

SELECCIÓN INDIVIDUAL DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) PARA MEJORAR LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO CON *Rhizobium* sp.

INDIVIDUAL SELECTION IN BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) TO IMPROVE
THE NITROGEN FIXATION CAPACITY WITH *Rhizobium* sp.

Nancy María Guadalupe Romero-Rosales¹, Carlos Manuel Acosta-Durán^{2*}

¹Estudiante de Licenciatura de la Facultad de Ciencias Biológicas; ²Laboratorio de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias; Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av Universidad 1001, col Chamilpa, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, México.
*Autor responsable. Correo-e: acosta_duran@yahoo.com.mx

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la fabácea más importante para el consumo humano en los países del tercer mundo, pero a su vez es la especie de más baja capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno. No existe información de que en un programa de mejoramiento se hayan incluido las características de capacidad de nodulación, por lo tanto; en una población mejorada de plantas de la misma variedad existe alta variabilidad en cuanto a las características de nodulación y fijación de nitrógeno entre los individuos. Se realizó un experimento con los objetivos de seleccionar individuos con alta capacidad de nodulación dentro de una variedad mejorada de frijol, inoculada con *Rhizobium* y evaluar los individuos seleccionados para

alta capacidad de fijación de nitrógeno con *Rhizobium*. La metodología consistió en obtener cepas nativas, inocularlas en plantas crecidas en condiciones controladas, seleccionar individuos sobresalientes para capacidad de nodulación y compararlos en condiciones de invernadero con plantas fertilizadas químicamente, inoculadas y testigo absoluto, en suelo Andosol de bajo contenido de nitrógeno. Los resultados mostraron que la selección de individuos realizada en condiciones de laboratorio incrementó la capacidad de nodulación de la población seleccionada en 189.63 %. Cuando las plantas seleccionadas se cultivaron en condiciones de invernadero, la capacidad de nodulación se incrementó en 74.02 %. Se observó un incremento en las variables relacionadas a la disponibilidad de nitrógeno como efecto de la fijación biológica de nitrógeno. En la comparación

de los cuatro tratamientos se observaron respuestas diferentes entre variables. El tratamiento de fertilización química superó al resto de los tratamientos en la mayoría de las variables. Sin embargo el tratamiento Selección mostró igualdad estadística con el tratamiento químico en tres variables (diámetro de tallo, peso de semillas y SPAD) y lo superó en el número de nódulos. El tratamiento Selección también mostró avance significativo en la respuesta promedio del frijol en las variables de diámetro de tallo y peso de semillas, con respecto al testigo.

Palabras clave: selección individual, nodulación, fijación de nitrógeno, frijol.

ABSTRACT

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important Leguminosae for human consumption in the third world countries, but in turn, is the lowest nodulation ability and nitrogen fixation plant. There is no information of to have included the capacity characteristics of nodulation in a bean breeding program, therefore, in an improved population of plants of the same variety there is high variability in the characteristics of nodulation and nitrogen fixation among individuals. An experiment with the objective of selecting individuals with high nodulation capacity in improved bean cultivar inoculated with *Rhizobium* and evaluate individuals selected for high nitrogen fixing capacity with *Rhizobium*, was performed. The methodology was to obtain native strains, inoculated in plants grown under controlled conditions, selecting outstanding individuals and compare nodulation capacity of them with chemically fertilized treatment, inoculated plants and absolute control plants, under greenhouse conditions. All plants growing in low nitrogen Andosol soil. The results showed that the selection of individuals conducted in laboratory conditions increased nodulation capacity of the target population in 189.63 %. Nodulation capacity increased by 74.02 % when selected plants, grown in greenhouse

conditions. An increase was observed in the variables related to nitrogen availability as a result of biological nitrogen fixation. In the comparison between four different treatments, different variables responses were observed. The treatment of chemical fertilizer outperformed all other treatments in most variables. However, the treatment team showed statistical equality with chemical treatment in three variables (stem diameter, seed weight and SPAD) and exceeded the number of nodules. The treatment Selection also showed significant improvement in mean response variables bean stem diameter and seed weight, relative to the control.

Keywords: individual selection, nodulation, nitrogen fixation, bean.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es cultivado actualmente en diferentes condiciones de humedad (riego, temporal y humedad residual) y ciclos de siembra (primavera-verano y otoño-invierno) (Ravelero, 2005); en México es un cultivo tradicional, el cual se siembra en casi todas las regiones agrícolas del país.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado y liberado variedades mejoradas para todas las regiones productoras de grano, lo cual ha contribuido a solucionar diversos problemas que se han presentado en nuestro país (Ravelero, 2005), siendo el principal objetivo del fitomejoramiento genético, incrementar la producción y la calidad de los productos agrícolas por unidad de superficie, en el menor tiempo, con el mínimo esfuerzo y al menor costo posible (Brauer, 1987), aun así, después de su liberación, el comportamiento fenológico y rendimiento puede variar dependiendo de las condiciones ambientales en las cuales se cultiva.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la biosfera, en el que los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado, en donde el grupo de los rizobios, induciendo a las raíces de las fabáceas, la formación de estructuras especializadas, (nódulos), dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio (Atlas y Bartha, 2002; Madigan *et al.*, 2004). Se ha demostrado que entre el 25 y 75 % del N requerido por la planta de frijol, proviene de la fijación simbiótica. Las cantidades de N₂ fijado suministran entre 25 - 125 kg N·ha⁻¹, dependiendo del cultivo (Megias, 1991; Baca *et al.*, 2000).

