinaciones idóneas de cepas-genotipos para mejorar la eficiencia del proceso simbiótico, y elevar las tasas de fijación de nitrógeno para incrementar las producciones agrícolas de frejol común.

Por tanto para cumplir con estos estudios se plantearon los siguientes objetivos.

- Identificar el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, morfológicos y biomasa en tres variedades de fréjol común bajo condiciones de campo.
- Determinar el efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (rojo percal, blanco belén y mantequilla).
- Evaluar la influencia de la aplicación de los aislados sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación.

## **II. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1. Generalidades del cultivo de fréjol**

#### **2.1.1. Origen e importancia económica y social del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.).**

Las evidencias aportadas por estudios con enfoques arqueológico, morfológico-agronómico, bioquímico y molecular, indican que el fréjol tiene su centro de origen en la región de mesoamérica, particularmente en el occidente y sur de México (desde Jalisco hasta Oaxaca), y que hubo dos centros de domesticación: uno primario (mesoamérica) y otro secundario (sur andino). Las evidencias actuales no permiten discernir claramente al norte andino como un centro de domesticación adicional (Hernández *et al.*, 2013).

El fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), presuntamente, fue introducido en América por las tribus nómadas que cruzaron el estrecho de Bering hasta Alaska. Hay evidencias que en el siglo X los Aztecas en México usaron el fréjol como un grano básico, y que los Incas lo introdujeron a Suramérica (Velásquez y Giraldo, 2005).

Es la leguminosa de grano de consumo humano directo más importante en el planeta; ocupa el octavo lugar entre las leguminosas sembradas en el mundo, en el Ecuador constituye un alimento básico no solamente por el aporte de proteínas y minerales, sino a la vez por la superficie cultivada que garantiza la seguridad y soberanía alimentaria. (Torres *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2013)

Según el INEC- ESPAC (2013), en el Ecuador se han sembrado 38 858 hectáreas de fréjol, cosechando de estas 10 656 con una producción de 4 357 TM. El promedio nacional de producción por hectárea de fréjol seco es de 602 kg ha<sup>-1</sup>, mientras de que de fréjol tierno es de 1 109 kg ha<sup>-1</sup>.

### 2.1.2. Clasificación taxonómica del fréjol.

Reino	<i>Plantae,</i>
Subreino	<i>Embriobionta,</i>
División	<i>Magnoliophyta,</i>
Clase	<i>Magnoliopsida,</i>
Orden	<i>Fabales,</i>
Familia	<i>Fabaceae,</i>
Subfamilia	<i>Phaseolae,</i>
Tribu	<i>Papilionoidae,</i>
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>vulgaris.</i>

Ulloa, Ramírez *et al.*, 2011.

### 2.1.3. Condiciones agroclimáticas para el cultivo de fréjol.

Según Andino (2013) en el Ecuador las zonas productoras de fréjol arbustivo se localizan tanto en las estribaciones de la cordillera, a alturas que oscilan entre los 1 000 y 2 500 msnm, como en valles entre los 800 y 1 200 msnm.

Los factores climáticos que más influyen en el desarrollo del cultivo son la temperatura y la luz. Temperaturas bajas retardan el crecimiento, mientras que las altas causan una aceleración; el crecimiento del fréjol se produce entre 15 y 27 °C. El papel más importante de la luz está en la fotosíntesis, pero también afecta la fenología y morfología de la planta. El fréjol es una especie de días cortos, los días largos tienden a causar demora en la floración y la madurez. Cada hora más de luz por día puede retardar la maduración de dos a seis días (Arias *et al.*, 2007).

La precipitación pluvial anual debe ser de 100 – 300 mm y la humedad relativa entre 40 – 60 %. Estudios realizados para medir el consumo de agua del fréjol a lo largo de las etapas de desarrollo han permitido determinar que el mayor consumo se da en las etapas de floración y formación de las vainas (Peralta *et al.*, 2009; Ríos y Quirós, 2002)

Según Peralta *et al.*, (2009) el pH óptimo para el cultivo de fréjol es de 5,5 a 7,5. El fréjol absorbe cantidades altas de N, K y Ca y en menor cantidad S, Mg y P. La información que se muestra en el Tabla 1 da una idea de los requerimientos de los nutrientes esenciales para el fréjol, obtenida a partir de trabajos realizados en el trópico con fréjol de hábito de crecimiento I (determinado arbustivo) (Arias *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Exigencias minerales del fréjol.

Componentes de la cosecha	kg/ha <sup>-1</sup>					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Vainas	32	4	22	4	4	10
Tallos	65	5	71	50	14	15
Total	97	9	93	54	18	25

#### 2.1.4. Características de las variedades de fréjol común

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

**Fréjol blanco belén:** Esta variedad presenta un hábito de crecimiento determinado de tipo I, sobre su frase de floración lo realizan a la 43 días después de la siembra y 99 días para la cosecha. En Ecuador se cultiva en los Valles de Cañar, Azuay y Loja. El rango de adaptabilidad es de 1400 a 2400 msnm (INIAP, 2010).

**Fréjol mantequilla:** Esta variedad presenta un hábito de crecimiento determinado de tipo I, sobre su frase de floración lo realizan a la 40 días después de la siembra y de 82 días para la cosecha. El rango de adaptabilidad es de 1500 a 2200 msnm (Cuesta, 2004).

## **2.2. El nitrógeno y las plantas**

El nitrógeno es un elemento diatómico y se encuentra en estado gaseoso a temperatura y presión ordinaria, comprende el 78 % de la atmósfera terrestre y en su forma elemental es relativamente inerte, siendo esencial para todos los seres vivos. A pesar de ser un elemento más común del planeta, es también el nutriente que con más frecuencia limita la producción de los cultivos. (Pacheco *et al.*, 2002; Perdomo *et al.*, 1999; Arias, 2007).

### **2.2.1. Dinámica del nitrógeno**

La dinámica de este elemento en la biosfera comprende procesos biológicos y abióticos, constando de diferentes etapas: Fijación de nitrógeno que es la conversión del nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ), la mineralización, la nitrificación, la desnitrificación y la oxidación anaeróbica del amonio Annamox, procesos mediados principalmente por microorganismos presentes en el suelo (Álvarez, 2010; Cerón *et al.*, 2012; Samaniego y Sánchez, 2015).

#### **2.2.1.1. Fijación del nitrógeno**

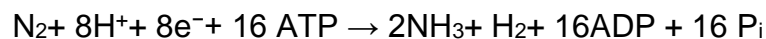
La fijación del nitrógeno se define como la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos, existen dos tipos de fijación del nitrógeno: abiótica o biológica (Calvo, 2011)

La fijación abiótica engloba aquellos procesos químicos espontáneos, en los cuales se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos orgánicos. Una forma de fijación abiótica se produce mediante descargas eléctricas, o mediante la oxidación producida por los rayos, que forman óxidos de nitrógeno (Calvo, 2011)

El ser humano también ha conseguido fijar el nitrógeno atmosférico de forma abiótica mediante el método de Haber- Bosch (método para la síntesis del amoníaco). Otro proceso abiótico de fijación de nitrógeno es la producción de cianamida que es empleada normalmente para elaborar cianuro y en ocasiones como fertilizante (Calvo, 2011).

La fijación biológica de nitrógeno la realizan algunos organismos que pueden aprovechar directamente el nitrógeno del aire (Taiz y Zeiger, 2006; citado por Calvo, 2011). Pertenecen todos ellos a un grupo biológico conocido como procariotas. Todos los organismos que reducen el  $N_2$  a  $NH_4^+$  lo hacen con la ayuda de una enzima compleja, la nitrogenasa (Granda y Erazo 2007).

La FBN resulta ser, entonces, una tecnología limpia de producción y una forma concreta de proteger el medio ambiente (Granda y Erazo, 2007).



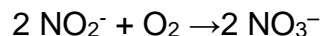
#### Fijación biológica de nitrógeno

##### 2.2.1.2. La nitrificación

Se llama nitrificación la oxidación del amoníaco a nitritos. Una de las actividades de mayor importancia de algunas bacterias autótrofas son las reacciones de oxidación que proporcionan a estos microorganismos la energía requerida para procesos celulares. La nitrificación se da en los siguientes pasos: Un grupo de bacterias (*Nitrosomonas* sp. y *Nitrococcus* sp.) oxidan el amoníaco a nitrito ( $NO_2^-$ ) (Obando, 2012).



Otro grupo de bacterias (*Nitrobacter* sp.) transforman el nitrito en nitrato, por este motivo no se encuentra nitrito en el suelo, que además es tóxico para las plantas. Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, el producto de estas reacciones (nitratos) es la forma más accesible para las plantas (Obando, 2012).



##### 2.2.1.3. La desnitrificación

Es el proceso más importante para el ciclo del nitrógeno, éste devuelve el nitrógeno fijado a la atmósfera por procesos de respiración microbiana, a través de la reducción desasimilatoria de nitratos ( $NO_3^-$ ) y nitritos ( $NO_2^-$ ) a  $N_2O$  y  $N_2$ , respectivamente; también involucra la reducción asimilatoria del nitrito

(Simón, 2002) para convertirlo en amonio e incorporarlo al metabolismo celular (Cerón *et al.*, 2012)



Procesos de desnitrificación

### 2.3. Bacterias diazotróficas simbióticas

Estas bacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las raíces de plantas leguminosas, donde se alojan y forman nódulos, toman ácidos orgánicos de las plantas y contribuyen con compuestos nitrogenados como los ureidos y las amidas de reserva. Este tipo de fijación de nitrógeno es muy eficiente al recibir las plantas los compuestos nitrogenados directamente de los microorganismos nitro fijadores que viven en simbiosis (Espín, 2002).

Dentro de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran dos grupos de organismos. El primer grupo pertenece a bacterias móviles del suelo que se denominan rizobios. A este grupo pertenecen *Rhizobium* (nodulan en raíces de leguminosas de climas templados y subtropicales), *Azorhizobium* (nódulos en tallos y raíces) y *Bradyrhizobium* (nodula raíces de soya). El segundo grupo está formado por actinomicetos (bacterias Gram positivas) que nodulan las raíces de muchos árboles y arbustos. (Calvo *et al.*, 2011).

#### 2.3.1. Género *Rhizobium*

Los *Rhizobium* son microorganismos capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico en las raíces de las plantas de la familia Leguminosae (y en sólo otra no leguminosa, *Parasponia*). Algunos rizobios también son capaces de inducir nódulos en el tallo de leguminosas (*Sesbania*, *Aeschynomene*). Son bacilos de 0,5 a 0,9 nm de ancho y 1,2 a 3,0 nm de longitud, son bacterias Gram negativas y no esporulan. Son móviles debido a flagelos peritricos o a un flagelo polar o subpolar (Paredes, 2013)



Las bacterias del género *Rhizobium* son el grupo más importante de organismos del suelo, en el cual, en condiciones favorables alcanzan números extraordinariamente elevados (100 millones de bacterias g de suelo<sup>-1</sup>); estas desempeñan un papel importante en la descomposición de residuos orgánicos y en la formación de humus que tienen como objetivo mejorar la calidad de los suelos (Morales, 2010).

### 2.3.2. Clasificación taxonómica de *Rhizobium*

Filum: *Proteobacteria*  
Clase: *Alphaproteobacteria*  
Orden: *Rhizobiales*  
Familia: *Rhizobiaceae*  
Género: *Rhizobium*

En el género de *Rhizobium* se encuentran aproximadamente 58 especies: *R. aggregatum*, *alamii*, *alkalisoli*, *borbori*, *cauense*, *vellulosilyticum*, *daejeonense*, *endophyticum*, *etli*, *fabae*, *galegae*, *gallicum*, *giardinii*, *grahamii*, *hainanense*, *hapophytocola*, *helanshanense*, *herbae*, *huautlense*, *indigoferae*, *larrymoorei*, *leguminosarum*, *leucaenae*, *loessense*, *lupini*, *lusitanum*, *mesosinicum*, *mesoamericanum*, *miluonense*, *mongolense*, *multihospitium*, *nepotum*, *oryzae*, *petrolearium*, *phaseoli*, *pisi*, *psedoryzae*, *pusense*, *qilianshamense*, *radiobacter*, *rhizogenes*, *rosettiformans*, *rubi*, *selenitireducens*, *skierniewicense*, *sphaerophysae*, *soli*, *sullae*, *tarimense*, *tibeticum*, *tropici*, *tubonense*, *undicola*, *vallis*, *vignae* y *R. vitis* (Kaur et al., 2011; López-Guerrero et al., 2012; López-López et al., 2011 y 2012; Panday et al., 2011; Ren et al., 2011; Wang et al., Salar et al., 2013).

Jordan y Allen (1974), dividieron estas especies en dos grupos de acuerdo con sus tasas de crecimiento, flagelos y reacciones ácido/alcalinas en medio manitol levadura.

**Grupo I:** de crecimiento rápido, productoras de ácido, con dos a seis flagelos, las colonias miden de 2-4 mm., a los 3-5 días de incubación en agar manitol levadura, y son aislados de leguminosas de regiones templadas. A este grupo

pertenecen *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *R. trifolii*, *R. meliloti* (Casa, 2014).

**Grupo II:** de crecimiento lento, productores de bases, con flagelos. Las colonias miden 1 mm, a los 5-7 días de incubación en agar manitol levadura, y son aislados de leguminosas tropicales. Aquí se encuentra *R. japonicum* y *R. lupini* (Casa, 2014).

### **2.3.3. Proceso de nodulación de *Rhizobium***

El proceso de simbiosis de rizobios - leguminosas, infección y formación de los nódulos inicia con el reconocimiento de la combinación adecuada de organismos. Las raíces de la planta secretan ciertos compuestos (pueden ser derivados del ácido araquidónico o flavonoides) que sirven de señal y como mediadores de la especificidad de las leguminosas para atraer las bacterias (Rocha *et al.*, 2006). En respuesta a estos compuestos los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación, conocidos como genes NOD que producen los factores NOD (glucosaminas con un ácido araquidónico en la parte no reductora del azúcar). A su vez, los factores NOD inducen la deformación del pelo radical en la mayoría de leguminosas y dirigen todas las etapas de la nodulación (Hirsch, 2001; Thompson, 2003; Castillo *et al.*, 2005; Casa, 2014).

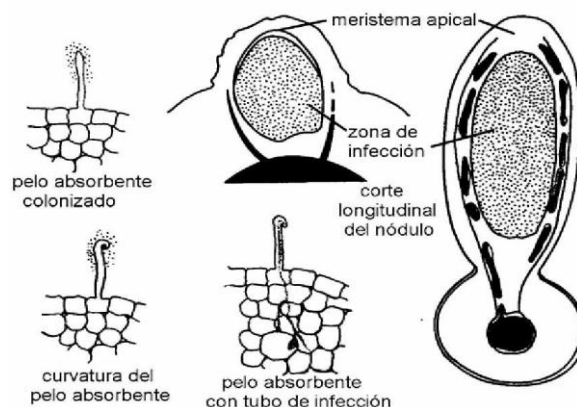
La siguiente etapa en la formación del nódulo es la generación del hilo de infección. Aquí, los compuestos conocidos como lecitinas cumplen la función de adherencia entre la bacteria y la planta. Entonces la bacteria penetra en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal o hilo de infección (Casa, 2014).

A continuación se produce la formación de vesículas que es inducida por los factores NOD de *Rhizobium* y por fitohormonas como la auxina que funcionan como mensajeros para sensibilizar las células vegetales. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales

por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por la membrana derivada de la planta hospedera y que se llama de membrana peribacteroidal (MPB) (Casa, 2014).

Luego ocurre una serie de divisiones hasta obtener los bacteroides que son vesículas de la MPB proporcionada por la planta hospedera que encubren las bacterias. Estos bacteroides pueden llegar a ser hasta cuarenta veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Los bacteroides inician el proceso de fijación de nitrógeno (Strugaard, 2000 y Walker, 1975).

La forma externa de los nódulos es determinada principalmente por la planta hospedera, puede ser esférico, cilíndrico o circular. Los nódulos activos son de mayor tamaño y presentan una coloración rojiza, que se atribuye a la presencia de la proteína leg-hemoglobina. Actualmente se conoce que el grupo hemo proviene de los bacteroides y la globina de la planta, su principal función consiste en facilitar la difusión del oxígeno dentro del nódulo como transportador de electrones dentro de la fijación de nitrógeno (Walker, 1975 y Lloret, 2005).



**Figura 1.** Formación de un nódulo indeterminado en la leguminosa (Lloret, 2005)

#### 2.3.4. Tipos de nódulos

Se han descrito dos tipos de nódulos en las leguminosas, nódulos determinados e indeterminados, que se forman dependiendo de la planta

hospedadora, los cuales se diferencian por su morfología, estructura, desarrollo del cordón de infección, presencia o no de meristemo apical y por el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan. Los nódulos indeterminados se caracterizan por tener un meristemo persistente, se originan a partir de primordios establecidos en el córtex interno y son alargados, mientras que los determinados se inician en el córtex externo y son esféricos (Tipán, 2014; Loreto, 2007).

#### **2.4. Simbiosis *Rhizobium* - leguminosa**

La asociación mutualista de rizobios y leguminosas ha sido desde siempre la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos participantes son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz. Los nódulos son órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular por parte de los rizobios y de las plantas (Gibson *et al.*, 2008).

En general se ha estimado que la simbiosis leguminosa – *Rhizobium* tiene un potencial de fijación entre 52-320 kg N ha<sup>-1</sup> dependiendo de la planta y de las condiciones ambientales (Pérez *et al.*, 2011)

#### **2.5. Especificidad y eficacia de las cepas de rizobios**

Algunas leguminosas son infectadas por diferentes géneros de rizobios y otras especies vegetales son altamente restringidas y aceptan pocas cepas de estos simbioses (Graham, 2008). La composición de los exudados radicales y la estructura de los factores NOD confieren especificidad al hospedero hacia la interacción simbiótica (Vidal, 2012).

Dado que los rizobios nativos están distribuidos en el perfil del suelo por donde crecerá la raíz del hospedero, tendrán más posibilidad de inducir mayor número de nódulos que las cepas introducidas (Pérez *et al.*, 2011).

Para que ocurra una eficiente fijación simbióticamente del nitrógeno atmosférico (FSN), las raíces deben interactuar en el suelo con cepas compatibles de *Rhizobium*, por lo que factores que afecten el crecimiento de las raíces o la actividad de la planta hospedera, como es la acidez del suelo, deben afectar la nodulación, y por tanto, la FSN (García, 2007).

La formulación de inoculantes a partir de cepas de *Rhizobium* sp., es una tecnología que puede lograr una alta productividad con la reducción o la exclusión total de fertilizantes nitrogenados. Varios estudios han demostrado que la inoculación de cepas seleccionadas de rizobios puede dar lugar a rendimientos iguales o superiores cuando se compara con la adición de fertilizantes nitrogenados (Rivera, 2012). Para poder estudiar las interacciones entre fréjol y *Rhizobium*, se debe determinar las cepas y especies más efectivas en regiones específicas de producción y luego hacer recomendaciones de inoculación eficientes (Cerrato, 2014).

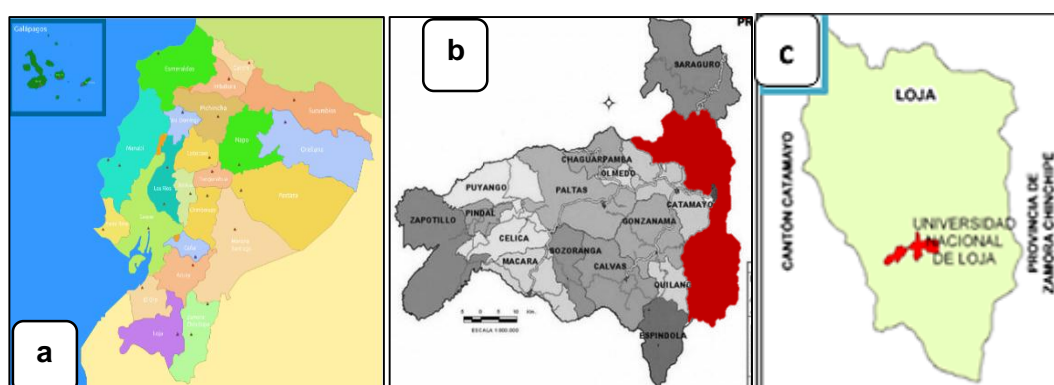
Según estudio de Campoverde y Paccha (2013) de un total de 45 aislados iniciales procedentes de nódulos de frijol común, 24 correspondieron a bacterias diazotróficas que corresponden con características morfológicas y bioquímicas al género *Rhizobium*, lo que demuestra la diversidad de estas bacterias en las diferentes condiciones agroclimáticas muestreadas en la provincia de Loja, estos resultados iniciales brindan una valiosa herramienta para el desarrollo de investigaciones de las comunidades microbianas en Ecuador.

Ochoa y Ruilova (2014), utilizaron como tratamientos cepas bacterianas eficientes (*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium leguminosarum*), demostrando el efecto beneficioso de la inoculación con las cepas *R. etli* bv. *mimosae* y *R. leguminosarum* respecto al número de nódulos totales y el peso seco de los nódulos con diferencias significativas entre los tratamientos, así como en la biomasa para genotipos de fréjol rojo y negro.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases: la primera fase en condiciones de campo en el sector de Los Molinos, de la Estación Experimental “La Argelia”, donde se evaluó el efecto benéfico de la inoculación de los aislados de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, morfológicos y de rendimiento agrícola en tres variedades de frejol común y la segunda fase de laboratorio en el Centro de Biotecnología de la Dirección de Investigaciones y Laboratorio de Análisis Físico - Químico de Suelos, Aguas y Bromatología, pertenecientes a la Universidad Nacional de Loja, donde se realizó el análisis físico-químico y microbiológico (Unidades formadoras de colonias de bacterias, hongos y actinomicetos) de muestras de suelo del área de experimentación antes y después de la inoculación.



