

## CAPACIDAD DE NODULACIÓN DE VARIEDADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) CON CEPAS DE *Rhizobium*

Epifanio Sevilla Morales<sup>1</sup>, Carlos Manuel Acosta-Durán<sup>2\*</sup>, Luz Maria Nava Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa CP 62209, Cuernavaca, Morelos, México. Correo-e: acosta\_duran@yahoo.com.mx

\* Autor para correspondencia.

---

### RESUMEN

Con el objetivo de analizar la variación de la nodulación dentro de variedades mejoradas de frijol, se realizó un experimento en el que se evaluaron en condiciones de invernadero y de laboratorio, nueve germoplasmas producidos por el INIFAP. Se aislaron cepas nativas que se purificaron y se utilizaron para dos inoculaciones cruzadas sucesivas en los germoplasmas evaluando la capacidad de nodulación, el porcentaje de plantas noduladas dentro de la variedad y el porcentaje de variedades noduladas por cada cepa. Los resultados mostraron que no todas las cepas tienen la capacidad de nodular a todos los individuos integrantes dentro de variedades de frijol, más bien existe especificidad parcial dentro de la variedad. Las cepas aisladas de la variedad Pimono 78 mostraron un comportamiento consistente sobre las demás cepas, con una gran cantidad de nódulos formados. La variedad Cacahuate 72, mostró una mayor

afinidad al generar nódulos con ocho cepas, respecto de las demás variedades de frijol, también generó gran cantidad de nódulos mostrando ser la variedad de mayor capacidad de respuesta con otras cepas de *Rhizobium*.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, nodulación, germoplasmas, *Rhizobium*.

### ABSTRACT

To analyze the nodulation capacity inside of improved cultivars of bean, an experiment in greenhouse and laboratory conditions was carried out to evaluate nine bean germoplasms produced by INIFAP. Wild strains of *Rhizobium* were isolated from bean cultivated in soil, strains were purified and used to make two cross and successive inoculations in bean germoplasms and nodulation capacity, percent of nodulated plants per cultivar and percent of nodulated cultivars per strain, were evaluated. Results show that no all *Rhizobium* strains can to nodulate to all members in a bean cultivar, instead there is a partial specificity inside

---

Recibido: 15/05/2008; Aceptado: 29/08/2008.

the cultivar. Stains isolated from Pimono 78 cultivar show a consistent behavior over the other strains, with a great quantity of nodules. Cacahuate 72 cultivar show the most affinity to generate nodules with eight different strains, in relation of the rest bean cultivars, a great number of nodules was observed too. Cacahuate 72 cultivar shows the best answer capacity with other *Rhizobium* strains.

**Key words:** *Phaseolus vulgaris*, nodulation, germoplasms, *Rhizobium*.

## INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más conocida y ampliamente cultivada en regiones templadas semitropicales. En México, el frijol como cultivo básico ocupa el segundo lugar de importancia después del maíz. Es una hierba anual, altamente polimórfica y sus flores se autopolinizan. No tiene un buen desarrollo en ambientes tropicales con índices altos de precipitación anual (Martínez, 1983). En la actualidad se conocen muchas variedades de frijol, sin embargo, existen factores que limitan la producción del cultivo, como lo son: la falta o el exceso de agua, plagas, enfermedades y tecnología ineficiente e inadecuada (Martínez-Romero, 1983).

La mayoría de las especies de leguminosas son capaces de fijar  $N_2$ , sin embargo, existen grandes diferencias entre especies en relación con esta habilidad. La producción agrícola basada en leguminosas es fundamental para la alimentación humana, especialmente si se considera en equilibrio con el ambiente. Por ello, la interacción natural de estas plantas con una bacteria del suelo a nivel de raíz, es ecológicamente importante, como medida para evitar el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que deterioran el suelo y contaminan el ambiente. El establecimiento de la simbiosis para atrapar el  $N_2$  entre *Rhizobium* y la leguminosa es un proceso

complejo, en donde la formación de nódulos y la fijación del  $N_2$  se dan en etapas sucesivas (Martínez-Romero, 1983). 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*. En México y en otros países de Centro y Sudamérica existe una diversidad enorme de cepas simbiotes de frijol (*P. vulgaris*) que es nativo de esta área (Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1991).

En el análisis de poblaciones de rhizobia en nódulos de frijol, provenientes de aislados de Mesoamérica se llegó a proponer que *R. etli* ha resultado ser muy buen inoculante (Segovia *et al.*, 1993). Se ha reportado también que algunas cepas de *R. etli* se encuentran naturalmente en las semillas de cinco de trece cultivares analizados. En los programas de mejoramiento genético en frijol se involucra una gran cantidad de variables agronómicas, de sanidad y de calidad comercial que sugieren la conveniencia de utilizar criterios rápidos y económicos para seleccionar genotipos eficientes en la fijación de  $N_2$  y que además contengan el resto de las variables de interés (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998).

La capacidad de fijar  $N_2$  es variable entre los genotipos de frijol, extendiéndose a partir de 4 a 59% de nitrógeno derivado de la atmósfera (Hardarson y Danso, 1993; Peña-Cabriales y Castellanos, 1993; y Peña-Cabriales *et al.*, 1993). Las respuestas de la cosecha a la inoculación con cepas seleccionadas de *Rhizobium* son frecuentemente bajas, debido a la alta capacidad competitiva de las cepas nativas.