Phaseolus vulgaris es una planta anual de hasta 1 metro, hojas ovales u orbitales, corola blanquecina o rosa; fruto con dos vueltas de espiral. Una de las especies de fabáceas más estudiada en diversos aspectos, especie que pertenece a la subfamilia *Papilionoidae* (Cronquist, 1981). El frijol es originario de Mesoamerica y en esta region comenzó a ser domesticado con fines alimentarios. Las semillas secas del frijol son ricas en fibras, hidratos de carbono, los cuales son complejos y de absorción lenta, también es abundante en vitaminas y minerales, pero lo mas sobresaliente es el aporte proteico en la alimentación (Colín, 2005).

Phaseolus vulgaris, es la fabácea más importante para el consumo humano en los países del tercer mundo, pero a su vez es la especie de más baja capacidad de nodulación y fijación de N₂ (Salinas-Moreno *et al.* 2005).

La Familia *Rhizobiaceae* es un grupo de bacterias que presenta la mayor diversidad metabólica y una gran importancia; clínica, industrial o agrícola. La familia *Rhizobiaceae* está incluida en la división (α) de las proteobacterias y se encuentran incluidos los géneros de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mezorhizobium* y *Bradyrhizobium*; son bacterias gram negativas, aerobias y

heterótrofas, bacilo corto, algunas veces pleomórfico, no forma espora, móvil por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral, son bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.3-3.0 μm . Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, concavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Su temperatura óptima de crecimiento en condiciones artificiales es de 25 °C y su tolerancia al pH es de 5 a 8 (Madigan *et al.*, 2004; Buendía-Clavería *et al.*, 1991), se encuentran en el suelo, existiendo la mayor riqueza de *Rhizobium* en suelos tropicales y subtropicales que en suelos templados, concordante con la mayor riqueza de leguminosas en estas y son las responsables más importantes de fijar el 90 % de nitrógeno atmosférico para ser aprovechado por las plantas de la familia *Leguminosae* a través de una relación simbiótica (Martínez-Romero *et al.*, 1998; Sprent, 2001).

Las plantas de frijol tienen la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces al interaccionar con *R. etli*, especie bacteriana que pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. *R. etli* es el microsimbionte que seguramente co-evolucionó con el frijol y el más eficiente en fijación de nitrógeno con las líneas Mesoamericanas de *Phaseolus vulgaris* (Martínez-Romero *et al.*, 1998). Segovia (1993), propone que *R. etli* ha resultado ser un buen inoculante analizado en poblaciones de *Rhizobia* en nódulos de frijol, provenientes de aislados de Mesoamérica.

Una cepa que es efectiva (habilidad para fijar N) e infectiva (habilidad para infectar las raíces de las plantas), persiste y crece en el suelo, tolera las condiciones locales, compite por sitios de infección con otros organismos de la rizósfera y, manifiesta estabilidad genética. En general el efecto observado con la inoculación de cepas introducidas o comerciales puede atribuirse a dos razones principales: i) las

condiciones ambientales y edáficas en nuestro medio difieren de las que imperan en el lugar donde las cepas fueron aisladas; y ii) la diferente capacidad de nodulación y fijación entre cepas (Mora, 1995).

De acuerdo con Acosta y Pérez, (2001) y Brauer (1987), la selección individual se realiza en los siguientes pasos: 1) La selección individual de las plantas de la población; 2) La siembra de las semillas de cada una de las plantas seleccionadas en surcos separados o en parcelas especiales; 3) La selección de la mejor descendencia, o líneas, en base de las observaciones de las plantas en el período de vegetación y evaluación de aquellas características por las cuales se realiza la selección; y 4) La evaluación de las líneas seleccionadas según el rendimiento y otras características, y reproducción de las mejores líneas para la obtención de mayor cantidad de semillas a fin de su inscripción como nuevas variedades mejoradas.

Se consideran componentes del rendimiento a los factores morfológicos y fisiológicos que directa o indirectamente intervienen en el rendimiento. Los componentes son: número de vainas por planta, número de granos por vaina, peso seco individual del grano (Ranfla, 1979). De acuerdo con Mora (1995), como criterio de selección se pueden utilizar varios parámetros como el peso seco de la parte aérea de las plantas en la etapa de floración e incremento en la masa, peso seco, distribución, color y Castellanos *et al.* (1998) también mencionan el número de nódulos por planta, en la misma etapa para las características asociadas a la capacidad de fijación de N₂.

En la actualidad, los métodos de mejoramiento genético vegetal usados por el INIFAP como hibridación y selección pedigrí o selección gamética para desarrollar poblaciones y líneas avanzadas de frijol voluble con alto potencial de rendimiento y resistencia a enfermedades,

se encuentra que el rendimiento del cultivo del frijol está determinado por tres factores: el tamaño de semilla, la duración del período de desarrollo (días de siembra a cosecha) y el hábito de crecimiento. Con esto se está buscando recuperar un alto potencial de rendimiento (3000 a 5000 Kg·ha¹), buena calidad de semilla (tamaños grandes > 60 g / 100 semillas) y una alta producción de vainas distribuidas a lo largo de todo el período de crecimiento, una producción balanceada que permite proveer de un producto comestible (vainas verdes, grano verde y grano seco) en forma abundante la mayor parte del año (Acosta y Pérez, 2001).