**Figura 2.** Mapa de ubicación del área de estudio. a) República del Ecuador. b) Provincia de Loja. c) Universidad Nacional de Loja.

Las Quintas Experimentales “La Argelia” se encuentra en las coordenadas: 04°02'23.9" Latitud Sur, 79°11'59.5" Longitud Oeste y 2 138 msnm de Altitud.

El Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja se encuentra en las coordenadas: 03°23'35" Latitud Sur, 79°11'55" Longitud Oeste y 2 138 msnm de Altitud.

Según la clasificación de Holdridge, la zona de vida es Bosque seco Montano Bajo (Bs-MB), con una temperatura anual promedio de 15,62 °C, precipitación de 812,6 mm año<sup>-1</sup>, humedad relativa de 71,96 %; evaporación media de

111,33 mm y una velocidad máxima del viento de 5,44 m s<sup>-1</sup> y mínima de 3,64 m s<sup>-1</sup>. Se ubica en el área de clima templado andino.

## **3.2. MATERIALES.**

### **3.2.1. Material experimental.**

Semilla de fréjol 1 kg por cada variedad: rojo percal, blanco belén y mantequilla y cepas de *Rhizobium*: CIAT 899 (cepa tipo), *Rhizobium miluonense*-Gonzanamá, *Rhizobium tropici*-Catamayo y *Rhizobium lusitanum*-Saraguro.

### **3.2.2. Equipos de laboratorio.**

Incubadora zaranda, destilador de agua, agitador calentador, autoclave, cámara de flujo laminar, estufa, calentador de agua, balanza analítica, microscopio biológico óptico, refrigeradora 4°C, contador de colonia Pol-eko, centrifuga, vortex.

### **3.2.3. Materiales de laboratorio.**

Cajas de petri, micropipetas (1000 ul), Puntas de micropipetas (1000 ul), Papel lumínico, elenmeyer, matraces.

### **3.2.4. Reactivos de laboratorio.**

Cloruro de hidrógeno, Agar-Agar, agar nutriente, manitol, agar triptona soya, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, peptona, glucosa anhidra, leche descremada, extracto de levadura.

### **3.2.5. Materiales de campo.**

100 Estacas, Lampas, machetes, barretón, baldes plásticos, fundas plásticas, fundas de papel, turba

### **3.2.6. Materiales de oficina.**

Libreta de apuntes, calculadora, computadora, paquete estadístico Statgraphics Centurion para Windows y esferográficos.

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Metodología para el primer objetivo

**“Evaluar el efecto de la inoculación de *Rhizobium* sobre parámetros de nodulación, morfológicos y biomasa en tres variedades de fréjol común bajo condiciones de campo”**

Para determinar el efecto de la inoculación de los aislados diazotróficos del género *Rhizobium*, se realizó el experimento en condiciones de campo empleando tres variedades de fréjol común (rojo percal, blanco belén y mantequilla). Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar con cuatro réplicas por tratamiento. Cada parcela tuvo un área de 16 m<sup>2</sup>, dejando 1 m entre parcelas y 2 m entre las variedades, la distancia entre planta fue de 0,30 m (Figura 4). Las cepas utilizadas en los tratamientos y su procedencia se detallan en la Tabla 1, así como un tratamiento con fertilización química (urea) y un tratamiento sin la aplicación de fertilizante mineral y sin inoculación con bacterias de *Rhizobium*.

**Tabla 2.** Cepas de *Rhizobium* utilizadas en el experimento de campo.

NRO.	Especie	Sitios de aislamiento
1	<i>Rhizobium miluonense</i>	Gonzanamá
2	<i>Rhizobium tropici</i>	Catamayo
3	<i>Rhizobium lusitanum</i>	Saraguro
4	<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899

##### 3.3.1.1. Preparación del Inóculo y peletización de semillas de fréjol común

Para la realización del inóculo todas los aislados de *Rhizobium* se sembraron en medio líquido (ELM) Extracto de Levadura-Manitol (Manitol 10 g; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g; NaCl 0.05 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g; Extracto de levadura 0.3 g; para 1 L). Para la preparación del pre-inóculo se empleó 10 ml del medio antes referido y se ajustó al pH 7. Los tubos de ensayo se incubaron a 30 °C durante 24 h en incubadora zaranda donde se contó con títulos mínimos de 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>.



Al cabo del tiempo establecido se inoculo el cultivo de cada cepa crecida en 200 ml para así obtener el inoculo final, el cual se incubo a 30 °C durante 48 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 con el fin de obtener títulos de  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Mediante la realización de la curva de calibración dada por los valores en espectrofotometría a partir del cultivo crecido, se tomó 62,5 ml para depositar en fundas aluminadas con 250 g de turba como soporte y así conformar el bioinoculo final para la peletización en las semillas de fréjol, tanto la fundas como la turba fueron esterilizadas en rayos UV y autoclavadas respectivamente. Al cabo de una semana se cuantificó la población de bacterias viables dentro del bioinoculo mediante el método de diluciones cuantitativas, esto con el fin de asegurar la cantidad necesaria de bacterias al momento de la inoculación por peletización y posterior siembra de las semillas en el campo de experimentación (Torres-Gutiérrez, 2008).

#### **3.3.1.2. Evaluación de parámetros de nodulación**

Las evaluaciones en cuanto a la nodulación se realizaron a los 21 días después de la siembra (DDS) para cada una de las variedades. Para el efecto se tomaron 5 plantas al azar de cada una de las parcelas de los diferentes tratamientos y se colocaron en bolsas de papel identificándolas como (M1, M2, M3, M4 y M5 con su respectivo tratamiento y réplica), seguidamente las muestras fueron llevadas al laboratorio del Centro de Biotecnología para evaluar la biomasa nodular: número de nódulos totales (NN) y peso fresco de nódulos (PFN). Al final de la evaluación las muestras se colocaron en estufa por 72 horas, a temperatura de 70° C y posteriormente evaluar el peso seco de nódulos (PSN).

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

Para la evaluación de los parámetros morfológicos y biomasa se dispuso de 5 plantas al azar de cada réplica, tratamiento y variedad. La evaluación de los parámetros morfológicos se realizó a los 7 y 21 días después de la siembra

(DDS). Para el efecto se analizaron las variables altura de planta y número de hojas. Mientras que la evaluación de los parámetros de biomasa se realizó a los 30 DDS analizando las variables de peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR en gramos) y peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF en gramos).

### **3.3.2. Metodología para el segundo objetivo**

***“Determinar el efecto de los aislados de Rhizobium sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (blanco belén, mantequilla y rojo percal)”***

Para determinar los componentes del rendimiento se tomaron como muestras 5 plantas por réplica y por tratamiento, en las cuales las variables a evaluar fueron: número de granos por planta (NGP), peso de vainas por planta (PVP), número de vainas por planta (NVP) y peso de granos por planta (PGP) y para determinar el rendimiento agrícola se seleccionaron 40 plantas por réplica y por tratamiento (Torres-Gutiérrez, 2008).

### **3.3.3. Metodología para el tercer objetivo**

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

Se tomó una muestra de suelo antes y después de la investigación a una profundidad de 20 cm de cada una de las réplicas, seguidamente se mezclaron todas las muestras de la misma variedad con el fin de obtener una muestra homogénea de 500 g.

#### **3.3.3.1. Análisis físico y químico**

Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron: textura, pH, porcentaje de materia orgánica (% MO), nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre y conductividad eléctrica (CE), dichos análisis fueron realizados por parte del Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Bromatología de la Universidad Nacional de Loja.

**Cuadro 1.** Parámetros evaluados en el análisis físico y químico del suelo

Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
		%	ppm	ppm	ppm	meq 100 ml <sup>-1</sup>	meq 100 ml <sup>-1</sup>	ppm	ppm	ppm	mm hos cm <sup>-1</sup>

### 3.3.3.2. Análisis microbiológico

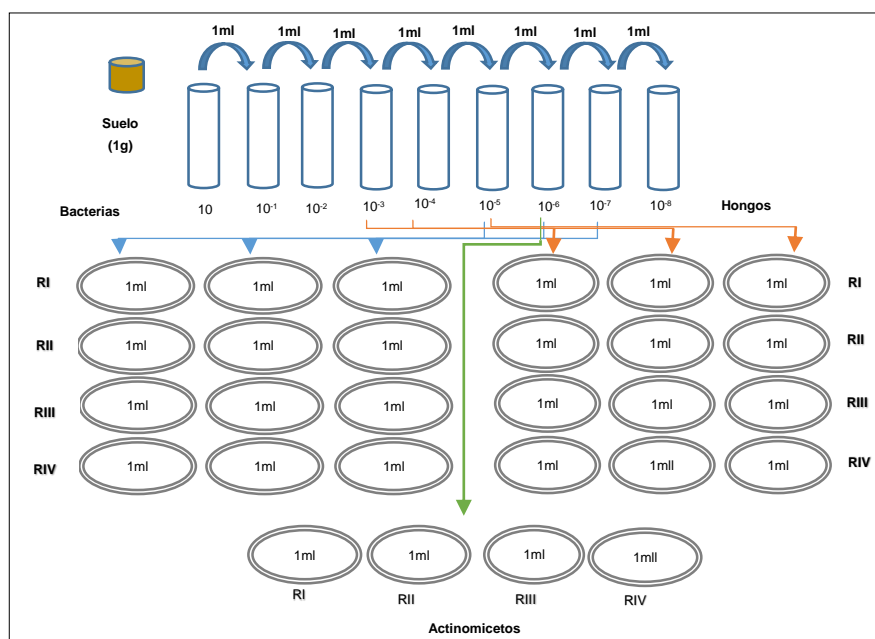
Se realizaron diluciones cuantitativas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  en condiciones estériles (cámara de flujo laminar). Para cada muestra se utilizaron tubos de ensayo estériles que contenían 9 ml de agua destilada en cada uno. Al primer tubo de ensayo se le adicionó 1 g de suelo, siendo esta la muestra inicial para las diluciones cuantitativas.

Desde el tubo que contenía la solución de suelo (dilución  $10^{-1}$ ) se transfirió 1 ml con la ayuda de una micropipeta al tubo 2 (dilución  $10^{-2}$ ), y de este modo sucesivamente se realizaron las restantes diluciones hasta  $10^{-7}$ . En cada caso se agito cada tubo y se utilizó una punta estéril. Las diluciones que se utilizaron para la determinación de bacterias fueron de:  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ; para hongos  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ; y para actinomicetos  $10^{-5}$ . Considerando como un estándar para la determinación de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC gs<sup>-1</sup>) para cada grupo microbiano (Figura 3)

Los medios de cultivos utilizados en el ensayo fueron: Agar Nutriente para el crecimiento de bacterias, Medio Sabouraud para hongos y Caseína para actinomicetos (Anexo 1).

La siembra consistió en tomar de cada dilución 1 ml, para luego ser depositados uniformemente en cajas de Petri etiquetadas con anterioridad según la dilución y posteriormente adicionando el medio correspondiente para bacterias, hongos y actinomicetos en una relación de 20 ml por caja Petri. Depositado el medio de cultivo se realizó movimientos en dirección a los 4 cuadrantes con la finalidad de conseguir un crecimiento homogéneo puntiforme de las colonias, realizando 4 réplicas por dilución, estas se incubaron a 30 °C para bacterias y actinomicetos y a 28 °C para hongos,

durante 72 horas para la cuantificación de la UFC  $gs^{-1}$  utilizando el contador de colonias Pol-Eko.



**Figura 3.** Diluciones seriadas para aislamiento de hongos, bacterias y actinomicetos. Loja, 2015.

La cuantificación de las colonias tanto para bacterias, hongos y actinomicetos se realizó mediante la siguiente fórmula (Mayea, 1998).

**UFC/gs:** Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo

$$UFC/gs = \frac{\left(\frac{\sum N^{\circ}CpC}{N^{\circ}C}\right)}{V} * \frac{1}{FD}$$

Donde:

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

$N^{\circ}C$ : Número de cajas Petri

$V$ : Volumen inoculado en la caja Petri

$FD$ : Factor de dilución

### **3.4. Análisis estadístico**

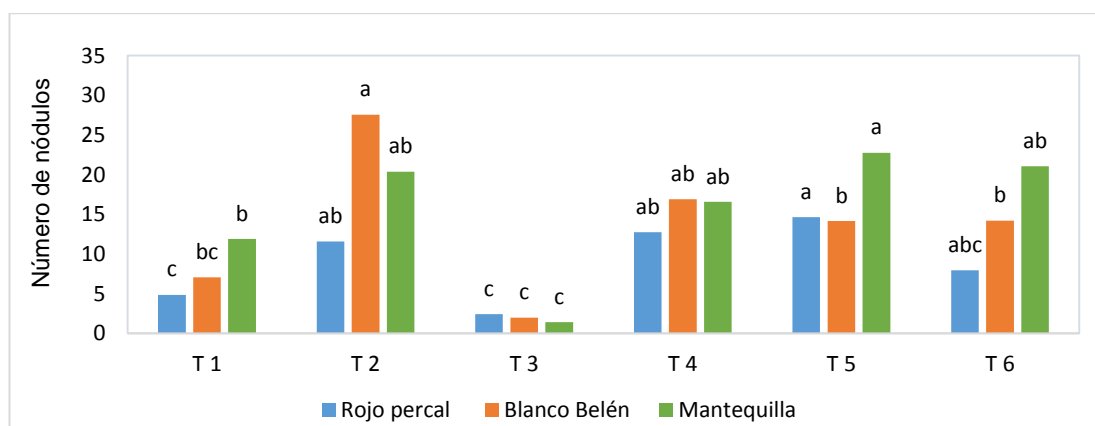
El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete STATGRAPHIC® Centurión, para el sistema operativo Windows. Estableciendo las diferencias estadísticas por cada variedad entre los tratamientos y la interacción entre factores como parámetros de nodulación, morfológicos y biomasa de las plantas se consiguió mediante un análisis de varianza simple (ANOVA Simple). Para correlacionar los parámetros de nodulación, biomasa y rendimiento por cada variedad se realizó un análisis de correlación de Pearson (Pearson Linear Correlation) teniendo niveles de significación  $p < 0.05$  en el programa STATGRAPHIC® Centurión.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Efecto de la inoculación con *Rhizobium* en nodulación, morfológicos y biomasa en tres variedades de fréjol

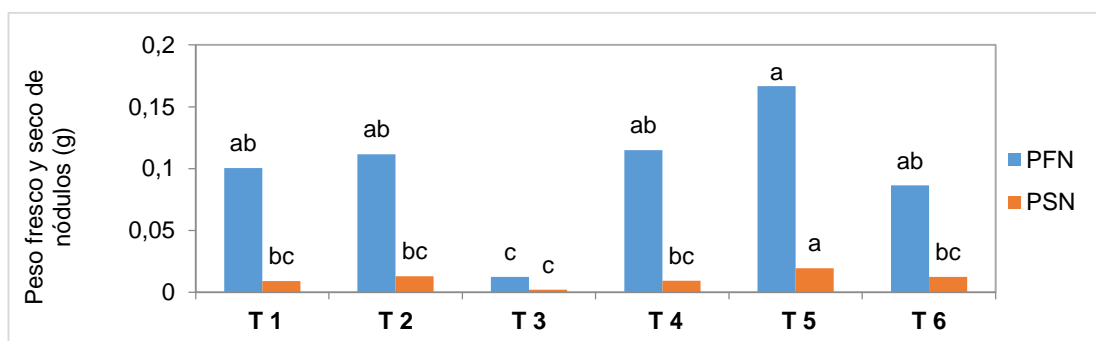
#### 4.1.1. Parámetros de Nodulación.

En la figura 4, se muestran el número de nódulos totales para las tres variedades evaluadas. Para la variedad fréjol rojo percal los mejores resultados se consiguen con la inoculación de la cepa T5 (*Rhizobium tropici* - Catamayo) con 14,65 nódulos por planta, seguido de T2 (CIAT 899) y T4 (*Rhizobium miluonense* -Gonzanamá) con valores de 11,55 y 12,75 nódulos por planta respectivamente. En la variedad blanco belén la inoculación con la cepa tipo T2 (CIAT 899) presenta los mejores resultados 27,55 nódulos por planta, seguido de T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) 16,9 nódulos/planta. Y para la variedad de fréjol mantequilla, los mejores resultados se obtienen con la inoculación de T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) con una media de 22,75 y 21,05 nódulos por planta, seguidos de T2 (CIAT) y T4 (*Rhizobium miluonense* -Gonzanamá).

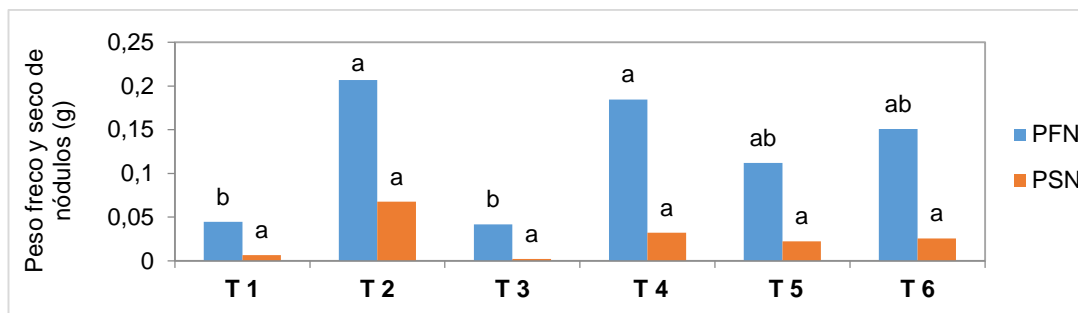


**Figura 4.** Número de nódulos para las variedades de fréjol: rojo, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6, (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

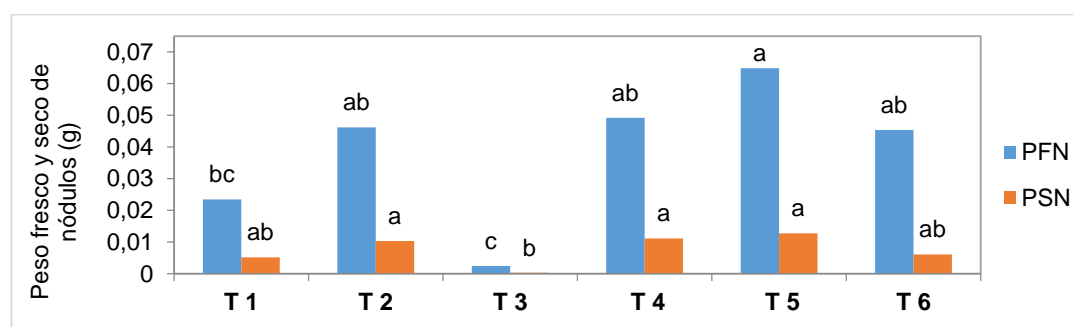
Los resultados de peso fresco de nódulos (PFN) y peso seco de nódulos (PSN) a los 30 DDS, se muestran en las figuras 5, 6 y 7. Para la variedad fréjol rojo percal los mejores resultados para ambas variables evaluadas PFN y PSN se consiguieron con la cepa T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) con valores de 0,166 y 0,019 g respectivamente, en ambos casos la cepa T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) difiere significativamente con el resto de tratamientos, en especial con T3 (Fertilización). En la variedad blanco belén, los mejores resultados para PFN y PSN se presentan con T2 (CIAT), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro), existiendo diferencias estadísticas significativas con T1 (Control) y T3 (Fertilización), siendo estos últimos tratamientos los de menores resultados con valores de 0,041 y 0,0021 g respectivamente. Finalmente para la variedad fréjol mantequilla el mejor resultado en cuanto a PFN se obtienen con la inoculación de T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) con un promedio de 0,0648 g, seguido de los tratamientos (CIAT 899), (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro), los cuales difieren estadísticamente con T3 (Fertilización) y T1 (Control) y para el PSN: vuelve a sobresalir el T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y *Rhizobium milunense*-Gonzanamá) con valores de 0,0127 y 0,0127 g respectivamente. En todos los casos el tratamiento T1 (Control) y T3 (Fertilización) presentaron los valores más bajos con 0,0052 y 0,0003 g.



**Figura 5.** Peso seco y peso fresco de nódulos de la variedad de fréjol rojo percal. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6, (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



**Figura 6.** Peso fresco y seco de nódulos de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6, (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

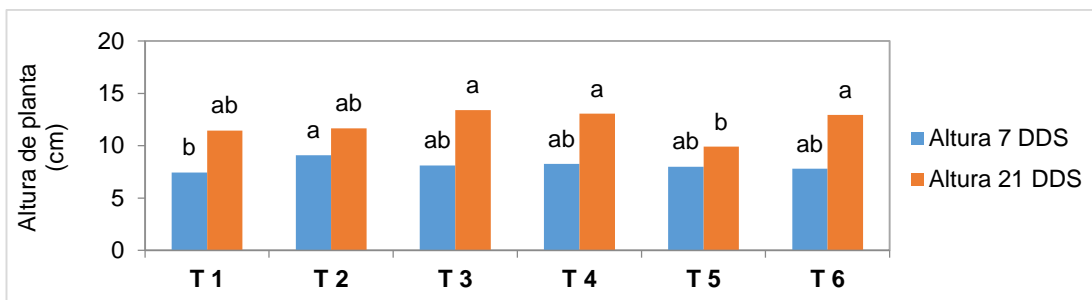


**Figura 7.** Peso fresco y seco de nódulos de la variedad mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6, (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

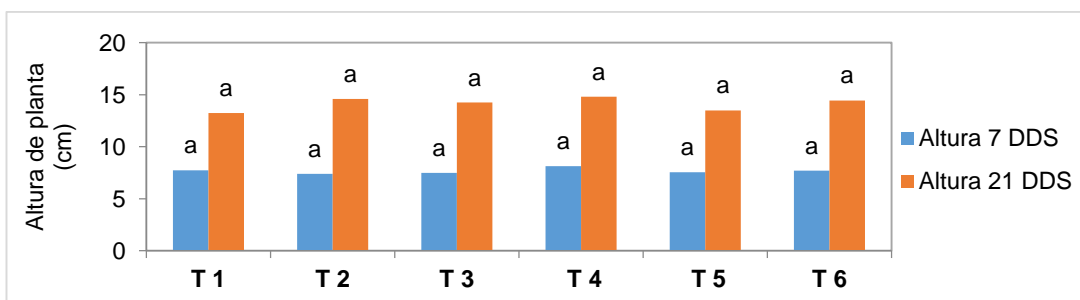
#### 4.1.2. Parámetros morfológicos

En las figuras 8, 9 y 10 se presentan los valores medios correspondientes a la variable la altura de planta de las tres variedades evaluadas. A los 7 DDS para la variedad fréjol rojo percal la inoculación con T2 (CIAT 899) influye de manera significativa en el crecimiento de la planta con valores de 9.1 cm, mientras que a los 21 DDS los mejores resultados se consiguen con T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) quienes presentan valores de 13,05, 13,4 y 12,95 cm respectivamente, mientras que, para las variedades frejol blanco y mantequilla los valores analizados a los 7 y 21 días DDS (figuras 12 y 13) no difieren estadísticamente en ningún de los tratamientos evaluados.