Como proceso previo a la fijación de nitrógeno se produce la nodulación que como la fijación misma esta regulada por factores genéticos, por lo que también existe variación en las diferentes variedades comerciales de frijol con respecto a la capacidad de nodulación.

Esta condición también impacta en la competitividad de las cepas que se han propuesto como buenas fijadoras de nitrógeno. La identificación y selección de cepas de *Rhizobium* altamente competitivas en el proceso de nodulación, no asegura la eficiencia en la fijación de nitrógeno, pero si asegura la identificación cepa-planta lo que puede aumentar la eficiencia en el proceso de fijación de nitrógeno. Estas cepas podrían constituir inoculantes eficientes en la nodulación y en la fijación de nitrógeno, que hasta ahora no se han podido implementar como una práctica común en el cultivo de frijol en México.

Los trabajos que se realizan para mejoramiento genético de frijol, y de las bacterias del género *Rhizobium*, con el objetivo de incrementar la capacidad de fijación de nitrógeno, están restringidos a pruebas de laboratorio para la manipulación a nivel molecular, a la transgénesis y recombinación de plantas de frijol para conferirles mayor resistencia a las sequías, enfermedades, plagas o con la intención de mejorar inoculantes. En los programas de mejoramiento genético no se considera la capacidad de nodulación como un carácter a seleccionar, por lo que existe gran diversidad en esta característica dentro de las variedades mejoradas de frijol.

Encontrar variedades de frijol con alta capacidad de nodulación con diferentes cepas de rhizobios provenientes de variedades de frijol diferentes a su original y cepas de *Rhizobium* que puedan ser inoculadas en múltiples variedades de frijol, permitirá mejorar la generación de inoculantes más efectivos en el cultivo de frijol; esto, buscando mejorar la capacidad de nodulación de una forma natural en dichas variedades, lo que podría a su vez, mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno y por lo tanto el rendimiento del cultivo.

Debido a la variabilidad genética del frijol se produce una identificación selectiva de las cepas con las que puede establecer

una simbiosis, por lo tanto existen variedades de frijol que pueden identificarse con un gran número de cepas de *Rhizobium*, así mismo existen cepas de *Rhizobium* con la capacidad de nodular a un gran número de variedades de frijol. Por lo que se planteó como objetivo para el presente trabajo, seleccionar variedades de frijol con alta capacidad de nodulación a cepas de *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, en Cuernavaca Morelos.

**Material biológico.** Como poblaciones mejoradas de frijol, se utilizaron nueve variedades provenientes del banco de germoplasma del campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Zacatepec Morelos: Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuate 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM).

**Aislamiento de las cepas bacterianas de suelo.** Se utilizó suelo de tipo andosol sin esterilizar tomado de una parcela del campo experimental donde se habían realizado siembras de frijol, en los tres ciclos inmediatos anteriores.

Se utilizaron macetas de plástico de seis pulgadas, previamente llenadas con el suelo mencionado. Se sembraron dos semillas por maceta de cada una de las variedades de frijol, quedando sembradas cinco macetas de cada variedad. Fueron regadas cada tres días y no se les aplicó fertilizante ni agroquímicos.

A los 31 días después de la siembra (dds) se cosecharon las plantas, se

humedeció el cepellón en agua corriente para el desprendimiento de la tierra. Posteriormente se llevaron al laboratorio y se lavaron las raíces con agua corriente utilizando una coladera de plástico para evitar la pérdida de los nódulos.

Con pinzas de disección se separaron los nódulos de las raíces y se colocaron en cajas de petri de 10 cm de diámetro. Las cajas de petri con los nódulos aislados fueron rotuladas con las dos letras iniciales del nombre de la variedad de frijol y el número de la planta de la cual fueron separados.

**Aislamiento de las cepas bacterianas en laboratorio.** Se trabajó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar (Marca Veco). Para desinfectar los nódulos, se introdujeron en alcohol al 70% agitándose durante cuatro minutos, posteriormente se sumergieron hipoclorito de sodio al 20 % agitándose durante cuatro minutos y se lavaron con agua destilada estéril agitándose durante cinco minutos, cuatro veces.

Posteriormente se cortaron los nódulos con pinzas de disección y se sembró su contenido (de donde se obtuvieron las colonias bacterianas) en forma de zig-zag en cajas de petri con medio PY sólido (2.5 g de peptona, 1.5 g de extracto de levadura, 15 g de agar, 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.7 M en 500 ml de agua estéril). Las cajas de petri se colocaron en una incubadora (Marca Linderg/bluf) a 24 °C durante tres días para el crecimiento de las colonias.

Después de tres días de incubación (ddi), se seleccionaron las colonias bacterianas por sus características fenotípicas (colonias circulares, convexas, opacas y de dos a cuatro milímetros de diámetro) para sembrarlas nuevamente en cajas de petri con medio PY sólido con la técnica de plaqueo para abarcar mayor superficie de la caja y se incubaron a 24 °C durante tres días para su crecimiento,

después de los cuales se realizó una nueva resiembra tomando solo una colonia para generar colonias puras. Posteriormente a la incubación se colocaron en refrigeración a 4 °C durante 20 días.