Sevilla (2008), realizó una selección de variedades de *Phaseolus vulgaris* con alta capacidad de nodulación a cepas de *Rhizobium*, como etapa previa a la fijación de nitrógeno, resultando; que dentro de una población mejorada de plantas de frijol, existen variaciones genéticas entre los individuos de una misma variedad respecto a la capacidad de nodulación, por lo tanto existirán variaciones en cada individuo de una variedad con respecto a las señales exudadas por la planta a la bacteria y así perdiendo la característica de interacción Planta-*Rhizobium* y esto conlleva a un alto uso de fertilizantes nitrogenados.

Se ha demostrado que existe una relación inversa entre la capacidad de nodulación y la respuesta a fertilizantes químicos (Salinas-Moreno *et al.*, 2005; Sevilla, 2008). Es importante conocer en qué medida los sistemas reproductivos en las autógamias promueven la fijación de nitrógeno; para aportar elementos a la discusión de sus consecuencias en términos evolutivos.

Es por ello que en el presente trabajo se reconoce el papel de la FBN como una manera más efectiva, menos cara y no contaminante, para mejorar la productividad en la interacción *Rhizobium*-Fabácea comparada con otras vías (como la fertilización química y la orgánica), las cuales presentan altos niveles de

contaminación con metales pesados, sales nitrogenadas y microorganismos patógenos para el hombre (Baca *et al.*, 2000).

Debido a la variabilidad genética dentro de una variedad de frijol se produce una identificación selectiva de *Rhizobium* con las que puede establecer una simbiosis y por lo tanto; existen individuos de frijol que pueden identificarse con un gran número de cepas de *Rhizobium*, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron: Seleccionar individuos con alta capacidad de nodulación dentro de una variedad mejorada de frijol, inoculada con *Rhizobium* y evaluar los individuos seleccionados para alta capacidad de fijación de nitrógeno con *Rhizobium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicado en el campo experimental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Campus Chamilpa, en Cuernavaca Morelos, México.

Como poblaciones originales de frijol se utilizaron ocho variedades mejoradas: Ara (Ar), Azpa 103 (Az), Azufrado Higuera (AH), Bayo (B), Cacahuete 72 (C), Canario 72 (Ca), Flor de Mayo (FM) y Pimono 78 (P), provenientes del banco de germoplasma del campo experimental del INIFAP, ubicado en Zacatepec, Morelos, México.

Aislamiento de las Cepas Bacterianas del Suelo

Para la obtención de las cepas bacterianas en condiciones de invernadero, se sembraron veinte semillas de cada variedad (Ar, Az, AH, B, Ca, C, P, y FM) en macetas de seis pulgadas, en suelo tipo Andosol y se regaron cada tercer día sin aplicar ningún fertilizante químico.

A los 36 días después de la siembra (dds), se sacaron las plantas de las macetas y se lavaron las raíces con agua corriente para retirar el suelo de la raíz y se separaron los nódulos de la raíz de cada planta manteniendo la variedad de origen (Figura 1).

En condiciones de esterilidad, los nódulos se cortaron con las pinzas de disección, y se sembró su contenido (para obtener las colonias bacterianas) en forma de zig-zag en cajas de petri con medio PY. Las cajas fueron colocadas en una incubadora a una temperatura de 24 °C durante tres días para el crecimiento de las colonias.



Figura 1. Aislamiento de nódulos

Se seleccionaron las colonias bacterianas por sus características fenotípicas (colonias circulares, convexas, opacas y de dos a cuatro milímetros de diámetro), se sembraron nuevamente en forma de zig-zag en cajas de petri con medio PY y se incubaron a una temperatura de 24 °C durante tres días para su crecimiento, después de los cuales se repitió el procedimiento para generar colonias puras. Al final de la incubación se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para mantenerlas y posteriormente utilizarlas como inoculantes.

Siembra en laboratorio

Se tomaron cincuenta semillas de cada una de las variedades AH, C y P que crecieron y presentaron nódulos en suelo, para un reconocimiento cepa-variedad, se desinfectaron en condiciones estériles y se sembraron en cajas de petri con agar (8%), y se identificaron con la letra inicial de cada variedad.

Una vez obtenidas el 100 % de semillas germinadas de cada variedad, se incubaron a una temperatura de 22 °C durante cinco días (Figura 2).



Figura 2. Siembra de semillas de frijol en laboratorio en cajas de petri con agar.

Para realizar el trasplante, se prepararon matraces Erlenmeyer (250 ml) con 200 ml de vermiculita, previamente esterilizados en autoclave (20 minutos, a 120 °C de temperatura y 15 libras de presión). Bajo condiciones estériles, se tomaron las semillas germinadas (a los 6 dds) y se colocó una semilla en cada matraz, adicionando 80 ml de agua estéril. Se utilizaron cincuenta matraces por variedad con una semilla cada uno y cada matraz se cubrió con papel aluminio identificándolos con la letra inicial de cada variedad.

Una vez que las plantas de cada variedad superaron el borde superior del matraz, se sustituyó el papel aluminio por

taponos de algodón estériles, de modo que el tallo quedó libre para su desarrollo.