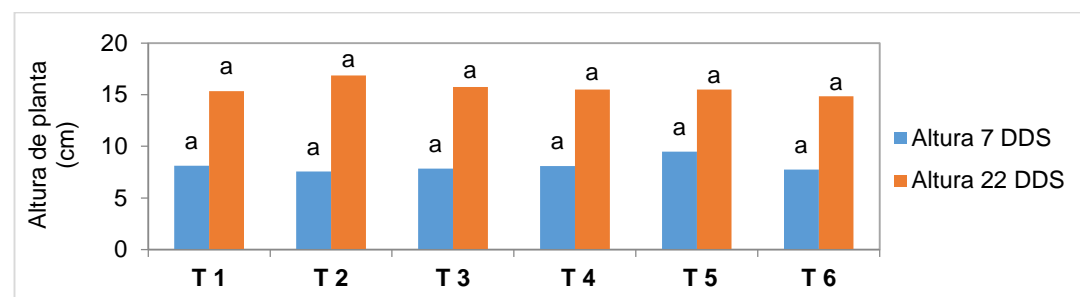




**Figura 8.** Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol rojo. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



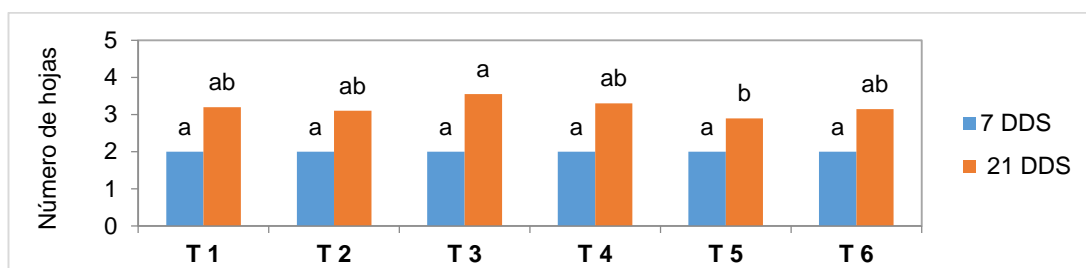
**Figura 9.** Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



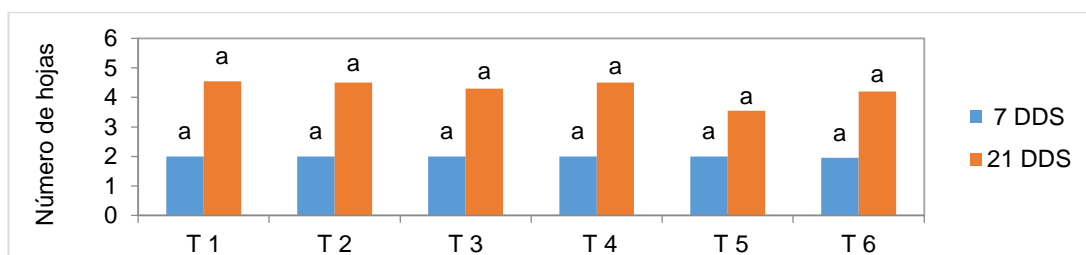
**Figura 10.** Altura a los 7 y 21 DDS de la variedad mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

En cuanto al número de hojas a los 7 y 21 días DDS, de las tres variedades fréjol rojo, blanco belén y mantequilla se presentan en las figuras (11, 12 y 13). A los 7 DDS para la variedad fréjol rojo percal no se evidencian diferencias estadísticas significativas para ningún de los tratamientos evaluados, no obstante a los 21 DDS el tratamiento T3 (Fertilización) ejerce un mayor número de hojas en las plantas con valores de 3.5, difiriendo

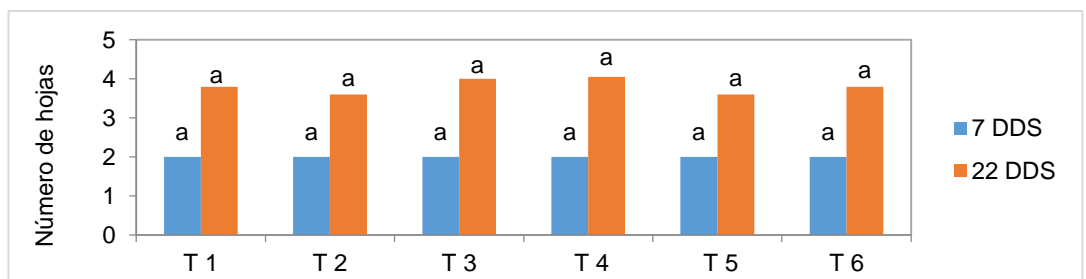
únicamente con T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) quien presenta los valores más bajos de 2.9 números hojas. A diferencia de los valores obtenidos para la variedad frejol rojo, las variedades blanco belén y mantequilla (figuras 12 y 13), el número de hojas en los diferentes tratamientos evaluados no se evidencian diferencias estadísticas significativas para esta variable evaluada.



**Figura 11.** Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol rojo percal. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



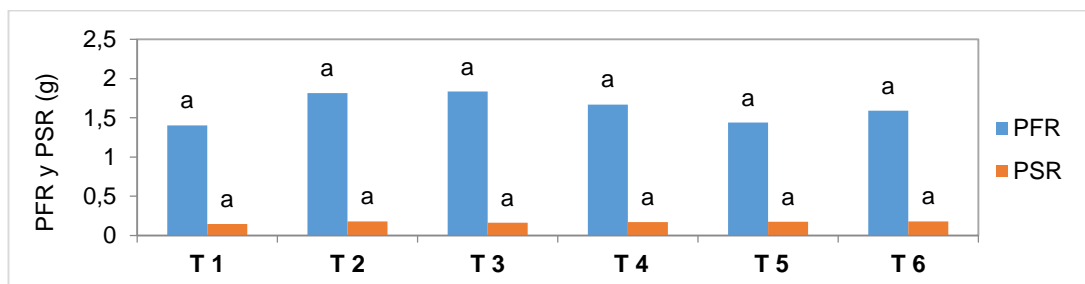
**Figura 12.** Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



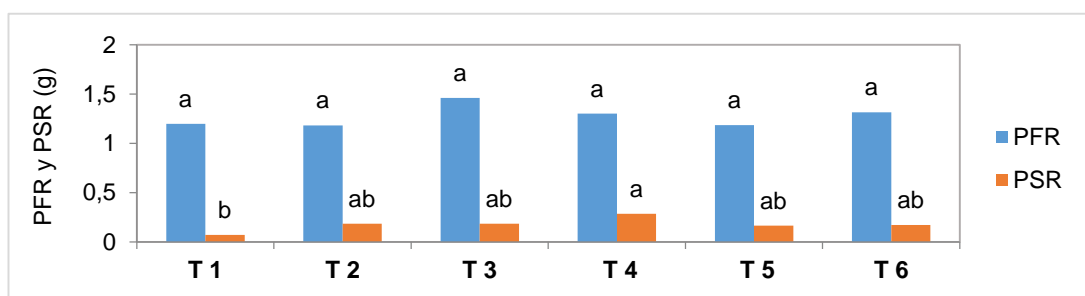
**Figura 13.** Número de hojas a los 7 y 21 DDS de la variedad mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro).

#### 4.1.3. Parámetros de biomasa de la raíz y el follaje.

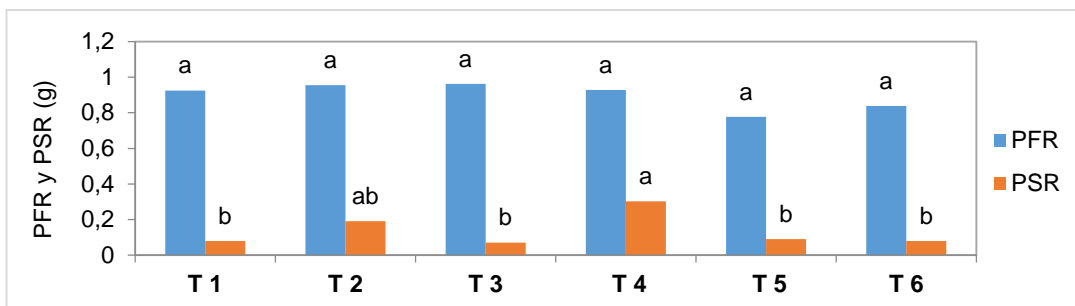
El peso fresco y seco de la raíz (PFR y PSR) de las variedades evaluadas se presenta en las figuras 14, 15 y 16. Para la variedad rojo percal los resultados no muestran diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para ambas variables evaluadas, mientras que en la variedad blanco belén en cuanto al PSR se destaca la inoculación con T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) con 0,2829 g, estableciendo una diferencia estadística significativa frente a T1 (Control) que presentó una media de 0,0685 g, y para la variedad fréjol mantequilla vuelve a sobresalir el T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) quien presenta el mayor PSR con una media de 0,302 g, seguido de T2 (CIAT 899), estableciendo con el resto de los tratamientos una diferencia estadística significativa.



**Figura 14.** Peso fresco y seco de raíz de la variedad de fréjol rojo. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

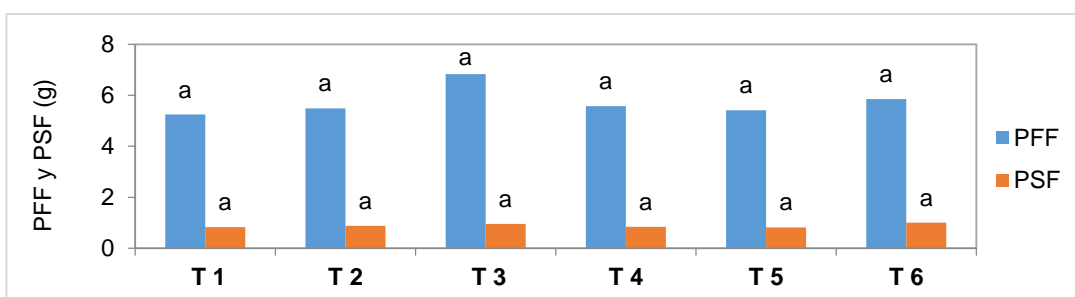


**Figura 15.** Peso fresco y seco de raíz de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

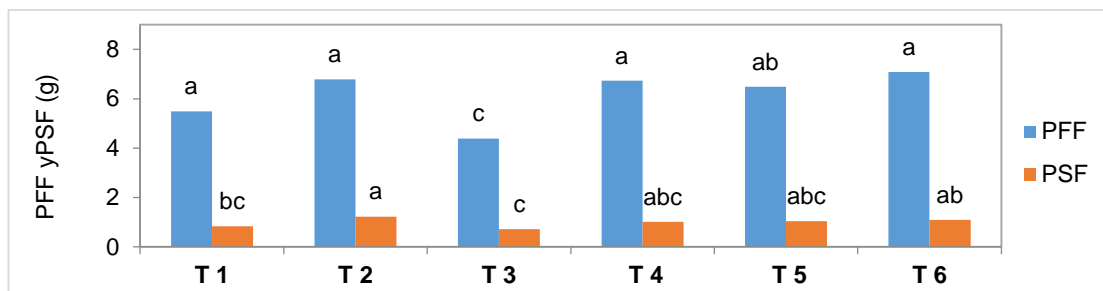


**Figura 16.** Peso fresco y seco de raíz de la variedad de fréjol mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium Tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

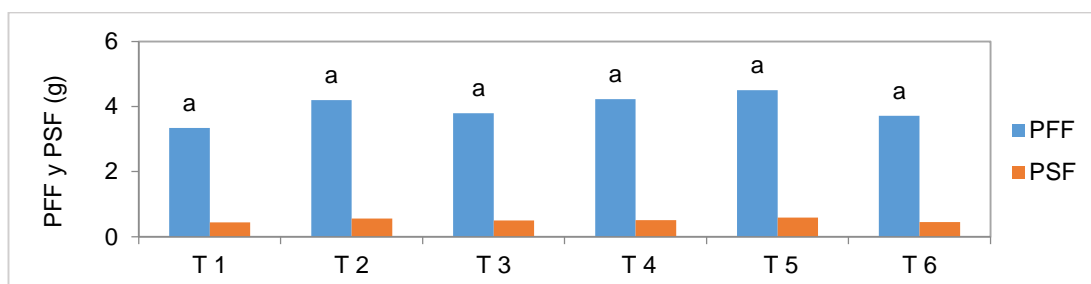
Los parámetros de peso fresco y peso seco del follaje (PFF y PSF) se muestran en las figuras 17, 18 y 19. De las tres variedades evaluadas, la única que presenta diferencia significativas con los tratamientos inoculados es la variedad fréjol blanco belén, destacándose para el PFF el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) con una media de 7,08 g, seguido de T2 (CIAT 899), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá) y con menor resultado el T3 (Fertilización) con valores de 4,38 g. Referente al PSF los mejores resultados se consiguen con la inoculación de la cepa tipo T2 (CIAT 899) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) estableciendo una diferencia significativa con T1 (Control) y T3 (*Fertilización*) con 0,83 y 0,712 g respectivamente.



**Figura 17.** Peso fresco y peso fresco de follaje de la variedad de fréjol rojo percal. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.



**Figura 18.** Peso fresco y seco del follaje de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

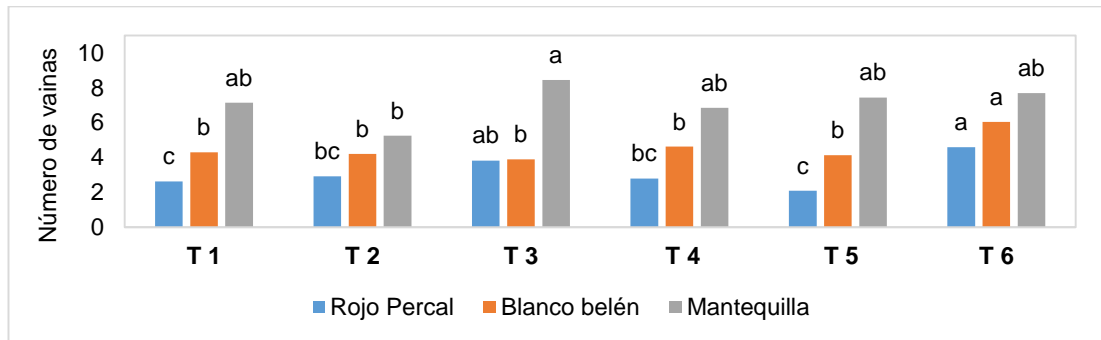


**Figura 19.** Peso fresco y seco de follaje de la variedad mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

#### 4.2. Efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (blanco belén, mantequilla y rojo percal)

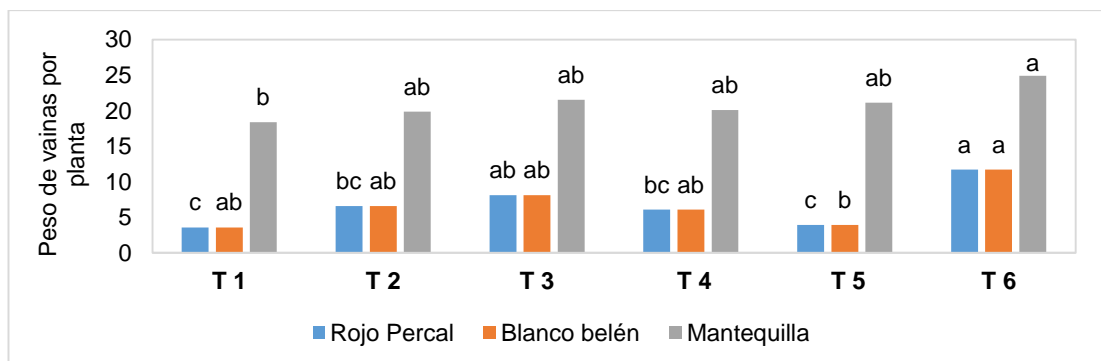
Los resultados en cuanto al número de vainas por planta se representan en las figura 20. Para la variedad fréjol rojo percal, el mejor resultado se consigue con el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) quien presenta los mejores valores de 5 vainas por planta, estableciendo diferencias significativas frente a T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T1 (Control), siendo estos últimos tratamientos los de más bajos resultados con 2 y 3 vainas por planta respectivamente. En la variedad blanco belén vuelve a sobresalir el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) con los mejores resultados de 6 vainas por planta el cual difiere estadísticamente con los demás tratamientos. Finalmente en la variedad mantequilla todos los tratamientos ejercen un efecto marcado para el numero de vainas por planta, sin embargo el T3 (Fertilización) presenta

los mejores resultados, y curiosamente la cepa tipo T2 (CIAT 899) presenta el menor número de vainas.



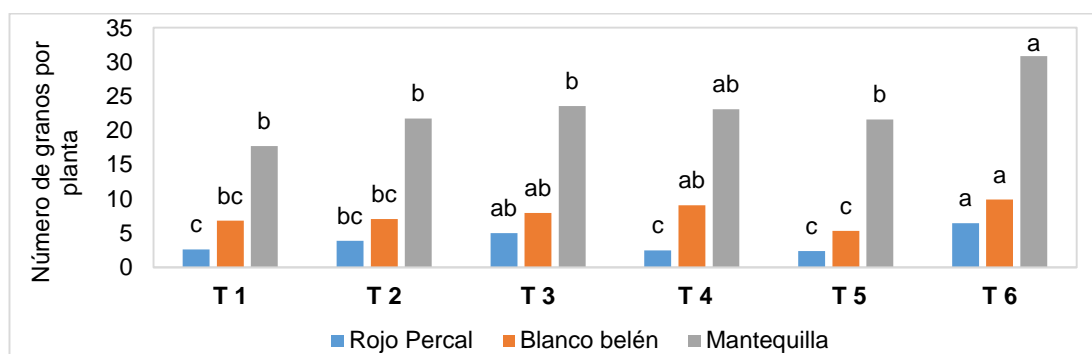
**Figura 20.** Número de vainas por planta de las variedades de fréjol: rojo, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

En cuanto al peso de vainas por planta de cada una de las variedades evaluadas se muestran en la figura 21. Curiosamente para las tres variedades los mejores resultados se presentan con la inoculación de T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) quien consigue valores de 11.69 g, para rojo percal; 9,23 g para blanco belén y 24,89 g para fréjol mantequilla, dicho tratamiento en la variedad rojo percal difiere significativamente al resto de tratamientos, en especial con el T1 (Control) y T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo). A pesar de no haber diferencias significativas entre tratamientos en las dos variedades restantes (blanco belén y mantequilla), el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) si difiere significativamente con T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T1 (Control) respectivamente.



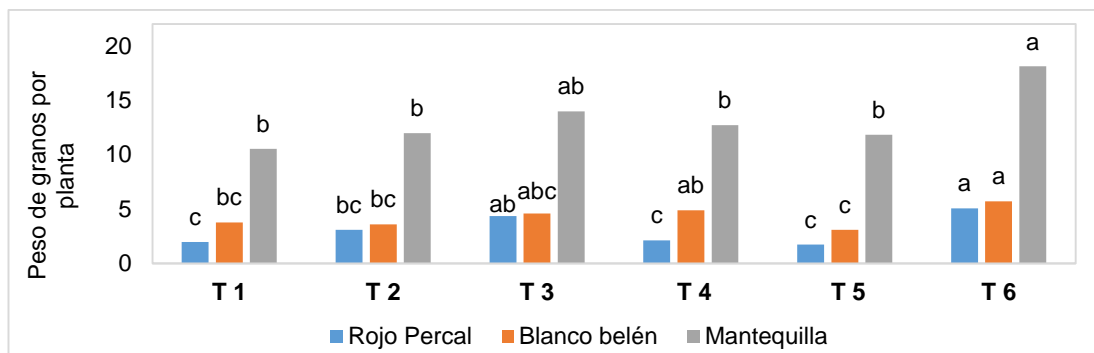
**Figura 21.** Peso de vainas por planta de la variedad de fréjol rojo percal, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

En cuanto al número de granos por planta de cada una de las variedades evaluadas se muestran en la figura 22, en la variedad rojo percal, el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) es el que muestra los mejores resultados con 6.45, seguido de T3 (Fertilización), existiendo una diferencia estadística significativa con T1 (Control), T4 (*Rhizobium milunense*-Gonzanamá) y T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) con los valores más bajos de 2.35 NGP. De la misma forma en variedad de fréjol blanco belén, el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) sobresale con el mejor resultado con valores de 9.9, seguido de T4 (*Rhizobium Milunense*- Gonzanamá) y T3 (Fertilización) estableciendo diferencia estadísticas significativas con T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo). Así mismo en se presenta los valores para variedad mantequilla siendo el tratamiento T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) el que presenta los mejores resultados de 30.85, seguido de T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá).