**Siembra.** Se tomaron 25 semillas de cada una de las nueve variedades de frijol, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 20 % agitándose durante cuatro minutos. Después, se lavaron con agua destilada estéril agitándose durante cinco minutos, nuevamente se desinfectaron en alcohol al 70% agitándose durante cuatro minutos.

Por último, se lavaron con agua destilada estéril agitándose durante cinco minutos. Las semillas de cada variedad se sembraron en cajas de petri con medio sólido de agar (8 %). Se incubaron a 25 °C durante cinco días.

**Preparación de la solución nutritiva.** La solución nutritiva se preparó con tres soluciones madre:

Solución madre 1: 3.75 g de sulfato de Magnesio, 0.7 ml de ácido fosfórico, 2.35 g de cloruro de potasio y 9.4 g de cloruro de calcio, disueltos en 500 ml de agua destilada. Solución madre 2; 5.0 g de sulfato de hierro disuelto en 50 ml de agua destilada. Solución madre 3; 1.4 g de ácido bórico, 0.2 g de sulfato de zinc, 1 g de sulfato de Manganeso y 0.2 g de sulfato de cobre, disueltos en 50 ml de agua destilada. Se colocaron 10 ml de solución madre 1 y 0.1 ml de solución madre 2 y 3, en un litro de agua destilada; se ajustó el pH a 6.5 con hidróxido de sodio y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 minutos.

Se prepararon matraces Erlenmeyer (de 250 ml) con vermiculita hasta la marca de 100 ml y se agregaron 80 ml de solución nutritiva sin nitrógeno. Se esterizaron en autoclave durante 15 minutos, a 120 °C de temperatura y 15 libras de presión. Los matraces se cubrieron en la parte superior con papel aluminio para mantenerlos en condiciones estériles.

**Trasplante.** Una vez germinadas las semillas (5 dds) se tomaron con pinzas de disección y se colocaron en los matraces bajo condiciones de esterilidad. Se utilizaron dos matraces por variedad con una semilla cada uno, cada matraz se cubrió con papel aluminio y fueron rotulados con el nombre de cada variedad.

Una vez que las plantas superaron la altura del matraz, se sustituyó el papel aluminio por tapones de algodón estériles, de modo que el tallo de cada planta quedó libre para su desarrollo.

**Primera inoculación.** Se prepararon siete inóculos tomando con un asa, por separado, una porción de cada cepa bacteriana de las que se incubaron durante tres días previamente, y se colocaron en tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril.

Las siete cepas bacterianas, se inocularon manualmente con ayuda de una micropipeta en las nueve variedades de frijol, con 3 ml de esta solución, inoculando en la base del tallo de cada planta que se encontraba en el interior de los matraces, de este modo, se produjo el contacto de la bacteria con la raíz.

**Aislamiento de las cepas bacterianas incubadas en laboratorio.** A los 20 días después de la inoculación se cosecharon las plantas de los matraces y se reaislaron las colonias de los nódulos formados en éstas plantas en cajas de petri con medio sólido. Las cajas de petri con las cepas bacterianas fueron rotuladas con las dos letras iniciales del nombre de las variedades de frijol de las que provenían y el número de nódulos formados en cada planta. Se llevaron registros de la nodulación de cada cepa y de cada variedad por separado.

**Segunda inoculación.** La siguiente etapa del experimento consistió en repetir los pasos de germinación, trasplante e inoculación de las nueve variedades de frijol en condiciones estériles, recordando que ésta vez, los nódulos no se aislaron de

plantas que se desarrollaron en suelo, sino de plantas desarrolladas en condiciones de medio aséptico, por lo que se tuvo la seguridad de que las cepas aisladas correspondieron a *Rhizobium* y se utilizaron como inoculante en esta etapa.

La inoculación se realizó manualmente con ayuda de una micropipeta en forma cruzada entre las nueve variedades de frijol. Se seleccionaron las cepas que formaron un mayor número de nódulos en el experimento anterior. Se utilizaron dos matraces con una planta, cada uno por cada variedad. Se evaluó la nodulación entre cepa-variedad y entre variedad-cepa.

**Análisis de resultados.** El objetivo del presente trabajo, pretende demostrar la especificidad de individuos dentro de una población mejorada de frijol, con respecto a la capacidad de nodulación como fase previa a la fijación de nitrógeno, por lo que los datos se analizaron con la perspectiva de los métodos de mejoramiento genético para plantas autógamias como la selección individual y la hibridación. El sistema de pedigree consiste en llevar registros del comportamiento de individuos y no de poblaciones, generando líneas para la segregación de características que posteriormente se llevan a varias generaciones (más de seis), y de este modo fijar dichas características, manteniendo una presión de selección alta para eliminar la segregación al máximo y posteriormente liberarlas como variedades comerciales (Brauer, 1987).