Se preparó la solución nutritiva de Fahraeus (1957) modificada como solución libre de nitrógeno, como lo sugiere López-Ortiz (2011), donde; cada solución se colocó en un litro de agua destilada; se ajustó el pH a 6.5 con hidróxido de sodio, se esterilizó por autoclave a una temperatura de 120 °C durante 15 minutos. A los 16 días después de la germinación (ddg) se colocaron 30 ml de solución nutritiva en cada matraz

Las cepas obtenidas del suelo en invernadero, se resembraron en forma de zig-zag en cajas de petri con medio sólido, se colocaron en una incubadora a una temperatura de 24 °C durante tres días para el crecimiento de las colonias. Después de haber resembrado las cepas obtenidas de cada variedad (C, P y AH), posteriormente a la incubación, se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

Inoculación de plantas de frijol en condiciones de laboratorio

De acuerdo con Sprent (2001), para inducir la infección e interacción *Fabacea-Rhizobium* en condiciones estériles; se preparó el inóculo tomando con un asa por separado una porción de las cepas puras de *Rhizobium*, siendo cuatro cajas de petri que se incubaron durante tres días previamente obtenidas del suelo y a los 24 días después del trasplante (ddt) a cada una de las plantas que se encontraban en el interior de los matraces, se les agregó 30 ml del inóculo en la base del tallo de las cpas obtenidas de las variedades Cacahuete 72 y Pimono 78.

Aislamiento de las cepas bacterianas incubadas en laboratorio

Para el aislamiento de cepas, a los 15 días después de la inoculación (ddi) se cosecharon las plantas de los matraces, se lavaron las raíces con agua corriente para retirar la vermiculita. Los nódulos obtenidos

por planta se colocaron en tubos, se identificaron con la letra inicial de cada variedad (P y C) y en condiciones estériles se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % (Cloralex®) en agitación durante cinco minutos, se les dio cinco enjuagues con agua estéril, posteriormente se sumergieron en alcohol al 70 % agitándose durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril agitándose durante cinco minutos, cuatro veces.

Una vez obtenidos los nódulos desinfectados se cortaron con las pinzas y se sembró su contenido (de donde se obtuvieron las colonias bacterianas) en forma de zig-zag en cajas de petri con medio PY. Las cajas de petri se colocaron en una incubadora a una temperatura de 22 °C durante tres días para el crecimiento de las colonias. Se seleccionaron las colonias bacterianas después de tres días de incubación por sus características fenotípicas, se sembraron nuevamente en cajas de petri con medio PY, en forma de zig-zag y se incubaron a 24 °C durante tres días para su crecimiento, después de los cuales se realizó una nueva resiembra para generar colonias puras. Al final de la incubación se colocaron en refrigeración a 4 °C. Las cepas bacterianas se identificaron con la primera letra inicial del nombre de la variedad Pimono 78 (P) y Cacahuete 72 (C).

Cultivo en invernadero

Se utilizó la variedad de frijol Cacahuete 72 (C), anteriormente seleccionada por Sevilla (2008), como una buena noduladora.

Se sembró en suelo tipo Andosol sin esterilizar donde previamente se realizó siembra de frijol (Sevilla 2008). Para la siembra de las semillas se utilizaron 60 macetas de plástico de seis pulgadas. Las macetas fueron previamente llenadas con el suelo mencionado. Se sembró una semilla por maceta y se regaron cada tres días, sin agregar ningún fertilizante químico (Figura 3).

Se hizo una selección de plantas, tomando en cuenta las mejores características visuales, quedando veinte plantas (Figura 3).



Figura 3. Selección de plantas en invernadero.

Inoculación de plantas de frijol en condiciones de invernadero

Se preparó el inóculo tomando con un asa, por separado, una porción de cada cepa bacteriana de la siembra de los nódulos de las plantas inoculadas en laboratorio de las cuales, se tiene la plena seguridad de que las cepas corresponden a *Rhizobium*, y se usaron como inoculante para éste experimento.

En cuatro matraces Erlenmeyer (125 ml); se pusieron 15 ml de medio PY sin agar y en tres matraces Erlenmeyer (500 ml); se pusieron 100 ml de medio PY sin agar; los matraces se inocularon con el asa, por separado, se taparon y se pusieron en incubación a una temperatura de 22 °C, en agitación (250 rpm) durante 48 hr (Figura 4).

Al terminar la incubación, en condiciones estériles; se realizó un solo inóculo, vertiendo el contenido de todos los matraces en un matraz Erlenmeyer (500 ml), se agitó con el fin de mezclar todo el inóculo y se aforó a 8 litros, de los cuales se tomaron 50 ml y se inoculó en la base del



Figura 4. Incubación de cepas bacterianas obtenidas en laboratorio e Inoculación a plantas en invernadero.

tallo de cada planta en maceta; a los 14 días después de la siembra para así inducir la interacción de la bacteria con la planta (Figura4).

Se cosecharon las plantas a los 60 días después de la siembra (dds), se tomaron datos del diámetro del tallo por planta, número y peso de nódulos por planta, número de vainas por planta, número y peso de semillas por planta. Se tomaron registros de la fijación de nitrógeno por planta por medio de un SPAD, como referencia para frijol en cuanto al contenido indirecto de la clorofila.

Selección de individuos en invernadero

En la evaluación de las cuatro variedades se utilizó la unidad de suelo tipo Andosol sin esterilizar, donde previamente se realizó siembra de frijol; se utilizaron 120 macetas de plástico de seis pulgadas para la siembra de las semillas, quedando cuatro bloques de 30 repeticiones. Las macetas fueron previamente llenadas con el suelo mencionado.