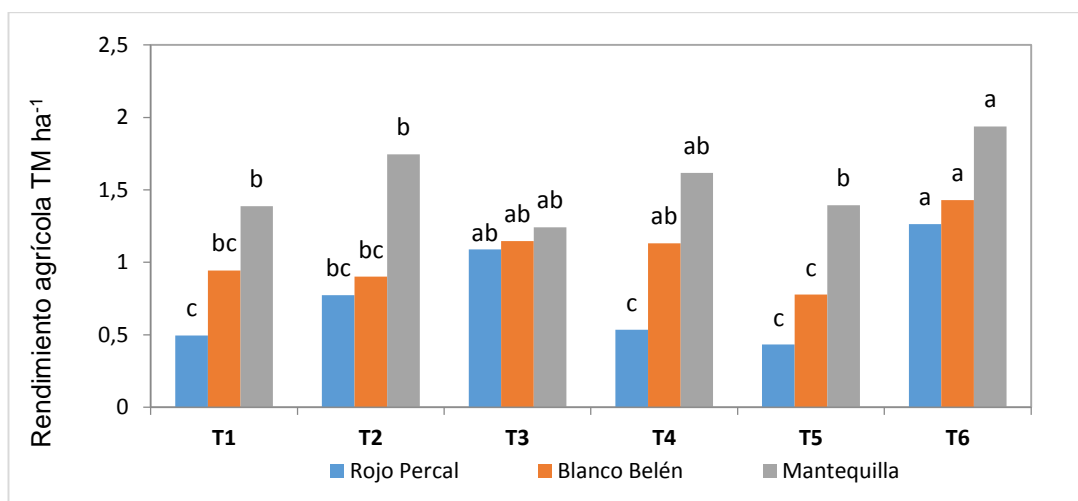
**Figura 22.** Numero de granos por planta de las variedades de fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015.

En cuanto al peso de granos por planta para cada variedad evaluada se representan en la figuras 23. Tanto para la variedad fréjol rojo percal, blanco belén y mantequilla los mejores resultados se obtienen con el T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) con valores medios de 5.05, 5.72 y 18.12 g respectivamente, seguido de T3 (Fertilización). En los tres casos el T3 y T6 difieren significativamente al resto de tratamientos en especial con T1 (Control), T2 (CIAT 899) y T5 (*Rhizobium tropici* -Catamayo). De las tres variedades evaluadas se destaca los valores obtenidos con T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro) y la variedad mantequilla los mismos significativos frente a las demás variedades evaluadas.



**Figura 23.** Peso de granos por planta de las variedades de fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015

Los valores correspondientes al rendimiento agrícola se presentan en la figura 24 para cada una de las variedades evaluadas. Para las tres variedades estudiadas los mejores resultados se obtienen con la inoculación de T6 (*Rhizobium lusitanum* - Saraguro), los incrementos son significativos para cada variedad, en especial con mantequilla, la cual obtiene valores de 1,93 TM ha<sup>-1</sup>, así como 1,10 TM ha<sup>-1</sup> con la variedad blanco belén y 1,26 TM ha<sup>-1</sup> con la variedad frejol rojo percal. En todos los casos el tratamiento Control presentó los valores más bajos en comparación con T6 y Fertilización.



**Figura 24.** Rendimiento agrícola en las variedades fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: T1 (Control), T2 (CIAT 899), T3 (Fertilización), T4 (*Rhizobium miluonense*-Gonzanamá), T5 (*Rhizobium tropici*-Catamayo) y T6 (*Rhizobium lusitanum*-Saraguro). Loja, 2015



### **4.3. Pruebas de correlación Pearson.**

En la tabla 3 se observa correlaciones significativas para la variedad frejol rojo percal, siendo las más importantes en nuestro estudio el número de nódulos totales (NN), peso seco de nódulos (PSN) y el NN con los parámetros de rendimiento (número de vainas por planta: NVP; número de granos planta: NGP y peso de granos por planta: PGP) quienes correlacionan positivamente entre sí a excepción de NN y NGP, los valores son significativos entre NN y NVP con un 42% y NN-PGP con 98%.

En la Tabla 4, para variedad blanco los valores son significativos entre NN y PSN con 97%, de igual manera entre el número de nódulos con el peso seco del follaje con 95%, y NN-número de vainas por planta con 15% y no así entre NN con los demás parámetros de rendimiento que en todos los casos son negativos.

Finalmente en la tabla 5, para la variedad mantequilla todas las correlaciones son significativas entre las variables evaluadas: Se destaca el número de nódulos (NN) con el peso seco de los nódulos con 84%, NN y peso seco del follaje con 34% y con los parámetros de rendimiento entre NN-número de vainas por planta (NVP) con 45%, NN y número de granos por planta de 22% y finalmente entre NN y peso de granos por planta de un 8%.

En las tabla 3, 4 y 5 se muestra las correlaciones estadísticas realizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson  $p < 0,05$  entre las diferentes variables evaluadas tanto para los parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje, así también componentes del rendimiento bajo condiciones de campo para las variedades de fréjol común.

**Tabla 3.** Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol rojo percal. Loja, 2015.

	NN	PFN	PFR	PFF	PSN	PSR	PSF	NVP	PVP	NGP	NGV	PGP
<b>NN</b>												
P-value*												
<b>PFN</b>	0,9579											
P-value*	0,0026											
<b>PFR</b>	0,9644	0,9459										
P-value*	0,0019	0,0043										
<b>PFF</b>	0,5760	0,5612	0,7364									
P-value*	0,2315	0,2466	0,0951									
<b>PSN</b>	0,9702	0,9440	0,9892	0,6819								
P-value*	0,0013	0,0046	0,0002	0,1357								
<b>PSR</b>	-0,5359	-0,2788	-0,4716	-0,3144	-0,5186							
P-value*	0,2731	0,5926	0,3451	0,5439	0,2918							
<b>PSF</b>	-0,6885	-0,5176	-0,6139	-0,3059	-0,7033	0,8756						
P-value*	0,1304	0,2930	0,1949	0,5555	0,1190	0,0222						
<b>NVP</b>	0,4234	0,4764	0,4317	0,3293	0,5288	-0,1874	-0,5972					
P-value*	0,4029	0,3395	0,3927	0,5239	0,2808	0,7222	0,2107					
<b>PVP</b>	0,6189	0,5437	0,5951	0,1812	0,6950	-0,6104	-0,8632	0,6489				
P-value*	0,1902	0,2648	0,2128	0,7312	0,1253	0,1981	0,0268	0,1632				
<b>NGP</b>	-0,4510	-0,2617	-0,3098	-0,0073	-0,4216	0,8207	0,9267	-0,5381	-0,7277			
P-value*	0,3694	0,6164	0,5501	0,9890	0,4051	0,0454	0,0079	0,2707	0,1011			
<b>NGV</b>	0,1809	0,4517	0,2854	0,2445	0,2611	0,6726	0,3268	0,3836	-0,0149	0,4969		
P-value*	0,7317	0,3685	0,5836	0,6406	0,6172	0,1432	0,5272	0,4528	0,9777	0,3160		
<b>PGP</b>	0,9891	0,9586	0,9861	0,6212	0,9914	-0,5160	-0,6806	0,4459	0,6668	-0,4080	0,2338	
P-value*	0,0002	0,0025	0,0003	0,1881	0,0001	0,2947	0,1367	0,3755	0,1481	0,4220	0,6557	

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

**Tabla 4.** Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol blanco belén. Loja, 2015

	<b>NN</b>	<b>PFN</b>	<b>PFR</b>	<b>PFF</b>	<b>PSN</b>	<b>PSR</b>	<b>PSF</b>	<b>NVP</b>	<b>PVP</b>	<b>NGP</b>	<b>NGV</b>	<b>PGP</b>
<b>NN</b>												
P-value*												
<b>PFN</b>	0,9269											
P-value*	0,0078											
<b>PFR</b>	-0,6061	-0,3469										
P-value*	0,2022	0,5005										
<b>PFF</b>	0,8077	0,8548	-0,5611									
P-value*	0,0519	0,0301	0,2467									
<b>PSN</b>	0,9787	0,8986	-0,4965	0,6915								
P-value*	0,0007	0,0149	0,3164	0,1281								
<b>PSR</b>	0,3436	0,6173	0,3458	0,3206	0,3529							
P-value*	0,5049	0,1916	0,5019	0,5355	0,4926							
<b>PSF</b>	0,9519	0,9084	-0,6037	0,9196	0,8968	0,2781						
P-value*	0,0034	0,0122	0,2044	0,0094	0,0154	0,5936						
<b>NVP</b>	0,1533	0,3462	0,0693	0,5984	0,0772	0,0835	0,3860					
P-value*	0,7719	0,5014	0,8961	0,2096	0,8844	0,8750	0,4498					
<b>PVP</b>	-0,1174	0,1592	0,4495	0,2582	-0,1349	0,2056	0,0347	0,8745				
P-value*	0,8247	0,7633	0,3711	0,6213	0,7989	0,6960	0,9479	0,0226				
<b>NGP</b>	-0,0242	0,2868	0,5655	0,2158	-0,0018	0,4482	0,0502	0,7326	0,9457			
P-value*	0,9638	0,5815	0,2422	0,6813	0,9973	0,3728	0,9248	0,0977	0,0043			
<b>NGV</b>	-0,1788	0,0179	0,7073	-0,3713	-0,0427	0,4346	-0,3374	-0,0271	0,4228	0,6470		
P-value*	0,7346	0,9732	0,1160	0,4686	0,9360	0,3892	0,5131	0,9593	0,4036	0,1649		
<b>PGP</b>	-0,2186	0,0702	0,6462	0,0930	-0,1934	0,2442	-0,0733	0,7864	0,9603	0,9400	0,5095	
P-value*	0,6774	0,8948	0,1656	0,8609	0,7135	0,6410	0,8902	0,0636	0,0023	0,0053	0,3019	

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

**Tabla 5.** Correlación para parámetros de nodulación, biomasa y componentes de rendimiento en fréjol mantequilla. Loja, 2015.

	<b>NN</b>	<b>PFN</b>	<b>PFR</b>	<b>PFF</b>	<b>PSN</b>	<b>PSR</b>	<b>PSF</b>	<b>NVP</b>	<b>PVP</b>	<b>NGP</b>	<b>NGV</b>	<b>PGP</b>
<b>NN</b>												
<b>PFN</b>	0,9508											
P-value*	0,0036											
<b>PFR</b>	-0,6410	-0,6802										
P-value*	0,1702	0,1370										
<b>PFF</b>	0,5084	0,6996	-0,3683									
P-value*	0,3031	0,1218	0,4725									
<b>PSN</b>	0,8490	0,9433	-0,4683	0,7607								
P-value*	0,0325	0,0047	0,3489	0,0790								
<b>PSR</b>	0,2405	0,3661	0,3290	0,4670	0,5527							
P-value*	0,6462	0,4754	0,5243	0,3504	0,2554							
<b>PSF</b>	0,3625	0,5123	-0,2475	0,9004	0,6166	0,2248						
P-value*	0,4800	0,2988	0,6363	0,0144	0,1923	0,6685						
<b>NVP</b>	0,4521	0,3004	-0,3316	0,0945	0,0332	-0,1242	-0,0623					
P-value*	0,3681	0,5630	0,5208	0,8586	0,9502	0,8147	0,9066					
<b>PVP</b>	0,2082	0,1333	-0,4663	0,0274	-0,1723	-0,3187	-0,1641	0,8872				
P-value*	0,6923	0,8012	0,3512	0,9589	0,7440	0,5381	0,7560	0,0184				
<b>NGP</b>	0,2238	0,1427	-0,3024	0,0225	-0,1307	-0,0869	-0,2318	0,9160	0,9608			
P-value*	0,6698	0,7874	0,5602	0,9662	0,8051	0,8699	0,6585	0,0103	0,0023			
<b>NGV</b>	-0,3501	-0,3798	0,0437	-0,5732	-0,5360	-0,0961	-0,8345	0,2339	0,4803	0,5447		
P-value*	0,4963	0,4577	0,9345	0,2344	0,2730	0,8563	0,0388	0,6556	0,3350	0,2638		
<b>PGP</b>	0,0898	-0,0173	-0,2424	-0,1555	-0,3015	-0,2156	-0,3750	0,8766	0,9571	0,9815	0,6391	
P-value*	0,8657	0,9741	0,6435	0,7686	0,5614	0,6816	0,4638	0,0219	0,0027	0,0005	0,1718	

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

#### 4.4. Propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación”.

##### Influencia de los aislados bacterianos en las propiedades físicas y químicas del suelo

**Cuadro 2.** Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol rojo percal, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015.

Cód. Cam.	Análisis Mecánico %			Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
	TFSA														
	Ao	Lo	Ac												
<b>Rojo 1</b>	30,6	49,8	19,6	Fo	5.30	1,26	87,95	71,82	39,18	0,54	0,54	293,41	17,27	3,42	0.157
<b>T1. Co</b>	30,6	49,8	19,6	Fo	4.95	1,24	209,79	125,14	118,70	0,59	0,50	427,45	12,53	2,89	0.772
<b>T2. CIAT</b>	32,4	49	18,6	Fo	4.86	2,64	84,30	48,73	31,00	0,73	0,53	229,51	7,02	3,79	0.572
<b>T3. Fert.</b>	30,4	50	19,6	Fo Lo	4.85	2,05	48,92	49,32	27,48	0,57	0,42	247,29	8,64	2,90	0.686
<b>T4.</b>	30,8	48,6	20,6	Fo	5.04	1,18	72,69	59,24	0,36	0,08	0,64	105,31	9,99	3,51	0.642
<b>T5.</b>	32,6	49,8	17,6	Fo	5.15	1,27	74,00	45,23	12,46	0,92	0,48	204,53	12,39	3,83	0.432
<b>T6.</b>	30,4	46	23,6	Fo	4.90	1,14	63,52	49,95	28,80	0,71	0,46	260,74	10,66	3,45	0.637

Interpretación de Análisis (Anexo 19).

**Cuadro 3.** Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol blanco belén, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015

Cód. Cam.	Análisis Mecánico %			Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
	TFSA					%	ppm	ppm	ppm	meq/ 100 ml	meq/100 ml	ppm	ppm	ppm	mmhos/cm
	Ao	Lo	Ac												
Var. Blanco 1	36,4	43	20,6	Fo	5.29	2,41	65,49	49,45	24,10	0,73	0,25	148,79	7,94	3,14	0.105
T1. Co	38,4	44	17,6	Fo	5.11	2,38	78,59	38,04	29,96	0,96	0,46	160,32	5,17	3,17	0.373
T2. CIAT	38,4	40	21,6	Fo	5.00	1,78	109,66	40,20	18,06	0,96	0,85	186,27	7,74	3,21	0.652
T3. Fert.	36,4	48	15,6	Fo	5.11	2,22	51,45	43,66	2,16	1,07	0,40	190,83	10,07	3,67	0.290
T4.	34,6	45,8	19,6	Fo	4.96	1,22	75,88	37,73	4,06	0,71	0,42	202,60	8,42	3,24	0.607
T5.	30,6	49,8	19,6	FoLo	4.92	2,01	44,99	54,89	31,60	0,78	0,43	270,83	9,24	3,86	0.656
T6.	38,4	40	21,6	Fo	5.10	1,90	60,06	38,27	20,40	0,79	0,36	188,67	6,15	3,14	0.468

Interpretación de Análisis (Anexo 20).

**Cuadro 4.** Análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol mantquilla, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015

Cód. Cam.	Análisis Mecánico %			Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
	TFSA					%	ppm	ppm	ppm	meq/ 100 ml	meq/100 ml	ppm	ppm	ppm	mmhos/cm
	Ao	Lo	Ac												
Var. Mantq 1	28,6	51,8	19,6	FoLo	6.13	2,04	181,15	47,97	9,20	2,52	1,09	187,71	10,39	4,73	0.265
T1. Co	30,4	48	21,6	Fo	5.59	1,27	46,96	41,95	24,10	1,33	0,62	201,64	7,19	3,89	0.616
T2. CIAT	34,4	48	17,6	Fo	5.22	2,36	60,06	49,36	36,24	1,48	0,75	247,29	6,27	4,42	0.830
T3. Fert.	28,8	51,6	19,6	FoLo	5.12	1,38	105,35	51,03	12,00	1,47	0,89	291,01	8,24	4,33	0.745
T4.	28,6	47,8	23,6	Fo	5.30	1,34	55,29	47,84	3,62	1,41	0,55	262,18	7,87	3,91	0.581
T5.	30,4	48	21,6	Fo	5.40	1,84	65,49	61,18	42,24	1,51	0,67	253,29	8,05	4,07	0.721
T6.	28,8	47,6	23,6	Fo	5.36	4,07	45,37	51,12	24,38	1,39	0,80	278,75	8,22	4,38	0.863

Interpretación de Análisis (Anexo 21).

Como se observa en los cuadros 3, 4 y 5 ningunos de los factores analizados tuvieron influencia significativa o cambio notorio en la textura, o propiedades químicas del suelo por acción de los aislados bacterianos en interacción con las tres leguminosas en estudio (frejol rojo, blanco belén y mantequilla).

**Influencia de los aislados bacterianos en las propiedades microbiológicas del suelo.**

Tal como se muestra en la tabla 6, los valores obtenidos en unidades formadoras de colonia al final del ensayo para los diferentes grupos microbianos estos son significativos para cada uno de ellos, es evidente el efecto positivo que ejercen los microorganismos inoculados e incrementar la carga microbiana en el área de experimentación al final del experimento, para hongos inicialmente se tiene una población microbiana de  $2,75 \times 10^5$  y al final del ensayo este se ve incrementado a  $3 \times 10^6$  UFC g suelo<sup>-1</sup>. De igual manera sucede para bacterias de  $4,25 \times 10^7$  se incrementa a  $7,48 \times 10^9$  UFC g suelo<sup>-1</sup> y finalmente para actinomicetos de  $1,1 \times 10^6$  se ve incrementado a  $8,58 \times 10^7$  UFC g suelo<sup>-1</sup>.

**Tabla 6.** Unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de las muestras de suelo en el área de experimentación. Loja, 2015.

<b>Microorganismo</b>	<b>Análisis Inicial (UCF ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Análisis Final (UFC ml<sup>-1</sup>)</b>
Hongos	$2,75 \times 10^5$	$3 \times 10^6$
Bacterias	$4,25 \times 10^7$	$7,48 \times 10^9$
Actinomicetos	$1,10 \times 10^6$	$8,58 \times 10^7$

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Efecto de los aislados sobre los parámetros de nodulación

Las cepas inoculadas fueron capaces de nodular en las raíces de fréjol rojo percal, blanco belén y mantequilla, indicando la compatibilidad en la interacción micro y macrosimbionte. Es evidente el efecto beneficio en la promoción de número de nódulos totales que ejercen las cepas procedentes de Catamayo y Gonzanamá respectivamente (*R. tropici* y *R. miluonense*) sobre las variedades rojo percal y mantequilla y no así para blanco belén, siendo esta última variedad quien presenta el mayor número de nódulos mediante la inoculación con la cepa tipo (*R. tropici*). Para las tres variedades evaluadas en interacción con las cepas inoculadas, el tratamiento control y fertilización presentaron los valores más bajos. Corroborando estos datos con Cruz, (2000) donde mencionada que las variaciones en el número de nódulos sugieren una variación en la expresión fenotípica de la respuesta a la inoculación de estos genotipos diferenciales y relacionando con lo reportado por Nunes *et al.*, (2000) donde los tratamientos no inoculados y el que recibió fertilizante de nitrógeno mostró menor número de nódulos.

Es así que la mayor cantidad de nódulos en la planta posibilita la asimilación de N<sub>2</sub> atmosférico pero la habilidad de las cepas para formar nódulos no necesariamente indica la eficiencia en la FBN. Para cada combinación leguminosa rizobios el nivel óptimo de nodulación es diferente. No obstante, los parámetros de abundancia, tamaño, distribución y coloración interna de los nódulos son importantes indicadores de su efectiva habilidad para fijar nitrógeno atmosférico (Silvester *et al.*, 1987). De esta manera, no todas las cepas de *Rhizobium* son efectivas en la fijación de nitrógeno, a pesar de que la infectividad sea alta (Mumns, 1987; Torres-Gutiérrez, 2008).

Los resultados concernientes a peso fresco y peso seco de los nódulos en la variedad de fréjol rojo percal y mantequilla no se observan grandes diferencias estadísticas entre los tratamientos, obteniéndose los mejores resultados para el peso fresco y peso seco de los nódulos donde se aplicó la cepa aislada de Catamayo (*R. tropici*) y (*R. miluonense*) aislada de Gonzanamá. Para la variedad blanco belén los valores también se comportaron muy relativos a los



analizados en el número de nódulos totales, donde la cepa tipo (*R. tropici*) difiere significativamente con el tratamiento control, el cual obtuvo el menor valor estadístico. La biomasa seca nodular en los tres genotipos evaluados demostró una correlación altamente positiva con la nodulación, demostrando una efectiva tasa de fijación de N en las variedades evaluados mediante la aplicación de las cepas de *Rhizobium*. Subia (2002) afirma que el peso seco de los nódulos permite inferir que a mayor nodulación, mayor absorción de nitrógeno, por parte de las plantas, esto lo corrobora Castellanos y Peña-Cabrales (1989) que el peso seco explica de buena manera la eficiencia de la fijación biológica, en donde, la producción de materia seca es de primordial importancia.