En este trabajo se analizó el comportamiento de individuos cultivados bajo condiciones controladas para reducir las respuestas generadas por el medio ambiente de crecimiento y evaluar solo las respuestas de tipo genético de cada genotipo estudiado con el método de selección individual (Brauer, 1987).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Plantas en suelo.** El suelo utilizado se considera bajo en nitrógeno por lo que se esperaba que todas las variedades formaran nódulos en las raíces como lo indican varios autores (Schubert, 1986; Dénarié y Roche, 1992; Rocha y De las Peñas, 1990) sin embargo, de las nueve variedades sembradas en macetas con suelo de campo, solo nodularon cuatro: Bayo INIFAP (BA), Ara 18 (AR), Pimono 78 (PI) y Negro Morelos (NM) (Figura 1), lo que corresponde al 17.7 % de plantas noduladas con respecto al total. De los nódulos generados por las plantas, se aislaron siete colonias. Los nódulos de la maceta 1 de la variedad Bayo INIFAP, no generaron colonias. Las cepas se identificaron con las iniciales del nombre de la variedad y con el número de la planta de la que fueron obtenidas.

**Primera inoculación.** Las siete cepas aisladas se inocularon en forma cruzada con las nueve variedades de frijol sembradas en matraces en condiciones estériles (primera inoculación). A los 15 días después de la inoculación (ddi) se observó la formación de nódulos en algunas plantas. Las plantas se cosecharon a los 24 ddi y se observó la afinidad entre variedades y cepas (Figura 2). Se contó el número de nódulos por planta. La mayoría de las variedades de frijol no mostraron afinidad con otras cepas. Las variedades que mostraron una mayor afinidad por otras

cepas y que permitieron la formación de nódulos fueron: la variedad Pimono 78 (PI) con las siete cepas y la variedad Bayo INIFAP (BA) con cinco cepas, (PI-1, PI-3, NM-1, BA-3 y AR-4). Las cepas que mostraron una mayor afinidad con otras variedades de frijol fueron: PI-1 con siete variedades (Negro Morelos, Pimono 78, Ara 18, Azpa 103, Canario 72 y Bayo INIFAP) y la cepa PI-3 con cuatro variedades (Negro Morelos, Pimono 78, Azpa 103 y Bayo INIFAP). Las cepas que fueron inoculadas con sus mismas variedades nodularon, excepto la cepa AR-2 que no desarrolló nódulos con su misma variedad (Figura 2). Solamente en las variedades Azufrado Higuera (AH) y Canario 72 (CN) no hubo formación de nódulos; es decir, no mostraron afinidad por ninguna cepa.

En el cuadro 1, se muestra el número de nódulos que desarrolló cada planta de cada variedad. Se observaron diferencias en la cantidad de nódulos por planta variando en promedio desde 319.5 en la variedad Azpa 103 hasta cero en las variedades Azufrado Higuera y Canario 72. El porcentaje de plantas noduladas fue de 21.4. La variedad que más plantas noduladas presentó fue la Pimono 78 con el 64.2 %. Las variedades Azufrado Higuera y Canario 72 no desarrollaron nódulos en ninguna de las plantas (Cuadro 1). El porcentaje general de plantas noduladas fue de 21.42 lo que superó en 21.0 % al porcentaje de las plantas en suelo.

Número de maceta.	Variedad de frijol								
	NM	PI	AR	AZ	AH	CA	CN	BA	FM
1	+	+						+	
2			+						
3		+						+	
4			+		+				
5									

Figura 1. Nodulación de variedades de frijol, en macetas con suelo sin esterilizar. (Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuate 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM); (+) planta con nódulos).

Cepa	Variedad.								
	NM	PI	AR	AZ	AH	CA	CN	BA	FM
PI-1	+	+	+	+		+		+	+
PI-3	+	+		+				+	
NM-1		+	+					+	
BA-3		+	+					+	
AR-4		+	+					+	
AR-2		+							
AR-4		+							

Figura 2. Interacción de nodulación-variedad de frijol.

(Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuete 72 (CA), Canarias 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM); (+) planta con nódulos)

**Segunda inoculación.** De los resultados obtenidos a partir de la primera inoculación con las siete cepas en las diferentes variedades de frijol, se seleccionaron y aislaron las cepas más infectivas, es decir, las de las plantas que generaron la mayor cantidad de nódulos en condiciones de esterilidad; plantas cuyos nódulos no estuvieron en condiciones de suelo, con el fin de seleccionar, para la segunda inoculación, a las cepas que tendrían mayor capacidad de nodulación para el siguiente experimento, además de asegurar que las cepas para la inoculación eran cepas de *Rhizobium*. Se seleccionaron doce plantas de las que se aislaron nueve cepas que se identificaron colocándoles entre paréntesis el número de nódulos que desarrolló la planta de la cual fueron tomados. Los nódulos que se seleccionaron fueron: Dos cepas de Pimono 78 [PI-1(200) y PI-3(439)]; tres cepas de Ara 18 [ARA-4(173), AR-4(280), AR-4(280)]; una cepa de Negro Morelos [NM-1(192)] y tres cepas de Bayo INIFAP [BA-3(171), BA-3(172) y BA-3(194)] (Cuadro 2).

Con las cepas seleccionadas se realizaron las inoculaciones cruzadas y en el cuadro 2 se presentan los resultados de

la segunda inoculación de las nueve cepas bacterianas extraídas de las plantas que crecieron en matraces, la nodulación comenzó a manifestarse a los 21 días después de la inoculación (ddi) y a los 30 ddi se hizo el conteo de los nódulos formados en cada variedad. Nuevamente se observaron diferencias en la cantidad de nódulos por planta variando en promedio desde 518.0 en la variedad Azpa 103 hasta 55.0 en la variedad Azufrado Higuera. El porcentaje de plantas noduladas fue de 29.62. La variedad que más plantas noduladas presentó fue la Cacahuete 72 con 61.1 % y la variedad Ara 18 fue la de menor porcentaje de plantas noduladas con 11.1 (Cuadro 2).