De la siembra anterior se seleccionaron las semillas de individuos superiores al promedio del número de nódulos por planta y se identificaron con la letra de la variedad y con una S (selección)

(C-S). Se sembraron las semillas seleccionadas, se identificaron y se regaron cada tres días, sin agregar ningún fertilizante químico (Cuadro 1).

Para inducir la interacción de la bacteria con la planta en condiciones de invernadero a los 13 dds (a los 5 días después de la emergencia), se preparó el inóculo en medio líquido, con una porción de cada cepa bacteriana de la siembra de los nódulos de las plantas seleccionadas en la etapa anterior y que además se tiene la plena seguridad de que las cepas corresponden a *Rhizobium*, se realizó el mismo procedimiento para realizar el inóculo final, del cual; se tomaron 50 ml y se inocularon en la base del tallo de cada planta de las marcadas como el Tratamiento Inoculado y se regaron normalmente.

Igualmente a los 13 dds se fertilizaron todas las plantas del Fertilizado con una dosis equivalente a 40 kg de N·ha⁻¹ y se regaron normalmente (Cuadro 1). Al tratamiento Selección (semilla seleccionada) y al tratamiento Testigo absoluto, no se les añadió nada.

Para la evaluación se tomaron datos cada semana a partir de la segunda hoja verdadera después de la inoculación y fertilización, de todos los tratamientos y

hasta que inicio la caída de las hojas basales. Las variables observadas fueron: diámetro de tallo, número de hojas y altura de planta. También se midió la fijación de nitrógeno mediante unidades SPAD como medida indirecta del contenido de clorofila de las plantas y los componentes de rendimiento que son número de vainas (Figura 5), peso de semillas por planta. También se tomaron datos del número y peso de nódulos, peso seco de raíz y peso seco de follaje.

Cuadro1. Evaluación en invernadero de los individuos de los 4 tratamientos.

Tratamiento	Descripción
Selección	C-78-S
Fertilización	C-78 INIFAP + 40 kg ·N ·ha ⁻¹
Inoculación	C-78 INIFAP + inoculación
Testigo absoluto	C-78 INIFAP

C-78= variedad cacahuate 72

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, la parcela constó de treinta macetas con una planta, de las cuales solo se tomaron registros de una muestra de ocho plantas. Se separaron las medias con la prueba de DMS ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de las Cepas Bacterianas del Suelo

De las ocho variedades que se utilizaron para la obtención de nódulos, solo se observaron en tres: en las variedades Pimono 78 y Azufrado Higuera nodularon tres plantas, y en la variedad Cacahuate 72 nodularon cuatro plantas. Por lo tanto, solo esas tres variedades tuvieron un

reconocimiento con las bacterias del suelo con un porcentaje de 75 % de plantas noduladas con respecto al total, además cabe mencionar que la unidad de suelo tipo Andosol había sido utilizado anteriormente por Sevilla (2008); reportando el 17.7 % de plantas noduladas. El suelo Andosol se considera bajo en nitrógeno por lo que se esperaba que todas las plantas formaran nódulos en las raíces, lo que no ocurrió, lo que indica la selectividad de las cepas nativas, la alta interacción de las plantas con respecto a la disposición del nitrógeno y sobre todo a los factores ambientales que intervienen en ello.



Figura 5. Secado de semilla a los 60 días después de la siembra.

Siembra en laboratorio

En la Figura 6, se demuestra que a los 39 ddi, la mayoría de los individuos no mostraron interacción con las cepas, aun estando en condiciones limitantes de nitrógeno, no respondieron como se esperaba a la interacción *Rhizobium*-planta, además de que fue muy baja la incidencia de la infección.

En este trabajo la variedad Cachuate 72 logró el 41.7 % de plantas noduladas con

respecto al total, lo que coincide con Sevilla (2008), que reporta 61.1 % en una segunda inoculación en condiciones de laboratorio, pero en la primera inoculación solo había alcanzado el 7.1 % de plantas noduladas con respecto al total. Estos datos sugieren que en una segunda inoculación se logró una mayor interacción planta-*Rhizobium*.

Por otra parte, los datos obtenidos de la altura de planta, antes y después de la inoculación, sugieren que en la parte aérea de la población, son homogéneas de acuerdo a los caracteres fijados en el mejoramiento genético de la población original.

Cultivo en invernadero

Cabe destacar que al aplicar fertilizante químico, no se inhibió la inoculación y el suelo utilizado es del aislamiento de cepas bacterianas de la siembra en invernadero.

En la Figura 6, se muestran los individuos de la variedad Cacahuate 72 los

cuales también presentaron baja nodulación y en la Figura 7 se muestra la selección de las semillas de individuos con valor superior al promedio de nódulos por planta (23.75), el porcentaje de nodulación de la población fue de 85.0 %, la cual fue una menor interacción a la reportada por Sevilla (2008).

En la Figura 8, se observa la presión de selección en cuanto a los individuos superiores al promedio de la variable números de nódulos por planta (23.75).

Se obtuvieron poblaciones homogéneas en cuanto a la variable de nodulación obteniendo un porcentaje de plantas seleccionadas de 45.0 % y presentando un promedio de nódulos por planta de 41.33.

Al realizar la selección de aquellos individuos cuyo promedio fue superior en la variable número de nódulos se obtuvo una población homogénea para dicha variable, bajo el criterio de selección quedando Cacahuate 72 - Selección con promedio de 100 % de plantas noduladas.