## **5.2. Efecto de los aislados sobre los parámetros morfológicos**

En las tres variedades de frejol analizadas no existieron diferencias significativas para la altura de la planta en los diferentes tiempos de evaluación, solo evidenciándose diferencias estadísticas a los 7 y 21 DDS para rojo percal con la cepa tipo (*R. tropici*) y Fertilización y no así para el resto de variedades. De igual forma los valores obtenidos para el número de hojas en los diferentes momentos de evaluación no presentan diferencias estadísticas significativas con ningún tratamiento y variedades estudiadas. Es evidente que ninguna variedad se vio afectada significativamente mediante la inoculación de las cepas de *Rhizobium* y fertilización respecto a las variables evaluadas, específicamente la altura de las plantas y el número de hojas, esto puede relacionarse con la predisposición de la variabilidad genotípica de cada variedad y no tanto del efecto propio de las rizobacterias (Remans *et al.*, 2007). Sin embargo, es ampliamente conocido el efecto beneficioso de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre los cultivos de leguminosas y en específico la inoculación de cepas de *Rhizobium* (Burdman *et al.*, 2000). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Granda *et al.*, (2014) donde en la variable de altura y número de hojas no mostraron diferencias entre tratamientos, por lo que la altura de plantas se mantuvo estable.

### 5.3. Parámetros de biomasa de la raíz y el follaje

Para las tres variedades estudiadas en el análisis del peso fresco y seco de la raíz no demuestran diferencias significativas entre los tratamientos, con excepción al peso seco en la variedad mantequilla ya que con la inoculación de *R. miluonense*-Gonzanamá esta se vio afectada positivamente y la cual difiere significativamente con el resto de tratamientos, en especial con el Control y Fertilización. Es importante mencionar que estos valores de PSR para la variedad mantequilla tienden a relacionarse directamente con el número de nódulos, lo cual pudo corroborarse con la correlación positiva presentada entre el NN y el PSR.

En el peso fresco y seco del follaje tanta en la variedad rojo percal y mantequilla no se evidencian diferencias significativas entre los tratamientos, no así para la variedad blanco belén donde la inoculación con las cepas *R. miluonense* y la cepa tipo *R. tropici* para ambas variables evaluadas presentan los mejores resultados, teniendo diferencias significativas con el tratamiento Fertilización quien presenta los valores más bajos. En forma general no existe variabilidad para los parámetros fisiológicos de la raíz y del follaje en las tres variedades estudiadas, solo destacando por separado la variedad mantequilla en conseguir mayor peso seco de raíz y la variedad blanco belén en mayor peso seco del follaje, mediante la aplicación para la una y otra variedad con aquellas bacterias pertenecientes a *R. miluonense*-Gonzanamá, las mismas que ejercen un efecto marcado en la promoción y desarrollo de un mayor número de nódulos, lo cual puede estar relacionado con los mecanismos directos que realizan las sustancias excretadas por estas bacterias sobre el sistema radical y de modo indirecto sobre el follaje de las plantas. Según Cruz (2014), las diferencias en los pesos secos de follaje sugieren diferencias en crecimiento y desarrollo debidas a sus características genéticas y expresiones fenotípicas bajo las condiciones del ensayo, independientes de los efectos de cepa o de la interacción cepa por genotipo.

#### **5.4. Efecto de los aislados de *Rhizobium* sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (blanco belén, mantequilla y rojo percal)**

Los resultados obtenidos de los componentes de rendimiento sin duda están estrechamente relacionados con los parámetros de nodulación y biomasa, es así es que ejercen los mejores resultados las cepas *R. tropici* y *R. milounense*, pero estas no corroboran con los valores obtenidos en los parámetros de rendimiento, sin embargo la cepa aislada de Saraguro (*R. lusitanum*) en todos los parámetros evaluados en lo concerniente a los componentes de rendimiento es la que mejores resultados presenta, lo que hace pensar que esta cepa optimizó el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico, la absorción de elementos nutritivos y por lo tanto estimuló de mejor manera el desarrollo vegetal aumentando el potencial productivo de las plantas, en especial con la interacción fréjol variedad mantequilla con quien obtiene valores significativos de rendimiento agrícola de 1.93 TM ha<sup>-1</sup>.

#### **5.5. Pruebas de correlación de Pearson**

Para la variedad rojo percal se observa correlaciones significativas, siendo las más importantes en nuestro estudio el número de nódulos totales (NN), peso seco de nódulos, y el NN con los parámetros de rendimiento quienes correlacionan positivamente entre sí a excepción de NN y NGP, los valores son significativos entre el NN y PSN con 97%, así como entre NN y NVP con un 42% y NN-PGP con 98%. De igual manera sucede para variedad blanco belén donde los valores son significativos entre NN y PSN con 97%, así como entre el número de nódulos con el peso seco del follaje con 95%, y NN-número de vainas por planta con 15%. Finalmente para la variedad mantequilla todas las correlaciones son significativas entre las variables evaluadas, se destaca el número de nódulos (NN) con el peso seco de los nódulos con 84%, NN y peso seco del follaje con 34% y con los parámetros de rendimiento entre NN-número de vainas por planta (NVP) con 45%, NN y número de granos por planta de 22% y finalmente entre NN y peso de granos por planta de un 8%. Estos valores significativos conseguidos en las tres variedades para cada variable evaluada, con énfasis en los parámetros de nodulación y biomasa nos da la pauta que al existir un mayor número de nódulos totales existirá

mayor materia nodular y por consiguiente el incremento de la fijación de N<sub>2</sub>, dando como resultado el aumento en la materia seca de la parte aérea y por ende mejores resultados en el rendimiento agrícola de las plantas, esto al corroborar la correlación positiva entre el peso seco de los nódulos y el peso seco del follaje, que sucedió en todas las variedades estudiadas en mayor o menor porcentaje, que al final afectó positivamente en el crecimiento, desarrollo y fijación de N<sub>2</sub> en las variedades antes mencionadas.

#### **5.6. Influencia de los aislados bacterianos en las propiedades microbiológicas del suelo**

El incremento de la población microbiana en suelo visto en nuestra investigación, tanto de hongos, actinomicetos y en especial de bacterias en cantidades significativas, sin duda conduce al establecimiento de consorcios microbianos beneficiosos en los procesos bioquímicos y físicos del suelo. De esta forma, se puede incrementar la disponibilidad de otros nutrientes y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, además se ha visto que los rizobios crean una barrera protectora contra hongos y bacterias patógenas en la raíz de la planta, lo que garantiza un crecimiento sano y fortalecido. Según Correa (2008) menciona que los efectos en la microbiología del suelo suprimen o controlan las poblaciones de microorganismos patógenos que se desarrollan en el suelo; incrementan la biodiversidad microbiana, lo que genera las condiciones necesarias para que los microorganismos benéficos nativos prosperen.

## VI. CONCLUSIONES

- Todas las cepas inoculadas de *Rhizobium* fueron capaces de formar nódulos en las raíces de las variedades rojo percal, blanco belén y mantequilla.
- Se evidencia el incremento del número de nódulos y peso seco de nódulos para las tres variedades evaluadas, mediante la inoculación de la cepas procedentes de Catamayo (*Rhizobium tropici*) y Gonzanamá (*Rhizobium miluonense*).
- En la variedad blanco belén todos parámetros de biomasa se vieron incrementados con la inoculación de (*Rhizobium tropici*) y (*Rhizobium miluonense-Gonzanamá*) y no así para rojo percal y mantequilla.
- La cepa *Rhizobium lusitanum* procedente de Saraguro, ejerció un efecto marcado en la variedad de fréjol mantequilla, presentando mejor resultado en rendimiento agrícola con 1.93 TM ha<sup>-1</sup> en grano seco.
- Existió un incremento significativo de la población microbiana en el área de experimentación, en especial de bacterias y actinomicetos.

## VII. RECOMENDACIONES

- Conducir ensayos en fincas de agricultores con la variedad de fréjol mantequilla e inoculando la cepa *R. miluonense-Gonzanamá*, y monitoreando características de suelo y manejo del cultivo.
- Realizar ensayos mediante inoculación mixta entre la cepa *R. Tropici-Catamayo* y *R. miluonense-Gonzanamá*, ya que estas presentaron mejores resultados en los parámetros de biomasa nodular y rendimiento agrícola respectivamente.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., Rubio, G., Alvarez, C. R., y Lavado, R. S. (2010). Fertilidad de suelos. Caracterización y manejo en la Región Pampeana. Serie didáctica. 2ª. ed.
- Andino, W. (2013). Evaluación de tres tipos de bioles en la producción de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L. var. calima), en verde. Tesis presentada en opción al título académico de Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador
- Arias, J.H., Jaramillo, M. y Rengifo, T. (2007). Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la Producción de Frijol Voluble. CORPOICA - MANA- FAO. C.I. La Selva. Medellín. Colombia. ISBN 978-92-5-305827-3
- Beebe, S. E.; Rao, I. M.; Blair, M. W. y Acosta-Gallegos, J. A. (2013). Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, vol. 4.
- Bernal, G. (2006). La fijación biológica de nitrógeno: componente clave de la fertilidad de los suelos y el rendimiento de cultivos en el Ecuador. 1 ed. Fundación GAIA/INIAP. Ecuador. pp. 145.
- Calvo, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral en Biología. España.
- Campoverde, C y Paccha, H. (2013). "Identificación y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* en genotipos de fréjol común en diferentes zonas ecológicas de la provincia de Loja". Tesis presentada en opción al título académico de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Carranza, L. (2004). Aislamiento e Identificación de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cultivado en los departamentos de Jutiapa y Chimaltenango. Tesis previa a optar al título de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Carrasquero, F., Pire, Mñ., Ricón, N y Díaz, A., (2014). Monitoreo de la remoción biológica de nitrógeno en efluentes de tenerías usando un reactor por carga secuencial. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. ISSN 1405-7743 FI-UNAM.
- Casa, B., (2014). Evaluación de La Fijación De Nitrógeno de Cepas de *Rhizobium* Spp. En Invernadero, para arveja (*Pisum sativum*), Chocho (*Lupinus mutabilis*), Fréjol (*Phaseolus vulgaris*), Haba (*Vicia faba*) y vicia (*Vicia* sp.), Pichincha. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador UCE. 208 p

- Castillo, F., Roldán, M. et al. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Editorial Zebor. 595 pag. ISBN: 978-84-7360-211-2. España.
- Cerón, L y Ancízar, F. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos (2012) *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV No. 1. 285-295
- Chanway, C. P.; Anand, R., y Yang, H. (2014). Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Prof. Takuji Ohyama (Ed.), ISBN: 978-953-51-1216-7.
- Cuesta, D. (2004). "Evaluación de la Respuesta de Fertilización en el Cultivo de Fréjol Arbustivo Variedad Iniap-418-Je.Ma a Tres Tratamientos (Químico, Orgánico y Orgánico- Químico) en la Comunidad Oyambarillo Parroquia Yaruqui Cantón Quito, Provincia De Pichincha." Tesis de grado previa la obtención del Título de Ingeniero en Administración y Producción Agropecuaria. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Espín G. (2002). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Generalidades del género *Azotobacter*. ISBN 968-36-8879-9.
- FAO. (2006). *Calendario de cultivos América Latina y el Caribe*. Estudio FAO producción y protección vegetal, 186, p.280.
- Fentahun, M.; Akhtar, M. S.; Muleta, D. y Lemessa, F. (2013). Isolation and characterization of nitrogen deficit *Rhizobium* isolates and their effect on growth of haricot bean. *African Journal of Agricultural*, vol. 8, no. 46, pp. 5942-5952. ISSN: 1991-637X.
- Ferrera, C y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, vol. 8, núm. 2, julio, 2001 Universidad Autónoma del Estado de México Toluca, México.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H y Walker, G.C. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Ann Rev Gen* 42, 413-441.
- González F; Jiménez, M y Maldonado, F. (2007). Las ilustraciones de los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno en los textos de secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 442-460.
- Granda, K. Er y Erazo, S. (2007). Microorganismos diazotróficos y su contribución a la fijación biológica del nitrógeno. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. ISSB. 1745-6150 Ecuador.
- Hernández, V., Vargas, L., Vargas, J., Muruaga, J., Hernández-Delgado S y Mayek, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. avances y perspectivas. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (2): 95 - 104, 2013
- Hirsch, A.; Koch, F y Okon, C., (2001). What makes the Rhizobia-legume symbiosis so special *Plant Physiol.* San José, US. s.e.127:1484-1492.



- INIAP. (2012). Programa nacional de leguminosas y granos andinos estación experimental Santa Catalina. Boletín Divulgativo No. 313. Quito-Ecuador.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2010). Manual Agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción. Publicación Miscelánea No. 135 (Segunda impresión actualizada). Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. 70 p.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos - Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria (INEC- ESPAC). (2013). [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec).
- Lloret, L y Martínez E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. Rev. Latinoamericana de Microbiología. Vol. 47, No. 1-2, pp. 43 – 60. ISSN: 01874640
- López-Guerrero, M. G.; Ormeño-Orrillo, E.; Acosta, J. L.; Mendoza-Vargas, A.; Rogel, M. A.; Ramírez, M. A. y Martínez-Romero, (2012). E. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, vol. 68, no. 3, pp. 149-158. ISSN: 0147-619X.
- Loreto, N. (2007). Respuesta Fisiológica, Bioquímica y Molecular de las Leguminosas a Estreses Abióticos. Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Mora, K.; Paccha H.; Chamba, Campoverde, C y Torres, R. (2013). Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur del Ecuador. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. Vol. 2 Nro.
- Morales, P. (2010). Los Microorganismos del Suelo. Granos andinos. revista de la sociedad española.
- Michiels, J.; Dombrecht, B.; Vermeiren, N.; Xi, C.; Luyten, E. y Vanderleyden, J. (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 26, no. 3, pp. 193-205. ISSN: 1574-6941.
- Naveed, M.; Mehboob, I.; Hussain, M. B. y Zahir, Z. A. (2015). Perspectives of Rhizobial Inoculation for Sustainable Crop Production. En *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer India. pp. 209-239. ISSN: 8132220676.
- Ochoa, M y Ruilova, E. (2014). Determinación de la eficiencia de bacterias diazotróficas en genotipos de fréjol común en la hoyá de Loja. Tesis de grado previa la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

- Panday, D., Schumann, P and Subrata, K., (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.) International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61, 2632–2639.
- Pacheco., J, Pat, C., y Cabrera, R. (2002). Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos Ingeniería, vol. 6, núm. 3, pp. 73-81 Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, México.
- Peralta, E., A. Murillo, N. Mazón, C. Monar, J. Pinzón y M. Rivera. (2010). Manual Agrícola de Fréjol y otras Leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción. Publicación Miscelánea No. 135 (Segunda impresión actualizada). Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito, Ecuador. 70 p. Recuperado de
- Perdomo, C y Barbazán, M. (1990). NITRÓGENO. Facultad De Agronomía Universidad de La República. Uruguay. Recuperado de
- Pérez, A y Grisales, N. (2011)T. 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. 3(1).
- Kaur, J., Verma, M., and Lal, R. (2011). *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 1218-1225.
- Remans, R.; Ramaekers, L.; Schelkens, S.; Hernandez, G.; Garcia, A.; Reyes, J. L. y Vanderleyden, J. (2008). Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and soil*, vol. 312, no. 1-2, pp. 25-37. ISSN: 0032-079X.
- Restrepo, F. (2006). Abecedario Ecológico. La más completa guía de términos ambientales, 147 p. Bogotá.
- Ribeiro, R. A.; Ormeno-Orrillo, E.; Dall’Agnol, R. F.; Graham, P. H.; Martinez-Romero, E. y Hungria, M. (2013). Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in microbiology*. vol. 164, no. 7, pp. 740-748. ISSN: 0923-2508.
- Ríos, M., J. y Quirós D., J. (2002). El Fríjol (*Phaseolusvulgaris* L.): Cultivo, beneficio y variedades. Boletín Técnico. FENALCE. Bogotá. 193 pp.

- Rivera, D. (2012). Formulación de un prototipo de Biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. Tesis presentada como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia.
- Rocha, R. (2006). Mecanismo de Patogenicidad e Interacción Parasito Hospedero Segunda Parte. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. 245 pág.
- Salar, S., Gahlawat, P., Siwach, J., (2013). Biotechnology Prospects and Applications. India. ISBN 978-81-322-1682-7
- Samaniego, M y Sánchez, A. (2015). Estudio del efecto de la adición sostenida de nitrógeno sobre la diversidad microbiana del suelo en el bosque montano del sur de Ecuador. Trabajo de Fin de Titulación Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Simon, J. (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. FEMS Microbiology Reviews. 26 (3): 285–309.
- Somasegaran, P. And Hoben, H. (1994). Handbook for Rhizobia. Springer Laboratory. New York, US. s.e. 15 p.
- Strugaard, J. (2000). Regulators and Regulation of legume root nodule development. Plant Physiol. Michigan, US. s.e. 124 p.
- Taiz, L y Zeiger E. (2006). Fisiología Vegetal 1. Colección Ciencias Experimentales. Universitat Jaume. 552 pág.
- Trabelsi, D.; Mengoni, A.; Ammar, H. B. y Mhamdi, R. (2011). Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, vol. 77, no.1, pp. 211-222. ISSN: 1574-6941.
- Thompson J. 2003. El proceso Coevolutivo. FCE, México. 98 pág.
- Torres G., R. (2008). Phytoestimulatory effect of Rhizobium and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertaciones de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven. 21, 155 p.
- Torres, E., Quisphe D, Sánchez, A., Reyes, M., González B., Osorio, Torres A., Cedeño A y Haro, A. (2013) Caracterización de la Producción de Frijol en la Provincia De Cotopaxi Ecuador: Caso Comuna Panyatug, Ciencia y Tecnología 6(1): 23-31., ISSN 1390-4051 impreso; ISSN 1390-4043 electrónico.
- Ulloa, J.; Ramírez, J. et al. (2011). *El frijol (Phaseolus vulgaris): Su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos.* Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit.

- Velásquez, J., y P, Giraldo. (2005). Posibilidades competitivas de productos prioritarias de Antioquia frente a los acuerdos de integración y nuevos acuerdos comerciales Gobernación de Antioquia, Departamento de Planificación- Secretaría de productividad y competitividad. Informe, 92 p.
- Vidal, J. (2012). Respuesta de la Simbiosis Tripartita Rhizobium-Leguminosa-Micorriza arbuscular ante Vanadio y Níquel. Tesis Maestro en Ciencias. Texcoco, MX. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. 154 p.
- Wang, F., Tao, L., Juan, L., Hua, X., Li, Y., and Xin, W. (2011). Rhizobium vallis sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México D. F., Mexico.
- Yadegari, M. y Rahmani, H. A. (2010). Evaluation of vean (*Phaseolus vulgaris*) seeds' inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 5, no. 9, pp. 792-799. ISSN: 1991-637X.
- Zaccardelli, M.; Pentangelo, A. y Tripodi, P. (2013). Characterization of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Ecotype "Fagiolo Occhio Nero Di Oliveto Citra" Using Agronomic, Biochemical and Molecular Approaches. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 16, no. 18, pp. 901. ISSN: 1028-8880.
- Zahran, H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen fixation under Se- vere Conditions and in an Arid Climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 968-989

## IX. ANEXOS

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

### a) Agar Nutriente para Bacterias

- Agar nutriente 28 g /1000 ml

### b) Sabouraud para Hongos

Para 1000 ml de medio de cultivo:

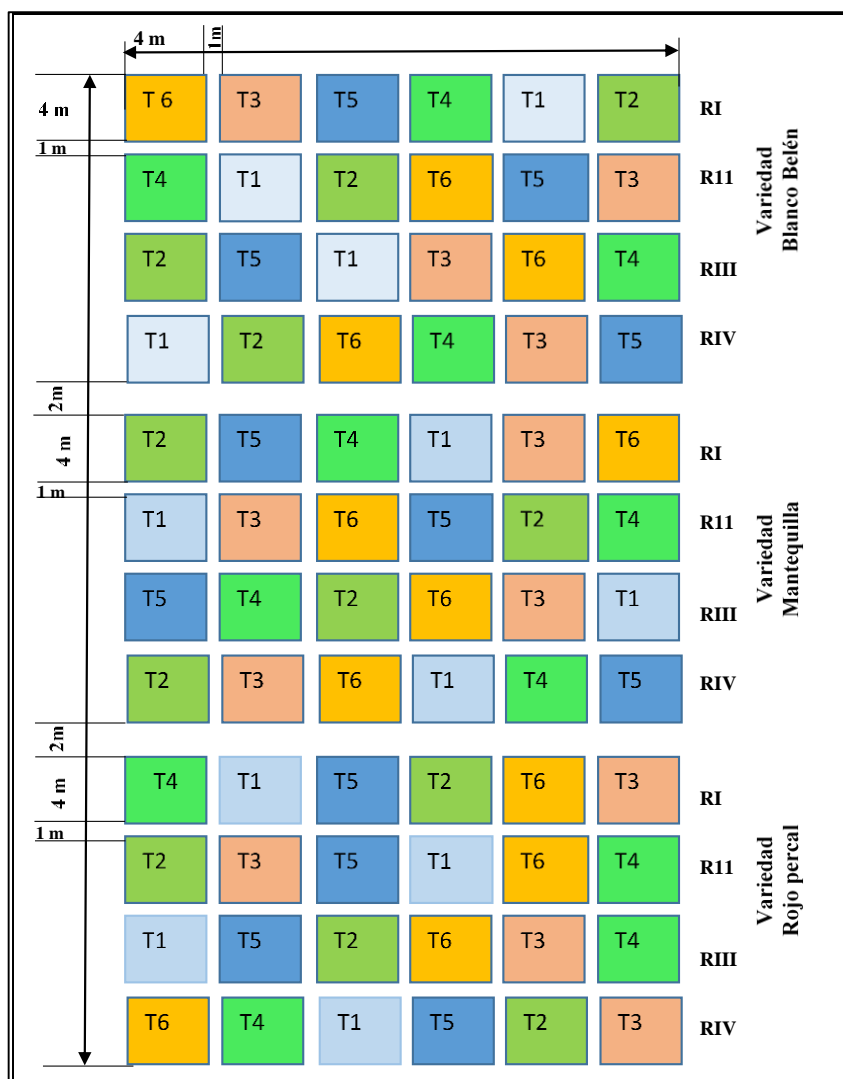
- Peptona 10
- Glucosa 40
- Agar 20
- Agua destilada 1000 ml