En la inoculación de la cepa BA-3(171), con las nueve variedades, solamente hubo nodulación con las variedades, Azufrado Higuera y Cacahuete 72, presentando de esta manera poca afinidad. Se obtuvieron dos plantas con 5 y 13 nódulos de la variedad Azufrado Higuera y 131 nódulos en la variedad Cacahuete 72. Esta cepa fue inoculada con su misma variedad (Bayo INIFAP) y no produjo nódulos esta vez con su misma variedad.

Cuadro 1. Número de nódulos por variedad y por planta en la primera inoculación de plantas de frijol crecidas en condiciones de laboratorio.

Cepa	Variedad.																			
	NM		PI		AR		AZ		AH		CA		CN		BA		FM			
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
PI-1	122		158	141	76		200				143				36		84			
PI-3	86		274	150			439								12					
NM-1			163		45	192									125					
BA-3			28		194	172									171					
AR-4			280		173	280									213					
AR-2			9																	
AH-4			7																	

Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuete 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM); M1 (Matraz uno); M2 (Matraz dos).

Cuadro 2. Número de nódulos por variedad y por planta en la segunda inoculación de plantas de frijol crecidas en condiciones de laboratorio.

Cepa.	Variedad.																			
	NM		PI		AR		AZ		AH		CA		CN		BA		FM			
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
BA-3 (171)									5	13	131									
BA-3 (172)		18				17			3	13	107	94	128	5	16	11				
AR-4 (173)												1								
NM-1 (192)									11	1										
BA-3 (194)	209	92	420	248			510				202	364			118	53				
PI-1 (200)			1						2	376							277	91		
AR-4 (280)				26							179				153					
PI-3 (439)	172	139	284	274	217		526		392	125	106	316			409	227				
AR-4 (280)								1		170								196		

Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuete 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM); M1 (Matraz uno); M2 (Matraz dos).

La cepa BA-3(172), presenta un comportamiento más positivo, pues se presentó la nodulación en seis variedades diferentes (Negro Morelos, Ara 18, Azufrado Higuera, Cacahuete 72, Canario 72 y Bayo INIFAP), aunque el número de nódulos no

fue tan alto. Se observa también (cuadro 2) que la cepa AR-4(173), tuvo un comportamiento negativo, de las nueve variedades de frijol, sólo se obtuvo un nódulo con la variedad Cacahuete 72. Esta



cepa fue inoculada con su misma variedad (Ara 18) y no produjo nódulos.

En la cepa NM-1(192), la formación de nódulos sólo se presentó en la variedad Azufrado Higuera (AH) con un muy bajo número de nódulos.

La cepa BA-3 (194) presentó formación de nódulos en 5 variedades (Negro Morelos, Pimono 78, Azpa 103, Cacahuate 72 y Bayo INIFAP) con un alto número de nódulos en la mayoría de las plantas. Esta cepa fue inoculada con su misma variedad (Ara 18) y no produjo nódulos.

De la cepa PI-1(200) que se esperaba una mayor nodulación, mostró un comportamiento irregular al presentar nodulación en sólo cuatro variedades (Pimono 78, Azufrado Higuera, Cacahuate 72 y Flor de Mayo), con un alto porcentaje en el número de nódulos pero en algunas variedades más que en otras.

La cepa AR-4 (280) mostró un comportamiento contradictorio ya que sólo tres variedades (Pimono 78, Cacahuate 72 y Bayo INIFAP), lograron formar nódulos, un buen porcentaje en las dos últimas variedades.

Se observa en el cuadro 2, que la cepa PI-3 (439), presenta un alto porcentaje de infectividad al presentar nodulación en ocho variedades de las nueve con que se ha trabajado incluso con su misma variedad y con un alto número de nódulos. No se presentó nodulación en la variedad Flor de Mayo. Esta cepa fue inoculada con su misma variedad (Pimono 78) y si noduló. La cepa AR-4 (280), también tuvo un bajo porcentaje de infectividad al presentar nodulación en sólo tres variedades (Azpa 103, Cacahuate 72 y Flor de Mayo).

En general, si se compara el número de nódulos obtenidos con estas cepas respecto a cada una de las inoculaciones, existe mayor cantidad en la producción de

nódulos variando el promedio general de número de nódulos por planta en 5 % entre la primera y segunda inoculaciones. El porcentaje general de infectividad fue de 34.9, 21.4 y 29.6 en las plantas crecidas en suelo, en la primera y segunda inoculación respectivamente. La infectividad considerada como el porcentaje de plantas noduladas fue de 29.6 en la segunda inoculación lo que representa incrementos del 38.3 % con respecto a la primera inoculación, aunque se observó mucha variación en la infectividad dentro de cada una de las cepas. Las cepas más infectivas fueron, la cepa PI-3 (439) con un promedio de 265.68 nódulos por planta en ocho variedades y la cepa BA-3 (194) con un promedio de 246.22 nódulos por planta en cinco variedades. Por otro lado la variedad BA-3 (172) presentó bajo promedio de nódulos por planta (41.20) pero en seis variedades (Cuadro 2). Las variaciones en el número de nódulos no es consistente en las variedades y en las cepas debidas posiblemente a que la selectividad de las cepas no es tan estricta como señalan varios autores (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996), además de la cantidad de flavonoides que las variedades de frijol segregan en el suelo para la identificación de cepas de *Rhizobium*, y depende de la variación genética que existe entre variedades y entre los individuos dentro de las variedades, por ejemplo, una bacteria puede nodular a muchos géneros de plantas como es el caso de *R. tropici* (Perret *et al.*, 2000).