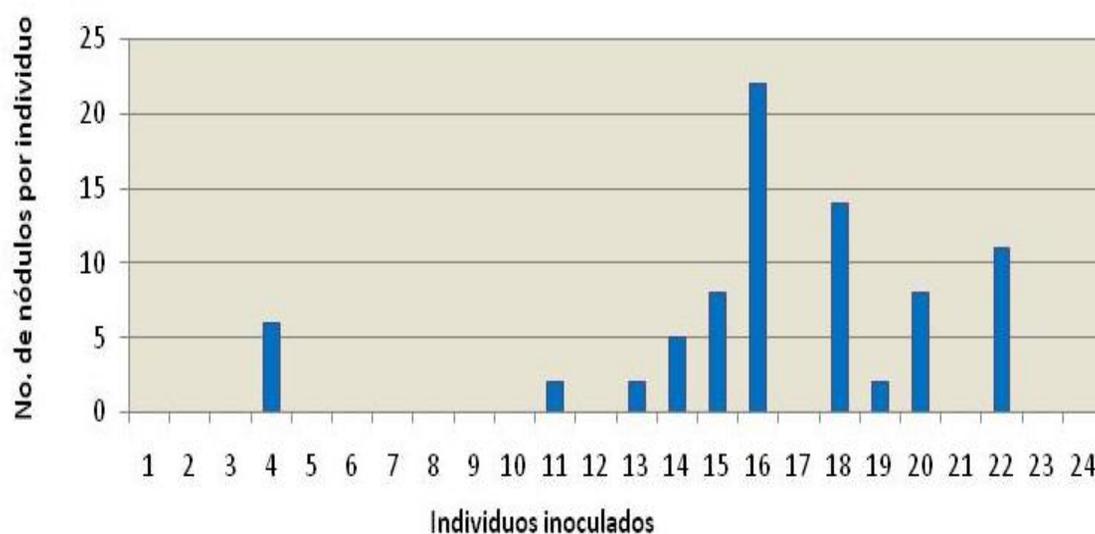


Figura 6. Nodulación de plantas inoculadas con *Rhizobium* de la variedad Cacahuate 72 en condiciones de laboratorio.

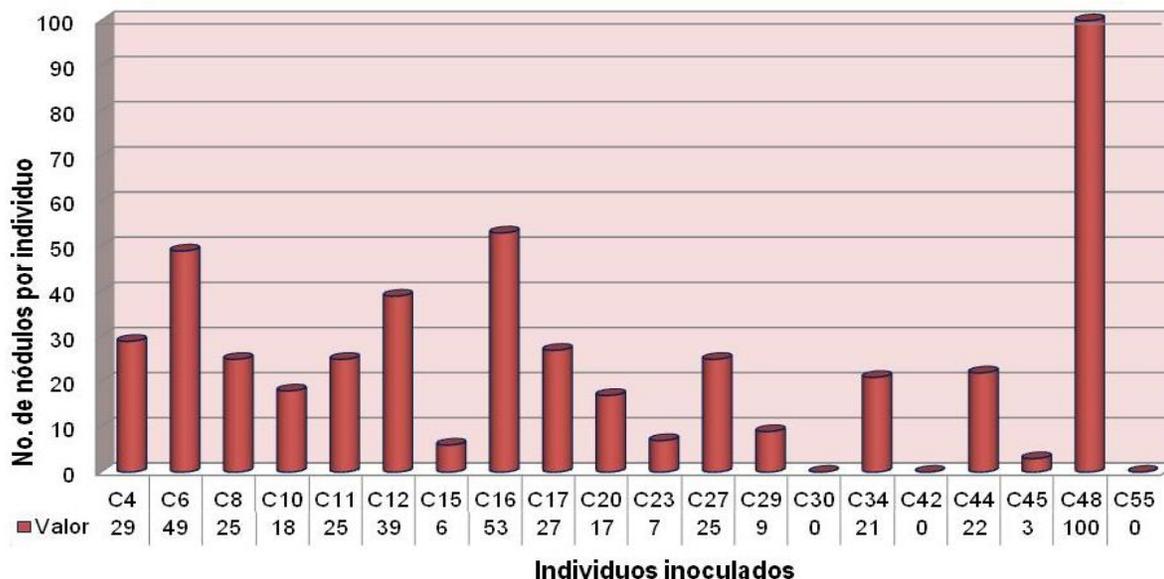


Figura 7. Número de nódulos en plantas inoculadas con *Rhizobium* en la variedad Cacahuate 72.