### c) AGAR CASEINA: Actinomicetos

Para 1000 ml de medio de cultivo

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

**Anexo 2.** Croquis del diseño experimental bloques al azar de la investigación. Loja, 2015.



- Área total del experimento: 1769 m<sup>2</sup>
- Área por variedad: 551 m<sup>2</sup>
- Área entre variedades: 2m
- Área entre parcelas: 1m
- Área por parcelas: 4x4 = 16m<sup>2</sup>

**Anexo 3.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol rojo percal.

Variedad	Tratamiento	Replica	Muestra	Altura 7 DDS	# de Hojas 7 DDS	Altura 21 DDS	# de Hojas 21 DDS
1	1	1	1	8	2	8	3
1	1	1	2	8	2	9	3
1	1	1	3	7	2	12	4
1	1	1	4	8	2	11	3
1	1	1	5	6	2	13	4
1	1	2	1	9	2	10	4
1	1	2	2	7	2	12	4
1	1	2	3	7	2	10	3
1	1	2	4	7	2	12	2
1	1	2	5	7	2	8	2
1	1	3	1	7	2	12	4
1	1	3	2	6	2	12	3
1	1	3	3	8	2	12	3
1	1	3	4	7	2	13	3
1	1	3	5	8	2	15	3
1	1	4	1	8	2	12	3
1	1	4	2	8	2	12	3
1	1	4	3	8	2	11	3
1	1	4	4	8	2	12	4
1	1	4	5	7	2	13	3
1	2	1	1	10	2	12	4
1	2	1	2	11	2	13	3
1	2	1	3	8	2	12	3
1	2	1	4	9	2	14	3
1	2	1	5	7	2	13	3
1	2	2	1	13	2	10	2
1	2	2	2	10	2	10	2
1	2	2	3	7	2	10	3
1	2	2	4	9	2	7	3
1	2	2	5	10	2	12	3
1	2	3	1	8	2	9	3
1	2	3	2	10	2	10	4
1	2	3	3	10	2	11	3
1	2	3	4	9	2	14	3
1	2	3	5	10	2	10	3
1	2	4	1	11	2	13	4
1	2	4	2	7	2	14	4
1	2	4	3	8	2	14	3
1	2	4	4	8	2	13	3
1	2	4	5	7	2	12	3
1	3	1	1	10	2	11	3
1	3	1	2	9	2	10	4
1	3	1	3	9	2	11	3
1	3	1	4	8	2	12	4
1	3	1	5	8	2	12	3
1	3	2	1	8	2	17	4
1	3	2	2	8	2	16	4
1	3	2	3	9	2	12	5
1	3	2	4	10	2	16	4
1	3	2	5	7	2	12	3
1	3	3	1	7	2	9	3
1	3	3	2	6	2	7	2
1	3	3	3	8	2	11	3
1	3	3	4	8	2	8	3
1	3	3	5	7	2	12	4
1	3	4	1	8	2	20	4
1	3	4	2	7	2	16	3
1	3	4	3	9	2	18	4
1	3	4	4	8	2	18	5
1	3	4	5	8	2	20	3
1	4	1	1	9	2	13	3
1	4	1	2	9	2	15	4
1	4	1	3	6	2	17	4

Continuación de Anexo 3

1	4	1	4	8	2	11	3
1	4	1	5	10	2	12	3
1	4	2	1	7	2	15	3
1	4	2	2	13	2	14	3
1	4	2	3	11	2	12	4
1	4	2	4	8	2	14	3
1	4	2	5	9	2	12	3
1	4	3	1	7	2	15	3
1	4	3	2	9	2	12	3
1	4	3	3	11	2	13	4
1	4	3	4	6	2	13	4
1	4	3	5	6	2	15	3
1	4	4	1	8	2	10	3
1	4	4	2	6	2	11	3
1	4	4	3	8	2	12	3
1	4	4	4	7	2	12	4
1	4	4	5	7	2	13	3
1	5	1	1	11	2	8	3
1	5	1	2	11	2	8	3
1	5	1	3	9	2	9	4
1	5	1	4	8	2	10	4
1	5	1	5	7	2	14	3
1	5	2	1	6	2	10	3
1	5	2	2	8	2	9	2
1	5	2	3	7	2	10	3
1	5	2	4	6	2	9	2
1	5	2	5	8	2	9	3
1	5	3	1	6	2	12	4
1	5	3	2	7	2	12	2
1	5	3	3	8	2	10	3
1	5	3	4	6	2	8	3
1	5	3	5	10	2	9	2
1	5	4	1	8	2	10	3
1	5	4	2	7	2	6	2
1	5	4	3	8	2	10	3
1	5	4	4	9	2	12	3
1	5	4	5	10	2	13	3
1	6	1	1	8	2	12	3
1	6	1	2	7	2	20	3
1	6	1	3	9	2	12	3
1	6	1	4	8	2	13	4
1	6	1	5	8	2	14	3
1	6	2	1	5	2	13	3
1	6	2	2	8	2	10	3
1	6	2	3	7	2	12	3
1	6	2	4	9	2	13	4
1	6	2	5	10	2	13	2
1	6	3	1	6	2	14	4
1	6	3	2	12	2	13	3
1	6	3	3	8	2	15	3
1	6	3	4	7	2	11	3
1	6	3	5	8	2	11	3
1	6	4	1	6	2	12	4
1	6	4	2	7	2	10	3
1	6	4	3	8	2	13	3
1	6	4	4	8	2	14	3
1	6	4	5	7	2	14	3



**Anexo 4.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol blanco belén.

Variedad	Tratamiento	Replica	Muestra	Altura 7 DDS	# de Hojas 7 DDS	Altura 21 DDS	# de Hojas 21 DDS
2	1	1	1	5	2	8	3
2	1	1	2	6	2	9	3
2	1	1	3	10	2	12	4
2	1	1	4	9	2	11	3
2	1	1	5	8	2	13	4
2	1	2	1	8	2	10	4
2	1	2	2	7,5	2	12	4
2	1	2	3	10	2	10	3
2	1	2	4	6	2	12	2
2	1	2	5	6	2	8	2
2	1	3	1	7	2	12	4
2	1	3	2	9	2	12	3
2	1	3	3	8	2	12	3
2	1	3	4	9	2	13	3
2	1	3	5	7	2	15	3
2	1	4	1	8	2	12	3
2	1	4	2	10	2	12	3
2	1	4	3	7	2	11	3
2	1	4	4	6,5	2	12	4
2	1	4	5	8	2	13	3
2	2	1	1	8	2	12	4
2	2	1	2	10	2	13	3
2	2	1	3	8	2	12	3
2	2	1	4	6	2	14	3
2	2	1	5	7	2	13	3
2	2	2	1	6	2	10	2
2	2	2	2	8	2	10	2
2	2	2	3	7	2	10	3
2	2	2	4	6	2	7	3
2	2	2	5	6	2	12	3
2	2	3	1	7	2	9	3
2	2	3	2	7	2	10	4
2	2	3	3	9	2	11	3
2	2	3	4	9	2	14	3
2	2	3	5	8	2	10	3
2	2	4	1	7	2	13	4
2	2	4	2	8	2	14	4
2	2	4	3	8	2	14	3
2	2	4	4	6	2	13	3
2	2	4	5	7	2	12	3
2	3	1	1	8	2	11	3
2	3	1	2	6	2	10	4
2	3	1	3	6	2	11	3
2	3	1	4	9	2	12	4
2	3	1	5	6	2	12	3
2	3	2	1	6	2	17	4
2	3	2	2	7,5	2	16	4
2	3	2	3	9	2	12	5
2	3	2	4	6	2	16	4
2	3	2	5	11	2	12	3
2	3	3	1	7	2	9	3
2	3	3	2	6	2	7	2
2	3	3	3	9	2	11	3
2	3	3	4	9	2	8	3
2	3	3	5	8	2	12	4
2	3	4	1	7	2	20	4
2	3	4	2	8	2	16	3
2	3	4	3	8	2	18	4
2	3	4	4	6	2	18	5
2	3	4	5	7	2	20	3
2	4	1	1	6	2	13	3
2	4	1	2	9	2	15	4
2	4	1	3	8	2	17	4

Continuación de Anexo 4

2	4	1	4	11	2	11	3
2	4	1	5	9	2	12	3
2	4	2	1	9	2	15	3
2	4	2	2	8,5	2	14	3
2	4	2	3	7	2	12	4
2	4	2	4	8	2	14	3
2	4	2	5	9	2	12	3
2	4	3	1	9	2	15	3
2	4	3	2	10	2	12	3
2	4	3	3	7	2	13	4
2	4	3	4	7,5	2	13	4
2	4	3	5	6	2	15	3
2	4	4	1	8	2	10	3
2	4	4	2	5	2	11	3
2	4	4	3	8	2	12	3
2	4	4	4	9	2	12	4
2	4	4	5	9	2	13	3
2	5	1	1	6	2	8	3
2	5	1	2	10	2	8	3
2	5	1	3	9	2	9	4
2	5	1	4	8	2	10	4
2	5	1	5	6	2	14	3
2	5	2	1	6	2	10	3
2	5	2	2	8	2	9	2
2	5	2	3	8	2	10	3
2	5	2	4	8	2	9	2
2	5	2	5	8	2	9	3
2	5	3	1	7	2	12	4
2	5	3	2	6	2	12	2
2	5	3	3	6	2	10	3
2	5	3	4	12	2	8	3
2	5	3	5	7	2	9	2
2	5	4	1	9	2	10	3
2	5	4	2	7	2	6	2
2	5	4	3	6	2	10	3
2	5	4	4	6	2	12	3
2	5	4	5	8	2	13	3
2	6	1	1	7	2	12	3
2	6	1	2	6	2	20	3
2	6	1	3	6	2	12	3
2	6	1	4	8	2	13	4
2	6	1	5	8	1	14	3
2	6	2	1	10	2	13	3
2	6	2	2	7	2	10	3
2	6	2	3	7	2	12	3
2	6	2	4	10	2	13	4
2	6	2	5	6	2	13	2
2	6	3	1	7	2	14	4
2	6	3	2	9	2	13	3
2	6	3	3	8	2	15	3
2	6	3	4	9	2	11	3
2	6	3	5	7	2	11	3
2	6	4	1	7	2	12	4
2	6	4	2	9	2	10	3
2	6	4	3	9	2	13	3
2	6	4	4	6	2	14	3
2	6	4	5	8	2	14	3
2	1	1	1	5	2	13	9

**Anexo 5.** Parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento en fréjol mantequilla.

Variedad	Tratamiento	Replica	Muestra	Altura 7 DDS	# de Hojas 7 DDS	Altura 21 DDS	# de Hojas 21 DDS
3	1	1	1	9	2	12	4
3	1	1	2	7	2	13	4
3	1	1	3	9	2	13	4
3	1	1	4	10	2	13	5
3	1	1	5	7	2	16	4
3	1	2	1	7	2	15	4
3	1	2	2	9	2	16	5
3	1	2	3	7	2	14	3
3	1	2	4	9	2	18	4
3	1	2	5	9,5	2	17	4
3	1	3	1	8	2	20	3
3	1	3	2	7	2	21	4
3	1	3	3	9	2	22	3
3	1	3	4	9	2	22	3
3	1	3	5	6	2	18	3
3	1	4	1	10	2	12	4
3	1	4	2	7	2	15	4
3	1	4	3	8	2	10	4
3	1	4	4	9	2	8	3
3	1	4	5	6	2	12	4
3	2	1	1	8	2	15	3
3	2	1	2	7	2	19	3
3	2	1	3	7	2	20	4
3	2	1	4	7	2	20	3
3	2	1	5	6	2	18	3
3	2	2	1	7	2	12	4
3	2	2	2	10	2	16	3
3	2	2	3	6	2	20	5
3	2	2	4	8	2	18	4
3	2	2	5	9	2	20	3
3	2	3	1	8	2	12	4
3	2	3	2	10	2	16	4
3	2	3	3	8	2	15	4
3	2	3	4	6	2	16	5
3	2	3	5	8	2	13	4
3	2	4	1	6	2	15	3
3	2	4	2	7	2	18	3
3	2	4	3	7	2	18	3
3	2	4	4	8	2	16	3
3	2	4	5	8	2	20	4
3	3	1	1	6	2	20	4
3	3	1	2	6	2	18	3
3	3	1	3	9	2	20	4
3	3	1	4	8	2	18	3
3	3	1	5	8	2	20	3
3	3	2	1	8	2	16	5
3	3	2	2	7	2	16	5
3	3	2	3	9	2	11	3
3	3	2	4	6	2	14	3
3	3	2	5	6	2	12	4
3	3	3	1	11	2	15	9
3	3	3	2	7	2	17	4
3	3	3	3	7	2	15	4
3	3	3	4	9	2	15	3
3	3	3	5	7	2	14	3
3	3	4	1	7	2	15	3
3	3	4	2	8	2	14	4
3	3	4	3	9	2	18	4
3	3	4	4	10	2	13	4
3	3	4	5	9	2	14	5
3	4	1	1	7	2	14	4
3	4	1	2	7	2	17	5

Continuación de Anexo 5

3	4	1	3	9	2	17	4
3	4	1	4	8	2	15	3
3	4	1	5	8	2	17	4
3	4	2	1	8	2	15	4
3	4	2	2	6	2	16	5
3	4	2	3	8	2	17	3
3	4	2	4	10	2	19	4
3	4	2	5	7	2	20	3
3	4	3	1	9	2	11	4
3	4	3	2	9	2	11	5
3	4	3	3	7	2	12	5
3	4	3	4	11	2	16	4
3	4	3	5	6	2	20	5
3	4	4	1	9	2	10	4
3	4	4	2	9	2	16	5
3	4	4	3	7	2	14	4
3	4	4	4	11	2	16	3
3	4	4	5	6	2	17	3
3	5	1	1	7	2	15	3
3	5	1	2	8	2	15	5
3	5	1	3	8	2	16	4
3	5	1	4	8	2	18	4
3	5	1	5	6	2	17	4
3	5	2	1	6	2	15	4
3	5	2	2	7	2	17	3
3	5	2	3	7	2	20	4
3	5	2	4	8	2	18	3
3	5	2	5	7	2	18	4
3	5	3	1	9	2	12	3
3	5	3	2	6	2	11	4
3	5	3	3	43	2	11	3
3	5	3	4	6	2	13	3
3	5	3	5	10	2	13	4
3	5	4	1	6	2	18	3
3	5	4	2	7	2	15	4
3	5	4	3	10	2	14	4
3	5	4	4	9	2	18	3
3	5	4	5	12	2	16	3
3	6	1	1	9	2	17	3
3	6	1	2	10	2	18	3
3	6	1	3	9	2	16	3
3	6	1	4	6	2	16	4
3	6	1	5	7	2	14	4
3	6	2	1	10	2	17	5
3	6	2	2	8	2	16	5
3	6	2	3	8	2	14	4
3	6	2	4	7	2	16	5
3	6	2	5	7	2	15	4
3	6	3	1	8	2	13	3
3	6	3	2	7	2	12	3
3	6	3	3	5	2	14	3
3	6	3	4	8	2	11	3
3	6	3	5	8	2	14	4
3	6	4	1	9	2	15	3
3	6	4	2	6	2	14	4
3	6	4	3	6	2	18	4
3	6	4	4	7	2	13	4
3	6	4	5	10	2	14	5

**Anexo 6.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para el genotipo fréjol rojo en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF
T1M1	5,00	0,046	1,17	4,26	3,00	0,083	1,19	6,72	6,00	0,260	1,68	8,08	8,00	0,090	1,24	6,55
T1M2	6,00	0,074	1,39	4,52	0,00	0,000	1,64	5,85	2,00	0,048	0,81	3,87	0,00	0,000	0,83	4,58
T1M3	26,00	0,286	2,19	5,02	0,00	0,000	1,03	6,79	0,00	0,692	2,84	2,81	3,00	0,029	0,82	4,89
T1M4	0,00	0,000	0,48	3,34	0,00	0,000	1,13	3,81	3,00	0,048	1,33	7,01	0,00	0,000	1,36	4,66
T1M5	11,00	0,167	1,09	4,46	0,00	0,000	1,94	4,33	11,00	0,084	1,12	7,66	13,00	0,101	2,83	5,66
T2M1	46,00	0,334	1,81	8,71	17,00	0,074	2,76	7,72	3,00	0,070	0,97	2,30	16,00	0,215	1,64	6,39
T2M2	11,00	0,131	1,93	5,69	9,00	0,086	2,04	4,54	13,00	0,156	1,84	3,60	1,00	0,002	1,58	3,84
T2M3	11,00	0,095	1,93	6,36	8,00	0,132	1,93	5,96	0,00	0,000	0,96	3,96	13,00	0,152	2,89	7,51
T2M4	14,00	0,082	2,19	7,36	5,00	0,071	1,50	2,81	4,00	0,061	2,05	6,14	18,00	0,335	2,22	4,82
T2M5	23,00	0,122	1,71	6,85	7,00	0,054	1,95	7,08	7,00	0,028	1,08	4,32	5,00	0,034	1,37	3,79
T3M1	0,00	0,000	1,18	4,49	4,00	0,009	1,76	4,90	0,00	0,000	2,73	4,73	2,00	0,004	0,92	9,42
T3M2	0,00	0,000	1,04	7,65	5,00	0,014	2,27	9,73	0,00	0,000	1,24	3,68	22,00	0,139	2,22	12,14
T3M3	0,00	0,000	2,24	4,28	0,00	0,000	1,96	8,72	4,00	0,020	2,71	5,24	1,00	0,002	2,62	6,48
T3M4	5,00	0,053	0,98	4,56	0,00	0,000	1,45	6,63	2,00	0,000	1,64	5,60	0,00	0,000	2,07	7,73
T3M5	0,00	0,000	1,58	5,74	0,00	0,000	0,74	3,71	0,00	0,000	3,15	6,67	3,00	0,007	2,19	14,53
T4M1	1,00	0,039	1,90	5,56	60,00	0,522	4,29	11,17	11,00	0,052	1,83	7,02	7,00	0,086	1,17	0,32
T4M2	0,00	0,000	0,73	6,75	11,00	0,104	2,18	3,60	3,00	0,010	2,23	5,27	0,00	0,000	1,25	4,20
T4M3	15,00	0,103	2,03	2,88	3,00	0,041	1,13	5,13	6,00	0,020	0,84	10,78	7,00	0,071	1,33	4,70
T4M4	16,00	0,071	1,57	3,39	27,00	0,334	1,51	6,12	10,00	0,046	1,34	6,92	17,00	0,169	1,97	2,89
T4M5	0,00	0,000	1,19	5,79	14,00	0,194	1,58	5,77	26,00	0,192	0,94	4,87	21,00	0,242	2,40	8,36
T5M1	28,00	0,268	0,88	5,35	9,00	0,125	1,23	4,84	13,00	0,157	2,39	3,14	11,00	0,183	1,67	4,74
T5M2	21,00	0,153	0,81	5,38	3,00	0,052	1,62	4,18	15,00	0,069	1,32	6,07	30,00	0,296	1,11	3,24
T5M3	10,00	0,131	0,73	5,36	3,00	0,056	2,36	6,15	27,00	0,363	2,40	6,32	4,00	0,150	1,04	4,95
T5M4	30,00	0,270	1,62	10,02	33,00	0,343	1,56	4,74	3,00	0,020	1,75	7,02	13,00	0,207	1,72	6,85
T5M5	13,00	0,048	0,82	6,46	8,00	0,219	1,54	4,48	15,00	0,093	1,69	5,45	4,00	0,133	0,55	3,47
T6M1	0,00	0,000	1,63	5,27	0,00	0,000	1,50	1,66	0,00	0,000	1,19	10,31	12,00	0,127	2,64	9,33
T6M2	2,00	0,065	0,96	3,04	2,00	0,004	1,62	3,92	13,00	0,084	1,65	8,88	9,00	0,103	1,33	3,93
T6M3	4,00	0,030	0,90	3,16	2,00	0,019	1,95	5,23	22,00	0,488	2,18	10,10	12,00	0,119	1,48	10,10
T6M4	20,00	0,119	2,75	5,51	1,00	0,010	1,13	3,31	0,00	0,000	0,87	4,36	43,00	0,379	2,05	5,76
T6M5	1,00	0,004	1,41	2,95	8,00	0,123	1,86	3,35	0,00	0,000	1,11	6,83	8,00	0,054	1,7221	9,9194