Las variedades que mostraron mayor infectividad y que permitieron la formación de nódulos con las distintas cepas fueron la Cacahuate 72 que noduló con ocho cepas, con un promedio de número de nódulos por planta de 168.6, con un promedio de plantas noduladas de 61.11 y la Azufrado Higuera que noduló con cinco cepas, con promedio de número de nódulos por planta de 55.0 y con porcentaje de plantas noduladas de 44.4 (Figura 3). La variedad Azpa 103 presentó el promedio

más alto de número de nódulos con 518 aunque solo noduló con dos cepas.

Aunque se espera que una cepa mantenga su comportamiento en inoculaciones sucesivas, en este trabajo no se observó el mismo efecto en las dos inoculaciones. En la primera, la variedad con más plantas noduladas fue la Pimono 78, misma que redujo su porcentaje de plantas noduladas en 48 % en la segunda inoculación. Por otro lado la variedad Cacahuate 72 fue la del mayor porcentaje de plantas noduladas en la segunda inoculación (61.1 %) pero en la primera inoculación solo había alcanzado 7.1 % de plantas noduladas (Figura 4). Similar comportamiento se observó en el resto de las cepas. La cepa PI-1 que había infectado a siete variedades en la primera inoculación solo infectó a cuatro variedades en la segunda inoculación, en cambio la cepa PI-3 que solo había infectado a cuatro variedades en la primera inoculación, infectó a ocho variedades en la segunda inoculación.

La inconsistencia de la nodulación de las variedades y de las cepas parece demostrar que existen diferencias de la capacidad de nodulación de cada individuo dentro de la variedad, como consecuencia de la variación genética que se ha mantenido libre (en relación a la característica de nodulación), durante el proceso de mejoramiento genético de cada variedad. No hay referencias respecto al número de variedades infectadas en inoculaciones sucesivas, pero, Hernández-Lucas *et al.* (1995), compararon la nodulación producida por 7 cepas en 12 géneros de leguminosas, resultando entre el 13.6 y 27.7% de plantas que no nodularon según el género. Los 17 géneros que si nodularon, lo hicieron de manera inconsistente, observándose marcada diferencia entre individuos dentro del género y posiblemente esta variación entre géneros tenga un comportamiento similar entre variedades, lo que pudiera explicar las variaciones en este trabajo.

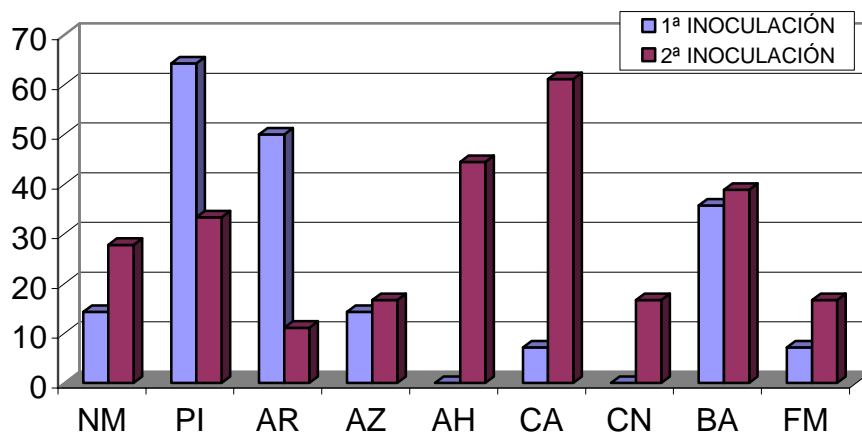


Figura 3. Porcentaje de plantas noduladas de nueve variedades de frijol en dos inoculaciones con cepas de *Rhizobium* en condiciones de laboratorio. (Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuate 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM)

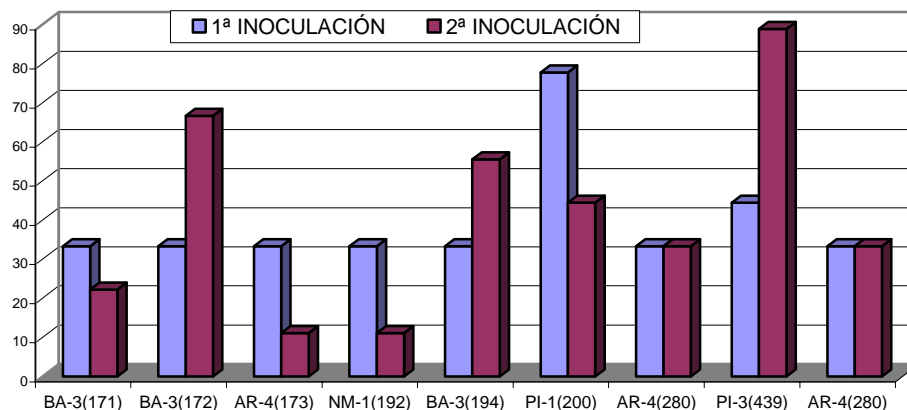


Figura 4. Porcentaje de variedades de frijol infectadas en dos inoculaciones con cepas de *Rhizobium* en condiciones de laboratorio.

Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuete 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM)

En cuanto al número de nódulos también se observaron variaciones importantes entre las dos inoculaciones. En ocho de las nueve variedades se incrementó el promedio del número de nódulos (Figura 5). Solo en la variedad Ara 18 decreció el promedio de número de nódulos. Estos incrementos se debieron a que en la segunda inoculación se utilizaron colonias puras que fueron seleccionadas por su alta capacidad de nodulación, además de que las cepas se aislaron de nódulos de plantas crecidas en condiciones estériles lo que asegura la ausencia de contaminantes dentro de los nódulos.

Estas variaciones indican que la asociación de la bacteria con la variedad de frijol, esta influenciada por otros factores, además de la selectividad entre ambos. La simbiosis esta 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. Las variedades comerciales actuales han sido seleccionadas por características de productividad, resistencia, adaptación y de calidad del grano, pero no existe

información de que en un programa de mejoramiento se hayan incluido las características de capacidad de nodulación, por lo que es razonable pensar que en una población de plantas de la misma variedad exista alta variabilidad en cuanto a estas características entre los individuos. Al respecto Castellanos *et al.* (1998) evaluaron 68 genotipos de frijol concluyendo que es indudable que existe variabilidad genética con relación a la eficiencia de fijación de N<sub>2</sub>; sin embargo, la identificación de genotipos eficientes ha sido un problema debido a la falta de métodos rápidos y económicos para seleccionarlos, por lo que sugieren que es fundamental emplear suelos con bajo N disponible, con el fin de que los genotipos expresen sus cualidades de fijación de N<sub>2</sub> mediante determinaciones sencillas tales como rendimiento de grano, acumulación total de biomasa o extracción total de N. En otros estudios Castellanos *et al.*, (1995) analizaron una gran cantidad de ensayos para reconocer cepas eficientes de *Rhizobium etli* y *R. tropici*, e indicaron que muchos ensayos no han sido exitosos debido a una inadecuada selección del sitio experimental en términos del alto N disponible en el suelo. Lo que indica que la variación genética tiene una influencia determinante en la manifestación de la fijación de nitrógeno, que necesariamente

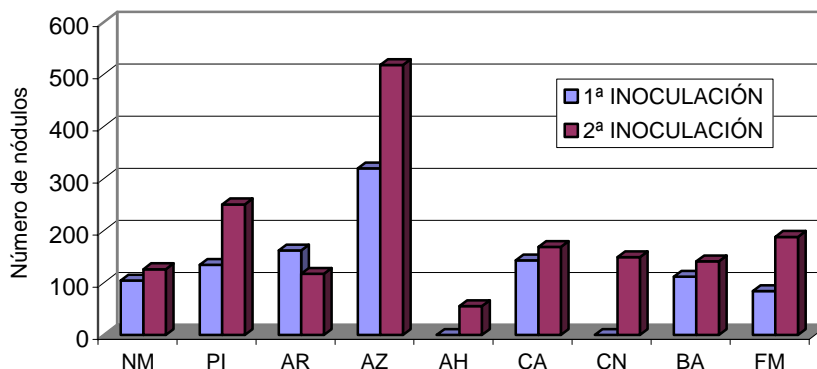


Figura 5. Promedio de nódulos de nueve variedades de frijol infectadas en dos inoculaciones con cepas de *Rhizobium* en condiciones de laboratorio. Negro Morelos (NM), Pimono 78 (PI), Ara 18 (AR), Azpa 103 (AZ), Azufrado Higuera (AH), Cacahuate 72 (CA), Canario 72 (CN), Bayo INIFAP (BA) y Flor de Mayo (FM)

tiene que ser precedida por la formación de nódulos. En los estudios mencionados no se analizó la nodulación de las plantas por lo que queda en duda si la causa de la baja fijación de N es debida a la baja infectividad o a la baja efectividad.

Por otro lado, para el desarrollo y la liberación de la Variedad Flor de mayo "Anita" se consideraron solo cinco características genéticas (Floración, madurez, rendimiento, sanidad y calidad culinaria), la variación genética de las otras características no se controló y se seleccionaron individuos que pueden tener o no las características no evaluadas, como en el caso de la nodulación y de la fijación de nitrógeno (Castellanos-Ramos *et al.*, 2003).

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.

Estas observaciones nos indican que al no considerarse la nodulación en un programa de mejoramiento, existen plantas dentro de la población misma, de la variedad, que conservan la característica genética de nodulación, pero existen plantas dentro de la misma población, tal vez en alto porcentaje, que la pierden en el proceso de selección para la respuesta a fertilización química, pues ya se ha demostrado que existe una relación inversa entre la capacidad de nodulación y la respuesta a fertilizantes químicos. No existe información sobre la variación de la capacidad de nodulación entre individuos dentro de una variedad, pero otros estudios han demostrado su existencia, como en el caso de Salinas-Moreno *et al.* (2005) quienes demostraron que existe variación entre individuos dentro de la variedad, en el contenido de antocianinas de 15 genotipos de frijol negro.