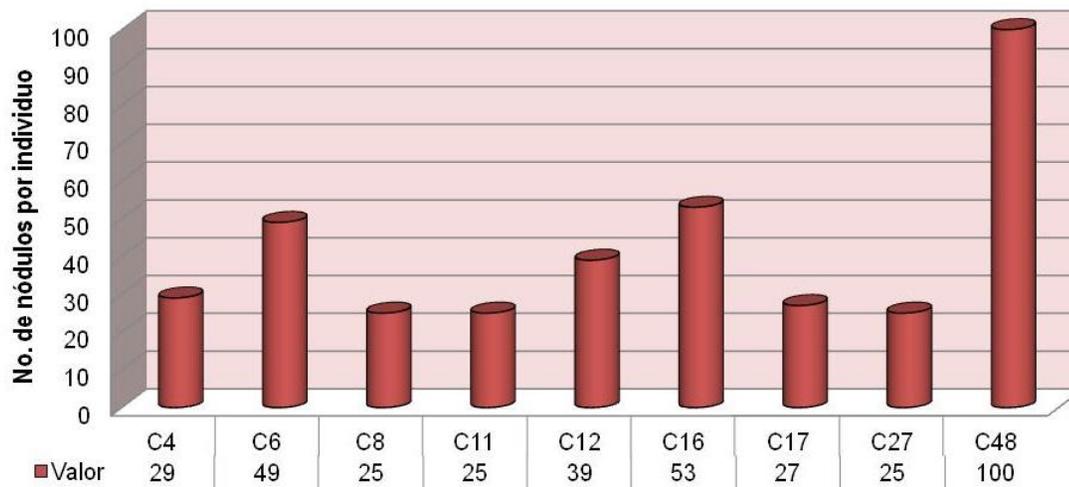


Figura 8. Individuos seleccionados por el número de nódulos superior al promedio (23.75) en plantas inoculadas con *Rhizobium* en la variedad Cacahuate 72 (C-S)

En cuanto al comportamiento en la interacción planta- *Rhizobium* se observó que con respecto a la variable de nodulación por planta, en la presión de selección de la variedad Cacahuate 72-Selección con un 45 %

Estas variaciones indican que la asociación de la bacteria con la variedad de frijol, está influenciada por otros factores además de la selectividad entre ambos. La simbiosis está determinada en primer lugar por la planta, que mediante exudados radicales induce a la bacteria a la formación de nódulos. Las variedades comerciales son

producto de métodos de mejoramiento genético en los que se manejan algunas características de la planta dejando libre el comportamiento de otras de importancia biológica, ecológica, social y económica como el caso de la fijación biológica de nitrógeno.

Evaluación de variedades seleccionadas en condiciones de invernadero

En el Cuadro 2, el tratamiento Fertilizado fue estadísticamente superior en las variables de número de hojas, altura de planta, número de vainas y peso seco de follaje, lo que sugiere que la capacidad que tienen las plantas de asimilar los fertilizantes adicionados es mayor a la Fijación Biológica, sin embargo el comportamiento del tratamiento Selección mostró igualdad estadística en el 40 % de las variables estudiadas con respecto al tratamiento Fertilizado (diámetro de tallo, peso de semillas, peso de nódulos y SPAD), es decir que tal población tiene una alta relación simbiótica con las bacterias nativas del suelo como lo refleja la variable número de nódulos y que posiblemente es

necesario hacer más ciclos de selección para alcanzar mejores resultados.

El tratamiento Selección mostró resultados estadísticamente iguales al tratamiento Inoculado en todas las variables excepto en SPAD y peso de semillas, lo que indica que la selección mostró el mismo efecto que la inoculación lo que implicaría eliminar esa práctica con el consiguiente efecto reductivo en el costo de cultivo.

Matos y Zúñiga (2002) demostraron que la capacidad de nodulación en *Phaseolus lunatus* es 134 % superior y la fijación de nitrógeno es 25 % superior en el criollo que en la variedad mejorada, respectivamente, lo que confirma que el mejoramiento no se dirige a aumentar estas capacidades, además observaron variaciones en la infectividad y la efectividad de las cepas evaluadas sugiriendo que estas variaciones pueden ser a nivel de variedad e incluso de individuo.

Sprent (2001), ha demostrado que durante el proceso de multiplicación, las cepas pueden perder los genes simbióticos debido a que se encuentran localizadas en los plásmidos y no en los cromosomas.

Cuadro 2. Comparación de variables de cuatro tratamientos en frijol variedad Cacahuete 72

Variable	Selección	Fertilizado	Inoculado	Testigo	CV	DMS
Número de hojas	4.00 c	9.87 a	4.87 bc	5.62 b	18.51	1.15
Altura de la planta (cm)	37.52 b	45.72 a	41.42 ab	38.92 b	15.51	6.49
Diámetro de tallo (mm)	5.11 a	5.70 a	5.22 ab	4.93 b	10.90	0.58
Número de vainas	2.62 b	4.50 a	1.62 b	2.62 b	56.24	1.63
Peso de semillas (g)	4.43 a	6.21 a	3.32 b	3.80 b	43.41	1.79
SPAD	31.35 b	29.86 b	34.35 a	30.59 b	5.13	1.66
Número de nódulos	40.25 b	12.50 c	41.13 b	68.88 a	58.21	27.74
Peso de nódulos (mg)	176.7 a	26.5 a	300.3 a	231.2 a	146.6	275.78
Peso seco de follaje (g)	2.21 b	4.97 a	2.63 b	2.78 b	24.16	0.87
Peso seco de raíz (mg)	550.0 b	850.0 a	600.0 b	837.5 a	20.95	0.15

En las filas, letras iguales indican sin diferencia estadística ($p < 0.05$).

La información genética que se encuentra en plásmidos no es tan conservada como la que se encuentra en el cromosoma, sin embargo; también parece que en la medida en que se conserven las características fisiológicas de las fabáceas, se preservará también sus microsimbiontes siempre y cuando estas plantas no se cultiven en presencia de fertilizantes químicos, que inhiben el proceso simbiótico. Las fabáceas son cultivos clave en la agricultura sustentable ya que enriquecen al suelo de nitrógeno cuando presentan nódulos efectivos de nitrógeno.