**Anexo 7.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para la variedad blanco belén en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0062	0,16	0,07	0,0074	0,14	1,01	0,0469	0,19	1,21	0,0094	0,13	1,00
T1M2	0,0097	0,13	0,63	0,0000	0,13	1,00	0,0095	0,09	0,75	0,0000	0,08	0,77
T1M3	0,0346	0,22	0,82	0,0000	0,14	0,89	0,0000	0,10	0,42	0,0045	0,11	0,84
T1M4	0,0000	0,10	0,55	0,0000	0,13	0,64	0,0056	0,18	1,28	0,0000	0,18	0,92
T1M5	0,0273	0,19	1,30	0,0000	0,16	0,83	0,0127	0,12	1,17	0,0082	0,21	0,58
T2M1	0,0457	0,16	1,09	0,0063	0,29	0,98	0,0074	0,10	0,48	0,0287	0,17	0,81
T2M2	0,0128	0,20	0,85	0,0098	0,20	0,68	0,0165	0,16	0,71	0,0000	0,21	1,05
T2M3	0,0120	0,18	0,84	0,0118	0,19	0,78	0,0000	0,12	0,71	0,0215	0,29	1,11
T2M4	0,0073	0,22	1,21	0,0056	0,11	0,29	0,0010	0,19	0,93	0,0446	0,25	1,18
T2M5	0,0120	0,16	1,36	0,0071	0,22	1,00	0,0022	0,09	0,50	0,0037	0,05	0,92
T3M1	0,0000	0,11	0,52	0,0010	0,12	0,60	0,0000	0,24	0,74	0,0003	0,12	1,01
T3M2	0,0000	0,14	1,23	0,0000	0,17	1,11	0,0000	0,13	0,77	0,0173	0,20	1,50
T3M3	0,0000	0,17	0,55	0,0000	0,18	0,98	0,0025	0,22	0,90	0,0002	0,20	0,74
T3M4	0,0000	0,13	0,85	0,0000	0,12	0,77	0,0000	0,12	0,86	0,0000	0,14	1,01
T3M5	0,0099	0,16	1,13	0,0000	0,06	0,61	0,0000	0,23	1,11	0,0000	0,25	2,08
T4M1	0,0027	0,18	0,48	0,0518	0,49	1,19	0,0090	0,15	0,90	0,0000	0,15	0,79
T4M2	0,0000	0,11	0,48	0,0144	0,19	0,62	0,0006	0,17	0,58	0,0000	0,16	1,31
T4M3	0,0020	0,14	0,41	0,0037	0,13	0,79	0,0033	0,09	1,35	0,0000	0,15	0,74
T4M4	0,0106	0,15	0,81	0,0265	0,16	1,07	0,0059	0,13	1,25	0,0000	0,19	0,62
T4M5	0,0027	0,17	1,09	0,0277	0,17	1,21	0,0266	0,10	0,00	0,0000	0,25	1,20
T5M1	0,0396	0,17	0,93	0,0191	0,10	0,45	0,0155	0,22	0,82	0,0234	0,14	0,36
T5M2	0,0236	0,10	0,65	0,0078	0,14	0,66	0,0098	0,16	0,93	0,0341	0,13	0,55
T5M3	0,0190	0,08	1,16	0,0085	0,25	0,57	0,0372	0,22	0,87	0,0188	0,16	0,83
T5M4	0,0439	0,22	1,25	0,0002	0,17	0,81	0,0017	0,18	1,52	0,0220	0,17	0,86
T5M5	0,0010	0,46	0,93	0,0342	0,14	0,69	0,0128	0,21	1,01	0,0139	0,05	0,49
T6M1	0,0000	0,14	1,07	0,0000	0,13	0,40	0,0000	0,15	1,57	0,0181	0,29	1,55
T6M2	0,0000	0,24	1,59	0,0081	0,16	0,34	0,0060	0,16	1,22	0,0195	0,10	0,43
T6M3	0,0050	0,06	0,47	0,0029	0,20	0,95	0,0839	0,23	1,55	0,0157	0,44	1,25
T6M4	0,0162	0,26	1,05	0,0014	0,12	0,72	0,0000	0,08	0,68	0,0469	0,18	1,03
T6M5	0,0000	0,18	1,23	0,0140	0,15	0,66	0,0000	0,12	0,99	0,0105	0,1914	1,3788

**Anexo 8.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para la variedad de fréjol blanco belén en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF	NN	PFN	PFR	PFF
T1M1	2,00	0,034	1,59	5,29	1,00	0,009	1,27	7,51	13,00	0,193	1,14	5,07	5,00	0,029	0,71	4,64
T1M2	2,00	0,015	1,79	2,84	1,00	0,007	0,42	3,22	0,00	0,000	0,85	4,71	11,00	0,017	1,07	6,18
T1M3	7,00	0,083	1,22	3,77	6,00	0,041	1,12	4,77	22,00	0,037	0,74	7,65	4,00	0,010	1,16	4,40
T1M4	1,00	0,005	1,94	7,26	12,00	0,058	1,21	3,30	0,00	0,000	0,69	3,54	3,00	0,009	1,40	4,84
T1M5	4,00	0,034	1,83	4,64	20,00	0,223	1,35	11,65	23,00	0,075	1,30	7,83	4,00	0,014	1,17	6,53
T2M1	30,00	0,130	1,11	7,96	43,00	0,407	0,93	4,31	9,00	0,063	0,62	3,98	26,00	0,186	1,14	8,43
T2M2	84,00	0,525	2,19	15,64	8,00	0,057	1,33	4,98	20,00	0,222	1,40	6,94	2,00	0,050	0,59	5,13
T2M3	24,00	0,238	1,21	7,54	12,00	0,059	0,98	9,08	29,00	0,296	1,26	4,60	9,00	0,086	0,95	6,17
T2M4	18,00	0,170	1,33	8,90	53,00	0,459	0,99	4,20	43,00	0,302	1,74	5,63	25,00	0,110	0,97	5,21
T2M5	51,00	0,363	1,49	7,25	51,00	0,303	1,26	7,83	14,00	0,113	1,54	9,33	0,00	0,000	0,59	2,52
T3M1	0,00	0,000	2,28	5,86	3,00	0,003	1,82	6,25	0,00	0,000	0,63	3,63	0,00	0,000	0,56	4,72
T3M2	6,00	0,590	2,01	4,92	0,00	0,000	1,04	3,29	0,00	0,000	1,02	1,02	0,00	0,000	1,32	4,74
T3M3	6,00	0,092	1,45	4,85	3,00	0,008	1,31	9,10	0,00	0,000	1,60	1,60	0,00	0,000	0,91	4,05
T3M4	5,00	0,063	2,66	4,77	0,00	0,000	0,87	3,53	2,00	0,001	0,79	0,79	0,00	0,000	1,78	5,00
T3M5	9,00	0,064	1,69	4,99	0,00	0,000	1,38	6,68	2,00	0,009	1,93	1,93	3,00	0,002	2,17	5,99
T4M1	27,00	0,361	1,75	9,46	9,00	0,162	1,33	5,15	15,00	0,097	1,09	7,29	3,00	0,021	1,27	6,19
T4M2	43,00	0,249	1,15	9,09	5,00	0,079	1,03	8,14	10,00	0,111	1,18	4,81	14,00	0,085	1,00	5,27
T4M3	10,00	0,122	1,53	4,80	10,00	0,299	0,88	6,38	15,00	0,158	1,78	5,58	26,00	0,329	1,17	6,60
T4M4	60,00	0,280	1,77	10,15	12,00	0,123	1,73	4,33	12,00	0,109	0,97	4,74	6,00	0,157	0,80	8,59
T4M5	15,00	0,087	1,91	6,90	20,00	0,164	0,94	5,01	7,00	0,102	1,33	3,13	19,00	0,595	1,40	13,06
T5M1	27,00	0,093	1,32	5,63	13,00	0,123	1,18	3,92	7,00	0,075	1,07	6,15	20,00	0,275	0,48	5,67
T5M2	6,00	0,093	1,32	13,51	6,00	0,045	1,37	3,54	10,00	0,102	1,58	7,92	13,00	0,218	1,39	9,29
T5M3	13,00	0,031	1,37	7,59	37,00	0,116	1,48	4,38	3,00	0,033	1,68	10,64	5,00	0,073	0,72	4,48
T5M4	20,00	0,125	0,96	2,80	18,00	0,076	0,93	4,87	31,00	0,248	1,12	6,62	14,00	0,119	1,04	8,50
T5M5	7,00	0,017	1,04	4,24	8,00	0,060	0,69	4,84	11,00	0,116	1,93	6,09	14,00	0,202	0,98	8,92
T6M1	17,00	0,188	1,25	7,34	18,00	0,160	1,69	9,74	6,00	0,107	0,60	6,89	2,00	0,026	0,88	5,23
T6M2	26,00	0,205	1,26	5,61	20,00	0,692	2,13	12,20	5,00	0,062	1,10	5,42	22,00	0,114	1,75	9,60
T6M3	5,00	0,034	1,38	6,35	35,00	0,310	1,45	9,05	7,00	0,049	1,21	4,70	20,00	0,092	1,05	5,79
T6M4	17,00	0,142	1,14	5,64	9,00	0,093	1,37	3,30	12,00	0,256	2,37	6,77	10,00	0,035	0,68	8,42
T6M5	18,00	0,115	1,32	6,33	20,00	0,223	1,43	10,72	9,00	0,105	0,96	5,55	6,00	0,010	1,24	7,05

**Anexo 9.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para la variedad blanco belén en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0078	0,08	0,69	0,0020	0,22	1,39	0,0306	0,03	1,10	0,0035	0,00	0,80
T1M2	0,0000	0,12	0,93	0,0018	0,07	0,53	0,0000	0,00	0,76	0,0031	0,00	0,39
T1M3	0,0009	0,10	0,56	0,0045	0,11	0,72	0,0056	0,01	1,24	0,0115	0,01	0,69
T1M4	0,0000	0,16	0,67	0,0080	0,10	0,54	0,0000	0,00	0,49	0,0031	0,00	1,08
T1M5	0,0000	0,14	1,02	0,0344	0,21	0,92	0,0073	0,01	1,20	0,0077	0,01	0,95
T2M1	0,0544	0,20	0,83	0,0211	0,20	1,32	0,0105	0,12	0,92	0,0267	0,15	1,43
T2M2	0,0095	0,18	1,21	0,7950	0,43	2,55	0,0277	0,16	1,99	0,0025	0,07	0,72
T2M3	0,0105	0,12	1,44	0,0364	0,21	1,22	0,0502	0,15	0,66	0,0087	0,12	1,17
T2M4	0,0929	0,18	1,26	0,0282	0,24	1,54	0,0383	0,23	1,06	0,0162	0,10	0,96
T2M5	0,0529	0,20	1,15	0,0611	0,28	1,20	0,0114	0,23	1,49	0,0000	0,08	0,42
T3M1	0,0031	0,24	0,83	0,0033	0,14	0,85	0,0000	0,05	0,40	0,0000	0,08	0,77
T3M2	0,0114	0,17	0,59	0,0000	0,08	0,37	0,0000	0,10	0,65	0,0000	0,12	0,82
T3M3	0,0026	1,12	0,64	0,0021	0,17	1,45	0,0000	0,15	0,73	0,0000	0,09	0,54
T3M4	0,0085	0,27	0,80	0,0000	0,04	0,33	0,0000	0,07	0,42	0,0000	0,16	0,74
T3M5	0,0093	0,14	0,69	0,0000	0,11	0,79	0,0021	0,17	0,95	0,0000	0,21	0,90
T4M1	0,0617	0,26	1,43	0,0267	1,44	0,71	0,0224	0,15	1,27	0,0062	0,17	1,10
T4M2	0,0393	0,15	1,30	0,0021	0,20	1,33	0,0156	0,14	0,10	0,0112	0,14	0,82
T4M3	0,0173	0,16	0,68	0,0532	0,12	0,86	0,0333	0,19	0,88	0,0613	0,16	0,91
T4M4	0,0423	0,27	1,51	0,0232	0,18	0,76	0,0203	1,12	0,82	0,0243	0,11	1,23
T4M5	0,0202	0,25	1,08	0,0260	0,11	0,65	0,0213	0,12	0,76	0,1120	0,20	2,19
T5M1	0,0161	0,16	0,78	0,0202	0,22	0,82	0,0091	0,16	0,95	0,0560	0,11	0,99
T5M2	0,0150	0,20	2,99	0,0095	0,17	0,64	0,0112	0,16	1,29	0,0421	0,25	1,72
T5M3	0,0730	0,15	1,09	0,0218	0,18	0,74	0,0000	0,20	1,52	0,0134	0,11	0,64
T5M4	0,0202	0,09	0,41	0,0140	0,15	0,80	0,0300	0,15	1,08	0,0218	0,18	1,34
T5M5	0,0061	0,11	0,54	0,0030	0,11	0,02	0,0218	0,24	0,92	0,0386	0,18	1,48
T6M1	0,0364	0,22	1,47	0,0225	0,19	1,41	0,0187	0,10	1,02	0,0056	0,12	0,77
T6M2	0,0326	0,18	1,01	0,1126	0,32	1,88	0,0127	0,12	0,79	0,0193	0,24	1,44
T6M3	0,0055	0,17	0,96	0,0563	0,16	1,34	0,0109	0,13	0,80	0,0156	0,12	0,89
T6M4	0,0271	0,16	0,93	0,0172	0,12	0,52	0,0278	0,25	1,12	0,0075	0,11	1,18
T6M5	0,0221	0,20	0,97	0,0391	0,18	1,43	0,0175	0,16	0,93	0,0021	0,14	1,08



**Anexo 10.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para la variedad de fréjol mantequilla en peso fresco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES															
	I				II				III				IV			
	NN	PFN	PFR	PPF	NN	PFN	PFR	PPF	NN	PFN	PFR	PPF	NN	PFN	PFR	PPF
T1M1	20,00	0,0044	1,09	2,01	9,00	0,0119	0,27	0,83	0,00	0,0000	1,02	3,73	3,00	0,0033	1,03	3,96
T1M2	7,00	0,0138	0,56	1,82	20,00	0,0317	1,23	3,73	2,00	0,0117	0,99	4,25	9,00	0,0059	0,61	3,35
T1M3	11,00	0,0116	1,38	4,54	9,00	0,0276	1,15	2,93	5,00	0,0200	1,16	3,40	16,00	0,0182	0,80	3,09
T1M4	15,00	0,0293	0,85	4,03	21,00	0,0444	0,48	1,90	11,00	0,0409	1,21	3,04	23,00	0,0409	0,94	5,27
T1M5	22,00	0,0646	1,04	2,05	6,00	0,0118	0,68	2,37	10,00	0,0611	1,18	6,34	19,00	0,0158	0,84	4,11
T2M1	3,00	0,0148	0,62	3,43	8,00	0,0297	0,56	5,28	18,00	0,0403	0,92	1,58	4,00	0,0023	1,97	5,06
T2M2	16,00	0,0584	1,58	3,75	18,00	0,0641	0,72	3,93	22,00	0,0442	0,51	2,83	11,00	0,0349	1,65	7,77
T2M3	25,00	0,0718	0,57	3,13	27,00	0,0646	0,71	2,73	17,00	0,0222	1,55	2,42	16,00	0,1103	1,69	8,00
T2M4	14,00	0,0477	1,15	5,08	23,00	0,0278	0,36	3,82	53,00	0,0241	0,74	4,83	18,00	0,0290	1,07	4,63
T2M5	14,00	0,0089	0,55	2,13	34,00	0,0735	0,20	4,18	47,00	0,0506	1,33	4,59	19,00	0,1051	0,66	4,79
T3M1	0,00	0,0000	1,02	6,56	0,00	0,0000	0,81	2,60	0,00	0,0000	0,86	2,82	0,00	0,0000	1,19	5,06
T3M2	0,00	0,0000	0,59	4,20	0,00	0,0000	1,56	2,03	0,00	0,0000	0,52	2,91	0,00	0,0000	1,32	2,60
T3M3	3,00	0,0024	1,06	6,24	0,00	0,0000	0,67	3,11	10,00	0,0233	0,91	5,17	9,00	0,0181	0,94	2,48
T3M4	0,00	0,0000	0,66	4,58	0,00	0,0000	0,69	4,98	0,00	0,0000	0,87	2,51	0,00	0,0000	1,09	3,60
T3M5	0,00	0,0000	0,53	4,28	6,00	0,0057	1,02	1,65	0,00	0,0000	0,81	4,40	0,00	0,0000	2,12	4,03
T4M1	35,00	0,1718	0,73	5,84	27,00	0,0273	0,84	6,36	12,00	0,0127	0,69	3,03	4,00	0,0039	1,15	7,13
T4M2	50,00	0,2252	0,18	3,65	4,00	0,0031	0,92	4,61	7,00	0,0049	0,73	3,76	9,00	0,0325	0,90	3,65
T4M3	12,00	0,0069	0,97	5,31	9,00	0,0476	1,22	3,80	11,00	0,0097	0,66	2,09	4,00	0,0036	0,62	2,50
T4M4	6,00	0,0041	0,76	1,94	29,00	0,1559	1,50	4,78	22,00	0,0411	1,24	6,01	19,00	0,0506	0,71	5,98
T4M5	16,00	0,0320	1,35	3,56	30,00	0,1184	1,08	3,88	15,00	0,0200	1,54	4,25	10,00	0,0138	0,77	2,36
T5M1	32,00	0,0369	1,13	4,85	18,00	0,0337	0,32	5,53	32,00	0,0706	0,73	3,10	12,00	0,0526	0,68	2,89
T5M2	24,00	0,0350	0,62	5,14	10,00	0,0536	0,91	6,73	33,00	0,0985	1,45	4,90	27,00	0,0553	0,73	3,18
T5M3	3,00	0,0039	0,81	6,10	28,00	0,0613	0,50	5,41	24,00	0,0915	1,26	3,96	27,00	0,3010	0,27	3,79
T5M4	16,00	0,0241	0,77	2,34	6,00	0,0234	0,47	3,61	50,00	0,0275	1,06	4,86	38,00	0,0294	0,24	4,82
T5M5	22,00	0,0297	0,80	6,23	14,00	0,0858	1,34	4,80	15,00	0,0894	0,68	2,73	24,00	0,0947	0,77	5,14
T6M1	16,00	0,0819	0,58	3,59	17,00	0,0537	0,77	5,02	25,00	0,0379	0,34	3,56	29,00	0,0860	1,38	4,08
T6M2	13,00	0,0221	0,18	1,05	17,00	0,0811	0,63	2,24	29,00	0,0312	0,67	4,58	10,00	0,0065	1,20	4,05
T6M3	15,00	0,0226	0,54	3,35	37,00	0,0948	1,60	5,62	20,00	0,0480	0,56	4,53	16,00	0,0217	0,62	2,50
T6M4	25,00	0,0301	0,78	3,12	20,00	0,0368	1,14	4,38	32,00	0,0744	0,86	4,88	8,00	0,0121	1,07	1,56
T6M5	23,00	0,0303	1,10	3,01	32,00	0,0582	1,06	5,57	20,00	0,0194	0,45	2,13	17,00	0,0583	1,23	5,37

**Anexo 11.** Parámetros de nodulación, biomasa de la raíz y follaje a los 21 DDS para la variedad mantequilla en peso seco, con tratamientos, muestras y réplicas.

TRATAMIENTO	REPETICIONES											
	I			II			III			IV		
	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF	PSN	PSR	PSF
T1M1	0,0027	0,07	0,20	0,0018	0,02	0,10	0,0000	0,10	0,61	0,0004	0,08	0,56
T1M2	0,0019	0,05	0,20	0,0030	0,12	0,51	0,0059	0,12	0,61	0,0009	0,05	0,43
T1M3	0,0020	0,01	0,50	0,0040	0,11	0,39	0,0027	0,18	0,42	0,0023	0,08	0,43
T1M4	0,0033	0,11	0,49	0,0037	0,05	0,21	0,0018	0,09	0,50	0,0055	0,07	0,72
T1M5	0,0064	0,12	0,31	0,0020	0,04	0,31	0,0528	0,06	0,88	0,0011	0,08	0,55
T2M1	0,0018	0,03	0,44	0,0077	0,05	0,76	0,0490	0,07	0,21	0,0005	0,10	0,49
T2M2	0,0095	0,10	0,43	0,0133	0,10	0,55	0,0050	0,06	0,41	0,0043	0,14	0,91
T2M3	0,0133	0,07	0,49	0,0134	0,10	0,44	0,0025	0,12	0,31	0,0130	0,13	1,09
T2M4	0,0081	0,10	0,67	0,0054	0,05	0,60	0,0174	0,08	0,65	0,0040	1,18	0,70
T2M5	0,0010	0,06	0,28	0,0100	0,05	0,67	0,0185	0,15	0,62	0,0086	1,07	0,55
T3M1	0,0000	0,08	0,98	0,0000	0,07	0,31	0,0000	0,06	0,30	0,0000	0,09	0,59
T3M2	0,0000	0,07	0,59	0,0000	0,09	0,43	0,0000	0,05	0,29	0,0000	0,09	0,34
T3M3	0,0005	0,09	0,91	0,0000	0,05	0,68	0,0023	0,09	0,61	0,0030	0,08	0,32
T3M4	0,0000	0,05	0,71	0,0010	0,10	0,38	0,0000	0,04	0,28	0,0000	0,09	0,43
T3M5	0,0000	0,07	0,61	0,0000	0,07	0,31	0,0000	0,07	0,48	0,0000	0,10	0,50
T4M1	0,0208	0,10	0,80	0,0026	0,09	0,92	0,0017	0,10	0,42	0,0180	0,46	0,01
T4M2	0,0360	0,11	0,45	0,0010	0,11	0,98	0,0166	0,12	0,67	0,0128	0,47	0,11
T4M3	0,0003	0,06	0,66	0,0152	0,08	0,71	0,0009	0,13	0,58	0,0058	0,60	0,66
T4M4	0,0009	0,07	0,28	0,0064	0,08	0,53	0,0471	0,12	0,64	0,0064	0,72	0,07
T4M5	0,0059	0,14	0,52	0,0104	0,64	0,64	0,0104	1,11	0,38	0,0038	0,73	0,10
T5M1	0,0057	0,08	0,69	0,0032	0,07	0,87	0,0301	0,05	0,41	0,0019	0,13	0,95
T5M2	0,0060	0,08	0,76	0,0061	0,12	0,61	0,0470	0,05	0,36	0,0147	0,08	0,47
T5M3	0,0012	0,06	0,77	0,0024	0,11	0,43	0,0016	0,06	0,34	0,0215	0,04	0,26
T5M4	0,0053	0,08	0,31	0,0241	0,11	0,57	0,0094	0,10	0,67	0,0064	0,12	0,80
T5M5	0,0019	0,09	0,95	0,0298	0,19	0,66	0,0333	0,12	0,51	0,0028	0,08	0,37
T6M1	0,0133	0,00	0,47	0,0078	0,10	0,61	0,0085	0,12	0,41	0,0119	0,09	0,64
T6M2	0,0054	0,08	0,45	0,0065	0,03	0,24	0,0056	0,10	0,60	0,0008	0,08	0,17
T6M3	0,0057	0,01	0,32	0,0012	0,07	0,56	0,0096	0,05	0,61	0,0027	0,11	0,48
T6M4	0,0041	0,11	0,32	0,0046	0,09	0,44	0,0090	0,07	0,67	0,0030	0,09	0,44
T6M5	0,0039	0,10	0,20	0,0078	0,09	0,65	0,0045	0,10	0,34	0,0068	0,09	0,45

**Anexo 12.** Prueba de Tukey HSD para la variedad rojo percal con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento

Tratamiento	Media Altura 7 DDS	Tratamiento	Media Altura 21 DDS	Tratamiento	Media # Hojas 21 DDS
T2	9,1 a	T3	13,4 a	T3	3,55 a
T4	8,25 ab	T4	13,05 a	T4	3,3 ab
T3	8,1 ab	T6	12,95 a	T1	3,2 ab
T5	8,0 ab	T2	11,65 ab	T6	3,15 ab
T6	7,8 ab	T1	11,45 ab	T2	3,1 ab
T1	7,45 b	T5	9,9 b	T5	2,9 b

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 13.** Prueba de Tukey HSD para la variedad blanco belén con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.