Por otro lado, las cepas aisladas de *Rhizobium* tienen la posibilidad de perder los genes de nodulación, que como se sabe son los que inician el proceso una vez que la bacteria ha detectado los flavonoides

secretados por la raíz de la planta (Schlaman *et al.*, 1998). Se 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 y como es sabido, la información genética que se encuentra en plásmidos no es tan conservada como la que se encuentra en el cromosoma (Sprent, 2001; Matos y Zúñiga, 2003).

Por lo anterior y bajo las condiciones de las variedades actuales sería difícil que existan variedades que sean altamente noduladoras con diferentes cepas de *Rhizobium*, por lo que sería recomendable incluir en los programas de mejoramiento genético características de nodulación y de fijación de nitrógeno, porque de esta forma se generarían variedades menos dependientes de los fertilizantes químicos y con más posibilidades de aumentar el rendimiento en la agricultura orgánica.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran que existe cierta afinidad dentro de las cepas aisladas de diferentes variedades de frijol con un porcentaje positivo en cuanto a la capacidad de nodulación, por lo que se concluye que no todas las cepas tienen la capacidad de nodular a todos los individuos integrantes dentro de variedades de frijol, más bien existe especificidad parcial dentro de la variedad.

La variación individual dentro de cada variedad mostró un comportamiento similar en todas las variedades evaluadas.

Las cepas aisladas de la variedad Pimono 78 mostraron un comportamiento consistente sobre las demás cepas, pues mostraron una mejor afinidad con las otras variedades de frijol con una gran cantidad de nódulos formados.

La variedad Cacahuate 72, mostró

una mayor afinidad con ocho cepas respecto de las demás variedades de frijol. También hubo gran cantidad de nódulos producidos mostrando ser la variedad de mayor capacidad de respuesta con otras cepas.

## LITERATURA CITADA

Brauer, O. 1987. Fitogenética aplicada. Ed Limusa, México. 518 pp.

Castellanos-Ramos, J. Z., H. Guzmán M., J.J. Muñoz-Ramos, J. A. Acosta-Gallegos. 2003. Flor de Mayo Anita, nueva variedad de frijol para la región central de México. Revista Fitotecnia Mexicana 26 (3): 209 - 211.

Castellanos, J. Z., J. J. Peña-Cabriales e I. Rojas. 1995. Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas elite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. Turrialba 45(1-2): 89-99.

Castellanos, J.Z., J.J. Peña-Cabriales, V. Badillo, A. Aguilar-Santelises, J.A. Acosta-Gallegos, A. Rodríguez-Guillén. 1998. Características agronómicas del frijol asociadas a la capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en el centro de México. Terra 16(4): 351-357.

Denarié, J. y P. Roche. 1992. *Rhizobium* nodulation signals. En: Molecular signals in plant Microbe Communications. Ed. Desh Pal S. Verma. C. R. P. Press. USA. 295-340.

Hardarson G. y S.K.A. Danso. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant Soil 152: 19-23.

Hernandez-Lucas, I., L. Segovia, E. Martínez-Romero y S. G. Pueppke. 1995. Phylogenetic Relationships and Host Range of *Rhizobium* spp. That Nodulate *Phaseolus vulgaris* L. Appl. Environ. Microbiol. 61:2775-2779.

- Martínez-Romero, E. 1983. Limitantes para la investigación sobre fijación biológica del nitrógeno a la agricultura. Tesis de Maestría en investigación Biomédica Básica. CCH, UACPyP, UNAM.
- Martínez-Romero, E. y J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. Crit. Rev. Plant. Sci. 15:113-140.
- Matos, C., G. y D. Zúñiga D. 2002. Comportamiento de cepas nativas de rizobios aisladas de la costa de Perú en dos cultivares de pallar (*Phaseolus lunatus* L.). Ecología aplicada 1(1): 19-24.
- Matos, C. G. y D. Zúñiga D. 2003. Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. Ecología aplicada 2(1): 81-85.
- Peña-Cabriales J. J., and Castellanos J. Z., 1993. Effect of water stress on N<sub>2</sub> fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil 152 : 151-155.
- Peña-Cabriales J. J., Grajeda-Cabrera O. A., Kola V. and Hardarson G. 1993. Time course and N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Soil 152 : 115-121.
- Pérez-Ramírez, N. O., M. A. Rogel, E. Wang, J. Z. Castellanos y E. Martínez-Romero. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiol. Ecol. 26:180-201.
- Perret, X., C. Staehelina y N. Broughton. 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. Microbiol and Mol. Biol. Rev. 64:180-201.
- Piñero, D., E. Martínez y R. K. Selander. 1988. Genetic Diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2825 - 2832.
- Rocha, S. M. y N. A. de las Peñas. 1990. La fijación del nitrógeno. ICYT CONACyT, México, D. F. 12:78-82.
- 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.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A., & Kondorosi, E. 1998. In: Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J. (eds). The *Rhizobiaceae* – Molecular Biology of the Model Plant-Associated Bacteria, pp. 361-386. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios y E. Martínez. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57:426-433.
- 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.
- Shubert, K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. 37:539-574.
- Sprent, J. I. 2001. Nodulation in legumes. Ed. The Cromwell Press Ltd. Great Britain. 146 pp.