No existe información de que en un programa de mejoramiento se hayan incluido las características de capacidad de nodulación, por lo tanto; en una población mejorada de plantas de la misma variedad existe alta variabilidad en cuanto a las características de nodulación y fijación de nitrógeno entre los individuos.

Pero, la identificación de genotipos eficientes ha sido un problema debido a la falta de métodos rápidos y económicos para seleccionarlos. Es fundamental emplear unidades de suelos con bajo N disponible, con el fin de que los genotipos expresen sus cualidades de fijación de N₂ mediante determinaciones sencillas tales como rendimiento de grano, acumulación total de biomasa o extracción total de N (Castellanos *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la selección de individuos realizada en condiciones de laboratorio incrementó la capacidad de nodulación de la población seleccionada en 189.63 %. Cuando las plantas seleccionadas se cultivaron en condiciones de invernadero, la capacidad de nodulación se incrementó en 74.02 %.

Se observó un incremento en las variables relacionadas a la disponibilidad de nitrógeno como efecto de la fijación biológica de nitrógeno.

En la comparación de los cuatro tratamientos se observaron respuestas diferentes entre variables. El tratamiento de fertilización química superó al resto de los tratamientos en la mayoría de las variables. Sin embargo el tratamiento Selección mostró igualdad estadística con el tratamiento químico en tres variables (diámetro de tallo, peso de semillas y SPAD) y lo superó en el número de nódulos.

El tratamiento Selección también mostró avance significativo en la respuesta promedio del frijol en las variables de diámetro de tallo y peso de semillas, con respecto al testigo.

LITERATURA CITADA

- Acosta, G. J. y P. Pérez H. 2001. Situación del cultivo de frijol común en México. Producción e Investigación. Programa de Frijol del INIFAP. Chapingo, Edo. de México. 9 pp.
- Atlas, R. M. y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana ambiental. Pearson educación, S.A., Madrid. 696 pp.
- Baca, B. E., Soto U. L. y M. P. Pardo R. 2000. Fijación Biológica del Nitrógeno. Universidad Autónoma de Puebla. *Elementos* 38 (7). Junio – agosto. 61 pp.
- Buendía-Clavería A.M., T. Cubo S. y F. Romero. 1991. Receptores de la planta y de la bacteria en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. pp.199-214. *in*: Megias M. G., Palomares A. J., F. Ruiz B. Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno atmosférico. Universidad de Sevilla, España. Gráficas, Minerva, S.A. España.
- Brauer, O. 1987. Fitogenética Aplicada. Ed. Limusa. Mexico. 518 pp.
- Castellanos, J. Z., Peña-Cabrales J.J., V. Badillo, A. Aguilar-S., Acosta G. J. A. y Rodríguez G. A. 1998. Características Agronómicas del frijol asociadas a la

- capacidad de fijación de N₂ en el centro de México. *Terra* 16 (4): 60 pp.
- Colín, M. S. 2005. Contenido de proteína en frijol común. VII Simposio Internacional y III Congreso Nacional de Agricultura Sostenible "La agricultura Sostenible, una obligación para un futuro mejor" C. D. Victoria, Tamaulipas, 16-18 de Noviembre.
- Cronquist, 1981. An Integrate system of classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, BRONX, New York, pp. 592-601.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. *J. Gen. Microbial.* 16, 376-381.
- López-Ortiz, C. 2011. Interacción simbiótica *Rhizobium* - Leguminosas arbóreas en sistemas contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 111 pp.
- Lloret, L., Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Latinoamericana de microbiología. Vol. 47, num. 1-2
- Madigan, M.T., Martinko M. y J. Parker. 2004. BROCK. Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson educación, S.A., Madrid. 1096 pp.
- Martínez-Romero, E., Palacios, R. & J. Mora. 1998. Cepas mejoradas de *Rhizobium*. Investigación y Ciencia, Edición en español de Scientific American, 265:14-19.
- Matos, G. & D. Zúñiga. 2002. Comportamiento de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de la costa del Perú en dos cultivares del pallar (*Phaseolus lunatus* L.). *Ecología aplicada* 1(001): 19-24.
- Megias, M. 1991. Una breve Introducción. pp 11-18. *in*: Megias M. G., Palomares A. J., F. Ruiz B. 1991. La Fijación Biológica del Nitrógeno Atmosférico: Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno atmosférico. Universidad de Sevilla, España. Gráficas, Minerva, S.A. España.
- Mora, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 6: 68-74.
- Ravelero, P. A. 2005. Fenología y rendimiento de variedades de frijol en diferentes fechas de siembra y condiciones de humedad. VII Simposio Internacional y III Congreso Nacional de Agricultura Sostenible "La agricultura Sostenible, una obligación para un futuro mejor" C. D. Victoria, Tamaulipas, 16-18 de Noviembre.
- Ranfla, C. R. R. 1979. Análisis de crecimiento y rendimiento en 8 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones óptimas de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. 46 pp.
- Salinas-Moreno, Y., L. Rojas-Herrera, E. Sosa-Montes, P. Pérez-Herrera. 2005. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia* 39: 385-394.
- Sevilla, M. E. 2008. Selección de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con alta capacidad de nodulación a cepas de *Rhizobium*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas. 54 pp.
- Segovia, L., P. W. Young y E. Martínez. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strain as *Rhizobium etli* sp. Nov. *int. J. Sys. Bacteriol.* 43: 374-377.
- Sprent, J. I. 2001. Nodulation in legumes. Ed. The Cromwell Press Ltd. Great Britain. 146 pp.