Tratamiento	Media Altura 7 DDS	Tratamiento	# Hojas 7 DDS	Tratamiento	Media Altura 21 DDS	Tratamiento	# Hojas 21 DDS
T 4	8,15 a	T 1	2,0	T 4	14,8 a	T 1	4,55 a
T 1	7,75 a	T 2	2,0	T 2	14,6 a	T 2	4,5 ab
T 6	7,7 a	T 5	2,0	T 6	14,45 a	T 4	4,5 ab
T 5	7,55 a	T 4	2,0	T 3	14,25 a	T 3	4,3 ab
T 3	7,475 a	T 3	2,0	T 5	13,5 a	T 6	4,2 ab
T 2	7,4 a	T 6	1,95	T 1	13,25 a	T 5	3,55 b

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 14.** Prueba de Tukey HSD para la variedad mantequilla con respecto a la influencia de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos en diferentes etapas de crecimiento.

Tratamiento	Media Altura 7 DDS	Tratamiento	# Hojas 7 DDS	Tratamiento	Media Altura 21 DDS	Tratamiento	# Hojas 21 DDS
T 5	9,5 a	T 1	2	T 2	16,85 a	T 4	4,05 a
T 1	8,125 a	T 2	2	T 3	15,75 a	T 3	4,0 a
T 4	8,1 a	T 3	2	T 5	15,5 a	T 1	3,8 a
T 3	7,85 a	T 4	2	T 4	15,5 a	T 6	3,8 a
T 6	7,75 a	T 5	2	T 1	15,35 a	T 2	3,6 a
T 2	7,55 a	T 6	2	T 6	14,85 a	T 5	3,6 a

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 15.** Prueba de Tukey HSD para la variedad fréjol rojo percal sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 21 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T 5	14,65 a	T 5	0,16674 a	T 3	1,83432	T 3	6,83183	T 5	0,019305 a	T 2	0,179975	T 6	1,0065
T 4	12,75 ab	T 4	0,114805 ab	T 2	1,8174	T 6	5,84527	T 2	0,012802 bc	T 6	0,17805	T 3	0,952515
T 2	11,55 ab	T 2	0,11161 ab	T 4	1,6709	T 4	5,57515	T 6	0,01241 bc	T 5	0,174765	T 2	0,8738
T 6	7,95 abc	T 1	0,100325 ab	T 6	1,58969	T 2	5,48818	T 4	0,009375 bc	T 4	0,17213	T 4	0,845435
T 1	4,85 c	T 6	0,086317 ab	T 5	1,44018	T 5	5,41003	T 1	0,0091 bc	T 3	0,1609	T 1	0,834028
T 3	2,4 c	T 3	0,012385 c	T 1	1,40441	T 1	5,24397	T 3	0,00156 c	T 1	0,14376	T 5	0,81611

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 16.** Prueba de Tukey HSD para la variedad blanco belén percal sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 21 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T 2	27,55 a	T 2	0,206785 a	T 3	1,46109 a	T 2	6,78098 a	T 2	0,06771	T 4	0,282985 a	T 2	1,22676 a
T 4	16,9 ab	T 4	0,18448 a	T 6	1,3134 a	T 4	6,73186 a	T 4	0,031995	T 3	0,184785 ab	T 6	1,09732 ab
T 6	14,2 b	T 6	0,150975 ab	T 4	1,30071 <sup>a</sup>	T 6	7,08384 a	T 6	0,025455	T 2	0,182035 ab	T 5	1,03764 abc
T 5	14,15 b	T 5	0,112085 ab	T 1	1,19802	T 5	6,48079 ab	T 5	0,022145	T 6	0,169495 ab	T 4	1,0189 abc
T 1	7,05 bc	T 1	0,044575 b	T 5	1,18259	T 1	5,48177 ab	T 1	0,00659	T 5	0,164245 ab	T 1	0,833725 bc
T 3	1,95 c	T 3	0,041515 b	T 2	1,18146	T 3	4,38508 c	T 3	0,00212	T 1	0,06859 b	T 3	0,712495 c

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 17.** Prueba de Tukey HSD para la variedad mantequilla sobre el efecto de los aislados en los parámetros de nodulación y biomasa, a los 21 DDS.

NN		PFN		PFR		PFF		PSN		PSR		PSF	
Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias	Trat.	Medias
T 5	22,75 a	T 5	0,064895 a	T 3	0,962	T 5	4,50588	T 5	0,01272 a	T 4	0,302 a	T 5	0,58816
T 6	21,05 a	T 4	0,049255 ab	T 2	0,9555	T 4	4,22571	T 4	0,01115 a	T 2	0,1905 ab	T 2	0,564115
T 2	20,35 ab	T 2	0,046215 ab	T 4	0,928	T 2	4,19852	T 2	0,010315 a	T 5	0,091 b	T 4	0,506085
T 4	16,55 ab	T 6	0,045355 ab	T 1	0,9255	T 3	3,79	T 6	0,006135 ab	T 1	0,0805 b	T 3	0,503485
T 1	11,9 b	T 1	0,023445 bc	T 6	0,838	T 6	3,71002	T 1	0,00521 ab	T 6	0,079 b	T 6	0,45301
T 3	1,4 c	T 3	0,002475 c	T 5	0,777	T 1	3,33747	T 3	0,00034 b	T 3	0,0715 b	T 1	0,445705

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 18.** Prueba de Tukey HSD para la variedad mantequilla sobre el rendimiento en toneladas por hectárea.

ROJO PERCAL		BLANCO BELÉN		MANTEQUILLA	
T1	0,495 c	T1	0,943484 bc	T1	1,3875 b
T2	0,774375 bc	T2	0,900625 bc	T2	1,744375 b
T3	1,08875ab	T3	1,14625 ab	T3	1,240625 ab
T4	0,534375 c	T4	1,13063 ab	T4	1,6171875 ab
T5	0,4325 c	T5	0,777377 c	T5	1,3946875 b
T6	1,26313 a	T6	1,43 a	T6	1,9375 a

Method: 95,0 percent Tukey HSD.

**Anexo 19.** Interpretación del análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol rojo percal, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015.

Cód. Cam.	Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
			%	ppm	ppm	ppm	meq/100 ml	meq/100 ml	ppm	ppm	ppm	mmhos/cm
Rojo 1	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Medio	No Salino
Rojo Co	Franco	Muy Ácido	Bajo	Alto	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
Rojo CIAT	Franco	Muy Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
Rojo Fert	Franco Limoso	Muy Ácido	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
Rojo T8	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
Rojo T9	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Rojo T12</b>	Franco	Muy Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino

**Anexo 20.** Interpretación del análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol blanco belén, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015.

Cód. Cam.	Textura	pH	M.O	N	P2O5	K2O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	CE
			%	ppm	ppm	ppm	meq/100 ml	meq/100 ml	ppm	ppm	ppm	mmhos/cm
<b>Var. Blanco</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Blanco Co</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Blanco CIAT</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Blanco Fert.</b>	Franco	Ácido	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Blanco T8</b>	Franco	Muy Ácido	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Blanco T9</b>	Franco Limoso	Muy Ácido	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino

<b>Blanco T12</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
-------------------	--------	-------	------	------	-------	------	------	------	------	-------	-------	-----------

**Anexo 21.** Interpretación del análisis físico-químico de suelo para la variedad de fréjol mantequilla, Sector los Molinos “La Argelia”. Loja, 2015.

Cód. Cam.	Textura	pH	M.O %	N ppm	P2O5 ppm	K2O ppm	Ca meq/100 ml	Mg meq/100 ml	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	CE mmhos/cm
<b>Mantequilla 1</b>	Franco Limoso	Ligeramente Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Medio	Alto	No Salino
<b>Mantequilla Co</b>	Franco	Medianamente Ácido	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Mantequilla CIAT</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	No Salino
<b>Mantequilla Fer</b>	Franco Limoso	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	No Salino
<b>Mantequilla T8</b>	Franco	Ácido	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Medio	No Salino
<b>Mantequilla T9</b>	Franco	Ácido	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	No Salino
<b>Mantequilla T12</b>	Franco	Ácido	Medio	Medio	Alto	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	No Salino

## Anexo 22. Tríptico de día de campo.

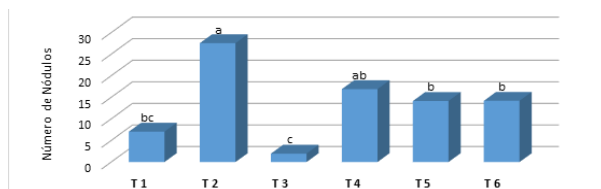


Figura 2. Número de Nódulos de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

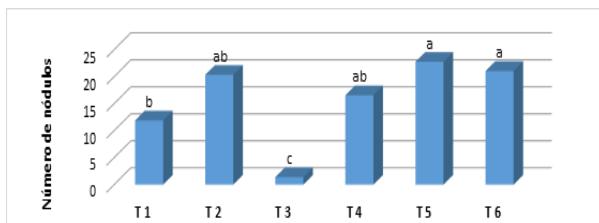


Figura 3. Número de Nódulos de la variedad mantequilla. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

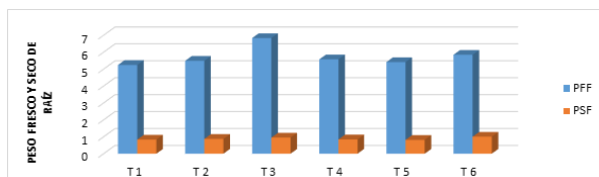


Figura 4. Peso fresco y seco del follaje de la variedad de fréjol rojo. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

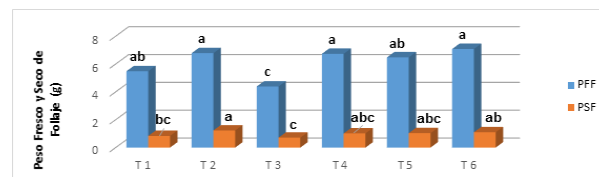


Figura 5. Peso Fresco y Seco del follaje de la variedad de fréjol blanco belén. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

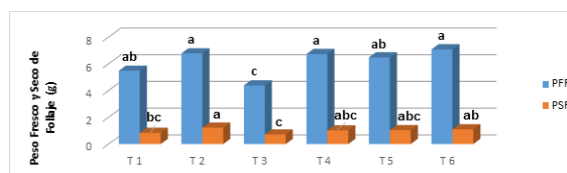


Figura 6. Peso fresco y seco del follaje de la variedad de fréjol rojo. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

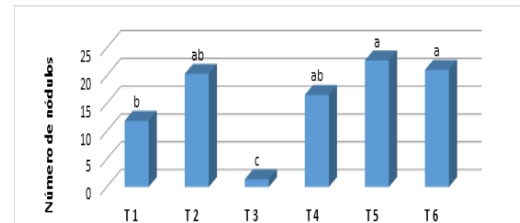


Figura 7. Número de Nódulos de la variedad mantequilla. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).

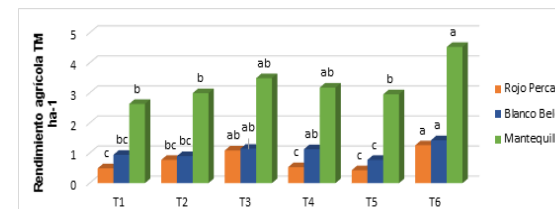


Figura 8. Rendimiento agrícola en fréjol rojo percal, blanco belén y mantequilla. Tratamientos: 1. Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), *Rhizobium Miluonense-Gonzanamá* (T4), *Rhizobium Tropici-Catamayo* (T5), *Rhizobium Lusitanum-Saraguro* (T6).



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

**TESIS:**  
“EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FRÉJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA”.



**Director:**  
Ing. Kléver Iván Granda Mora., M. Sc.

**Tesista:**  
Juliana Lilibet Cacay Soto



## Continuación de anexo 21

### **INTRODUCCIÓN**

La característica que posee el fréjol en el proceso de (FBN), representa una solución a la limitación en los incrementos de la productividad de esta leguminosa, así como también el aporte de nitrógeno a los suelos dedicados a su cultivo ya que generalmente presentan deficiencias en lo que respecta a este nutriente (Rosas et al, 2013). Considerada por tanto como una de las alternativas más viables para recuperar este elemento en los ecosistemas. Los rizobios son responsables del 80% de esta fijación (Graham, 2004). Las cantidades de nitrógeno atmosférico fijado por los rizobios son de gran importancia económica, posibilitando por ende, la disminución del uso de fertilizantes sintéticos como la urea (Cayo y Rojas, 2006; Bernal, 2012).

La simbiosis Rhizobium – leguminosa tiene importancia ecológica y agronómica significativa y constituye una fuente importante de nitrógeno; por lo tanto, desempeña un papel esencial en la estructura de los ecosistemas y la agricultura (Lindstrom et al., 2010). Es por eso que la presente investigación permitirá EVALUACIÓN DEL EFECTO BENÉFICO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS EN VARIEDADES DE FREJOL COMÚN EN LA HOYA DE LOJA, dilucidando y aportando estudios sobre el efecto de inoculación de cepas eficientes de Rhizobium sobre parámetros fisiológicos, fijación de nitrógeno y rendimiento agrícola en tres variedades de fréjol común en condiciones de campo, con el fin de propiciar nuevos métodos de producción agronómica y ecológicamente sustentables.

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

- ◆ Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias diazotróficas del género Rhizobium en el crecimiento y desarrollo de tres variedades de fréjol común en la hoya de Loja

#### **Objetivos específicos**

- ✘ Identificar el efecto de la inoculación de Rhizobium sobre parámetros de nodulación, morfológicos y biomasa en tres variedades de fréjol común bajo condiciones de campo.
- ✘ Determinar el efecto de los aislados de Rhizobium sobre componentes de rendimiento agrícola de las variedades de fréjol común (rojo percal, blanco belén y mantequilla).
- ✘ Evaluar la influencia de la aplicación de los aislados sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo en el área de experimentación

### **METODOLOGÍA**

#### **Metodología para el primer objetivo**

Los tratamientos empleados fueron: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), Rhizobium Miluonense-Gonzanamá (T4), Rhizobium Tropici-Catamayo (T5), Rhizobium Lusitanum-Saraguro (T6). Las combinaciones de genotipos-cepas como T-8, T-9 y T-12 son resultantes de experimentos en condiciones controladas realizadas en el Centro de Biotecnología además se utilizó una cepa tipo CIAT (T2), también el tratamiento con aplicación de fertilización mineral (T3) y el control sin fertilizar y sin inocular (T1)

- ✘ El Bionoculante se lo utilizó mediante el método de peletización de las semillas. (Torres-Gutierrez, 2008). Consiste en mezclar la semilla con el Bionoculante utilizando un adherente; Azúcar al 30% para 1769 m2 del experimento 8 kg de semilla 0,21 kg de inóculo y 0,060 kg de azúcar.



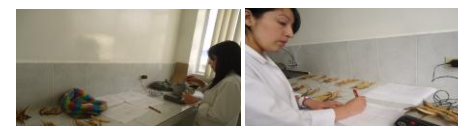
- ✘ A los 7 y 22 días después de la siembra (DDS) se evaluaron parámetros morfológicos en cada una de las variedades, para el efecto se tomaron 5 plantas al azar de cada una de las parcelas de los diferentes tratamientos y se registró el número de hojas y altura de planta (cm)

- ✘ Nodulación, morfológicas y biomasa.



#### **Metodología para el segundo objetivo**

Para determinar los componentes del rendimiento se tomarán muestras de 10 plantas por parcela de cada tratamiento, en las cuales los parámetros a evaluar fueron: número de vainas por planta, peso de vainas por planta, número de granos por vaina, peso de 100 semillas.



#### **Metodología para el tercer objetivo**

- ✘ Análisis químico
- ✘ Análisis físico
- ✘ Análisis microbiológico

### **RESULTADOS**

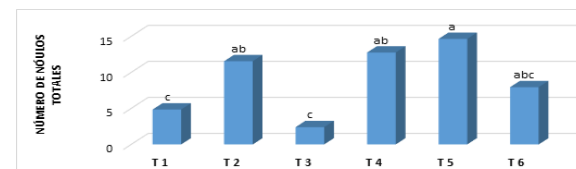












Figura 1. Número de nódulos de la variedad de fréjol rojo. Tratamientos: Control (T1), CIAT (T2), Fertilización (T3), Rhizobium Miluonense-Gonzanamá (T4), Rhizobium Tropici-Catamayo (T5), Rhizobium Lusitanum-Saraguro (T6).


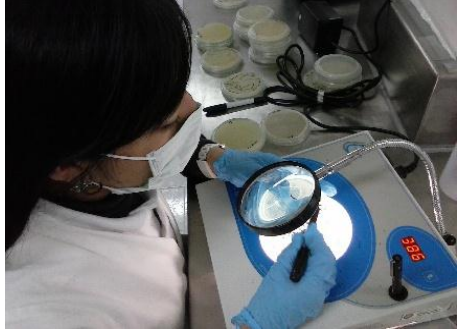


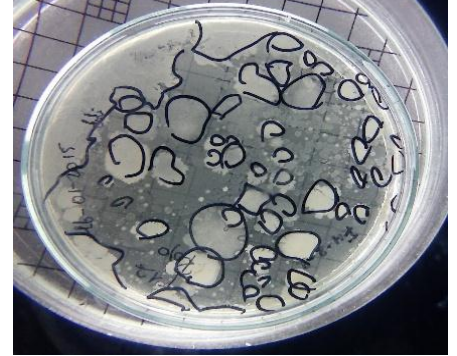
Anexo 23. Evidencias fotográficas.

Figura Nº	Imagen	Descripción
1		<p>Realización de inoculación de cepas de <i>Rhizobium</i> en variedades de fréjol: rojo percal, blanco belén y mantequilla, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>
2		<p>Trazado de parcelas para la realización de la siembra de variedades de fréjol, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>
3		<p>Evaluación de la altura de la planta y número de hojas a los 7 DDS, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>
4		<p>Deshierba de fréjol, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>

5		<p>Evaluación de la altura de la planta y número de hojas a los 21 DDS, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>
6		<p>Recolección en fundas de papel de fréjol de cada tratamiento por cada replica a los 21 DDS, sector Los Molinos – Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.</p>
7		<p>Traslado de muestras recolectadas y lavado de las plantas para realizar el conteo de nódulos, peso fresco de la raíz y follaje, Laboratorio de Biotecnología UNL. Loja, 2015.</p>
8		<p>Secado y cuantificación de nódulos, Laboratorio de Biotecnología UNL. Loja, 2015.</p>
9		<p>Pasaje en fresco de nódulos, raíz y follaje de fréjol, Laboratorio de Biotecnología UNL. Loja, 2015.</p>

10		Pasaje en seco de follaje de fréjol, Laboratorio de Biotecnología UNL. Loja, 2015.
11		Deshierba de fréjol, Sector los Molinos - Quintas Experimentales La Argelia. Loja, 2015.
12		Plantas de fréjol por cada variedad, tratamiento y réplica, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.
13		Conteo de vainas por planta de fréjol por cada variedad, tratamiento y réplica, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.
14		Pesaje de vainas de fréjol Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.

15		<p>Pesaje de 100 granos de fréjol rojo percal, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.</p>
16		<p>1gramo de suelo para realizar diluciones cuantitativas, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015</p>
17		<p>Extracción de 1 ml dedilución, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.</p>
18		<p>Dilución en cajas petri, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.</p>

19		<p>Incubación de cajas petri, Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.</p>
20		<p>Observación de las cajas Petri con presencia de bacterias, hongos y actinomicetos para realizar el conteo de colonias. Laboratorio de Biotecnología-UNL. Loja, 2015.</p>
21		<p>Laboratorio de Biotecnología-UNL, Conteo de hongos. Loja, 2015.</p>
22		<p>Laboratorio de Biotecnología-UNL, Conteo de bacterias. Loja, 2015.</p>
23		<p>Laboratorio de Biotecnología-UNL. Conteo de actinomicetos. Loja, 2015</p>