

## Efecto de aislados de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos y la fijación de nitrógeno en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

### *Rhizobium* isolated effect on phenotypic parameters and nitrogen fixation in common bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.)

Klever Iván Granda Mora<sup>1</sup>, Ariany Colás Sánchez<sup>2</sup>, Yenisey Gutiérrez Sánchez<sup>3</sup>, René Cupull Santana<sup>2</sup>, Yelenys Alvarado Capó<sup>4</sup> y Roldán Torres Gutiérrez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja. Ciudadela Guillermo Falconi. "La Argelia" - PBX: 072547252 - Casilla Letra "S", Loja, Ecuador. CP 110150.

<sup>2</sup>. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Cuba. CP 54830.

<sup>3</sup>. Departamento de Contaminación microbiana. Instituto Nacional de Viandas Tropicales. Carretera Central km 33. Santo Domingo. Cuba.

<sup>4</sup>. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5, Santa Clara, Cuba. CP 54830.

E-mail: roldan.torres@unl.edu.ec; arianycs@uclv.edu.cu; contam.biotec@inivit.cu; yelenys@ibp.co.cu

---

**RESUMEN.** El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar el efecto de aislados de *Rhizobium* previamente caracterizados e identificados genéticamente sobre los parámetros morfológicos, fisiológicos y la fijación de nitrógeno de genotipos de frijol común. El análisis fenotípico de los aislados se condujo en condiciones controladas, evaluándose los parámetros de nodulación, morfológicos, fisiológicos y la fijación de nitrógeno de los genotipos ICA Pijao y BAT-304 de frijol común. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas aisladas de *Rhizobium* tienen habilidad para formar una cantidad abundante de nódulos en las raíces de las plantas de frijol de los genotipos analizados. Se destacó el efecto beneficioso de la especie *R. etli* y los aislados procedentes de Santa Clara y Camajuaní-1, así como el aislado *R. pisi* de Camajuaní-2. La variabilidad genotípica demostró la estrecha correlación positiva entre esas cepas y el genotipo BAT-304 en comparación con ICA Pijao.

**Palabras clave:** *Rhizobium*, caracterización fenotípica, frijol común, aislados.

**ABSTRACT.** The present work was carried out with the aim to determine the effect of *Rhizobium* isolates previously characterized and genetically identified on morphological and physiological parameters and the nitrogen fixation of common bean genotypes. The phenotypic analysis of isolates carried out under controlled conditions, where the nodulation, morphological and physiological parameters and the nitrogen fixation of the genotypes ICA Pijao and BAT-304 were evaluated. The results showed that the isolated strains have the ability for abundant nodule formation in roots plant of both genotypes analyzed. The remarkable beneficial effect was for *R. etli* specie and the isolates from Santa Clara and Camajuaní-1, as well as the isolated of *R. pisi* from Camajuaní-2. The genotypic variability showed the close positive correlation among these strains and the genotype BAT-304 compared with ICA Pijao.

**Keywords:** *Rhizobium*, phenotypic characterization, common bean, isolates.

---

## INTRODUCCIÓN

Dentro de las plantas leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) presenta singular importancia por el aporte de altas cantidades de proteínas, carbohidratos y minerales (Quintero, 2000), el mayor

aporte de proteínas viene dado por la habilidad que tiene este cultivo de establecer relaciones simbióticas con bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium* (Broughton *et al.*, 2003).

El mayor beneficio de la interacción *Rhizobium*-leguminosa está estrechamente ligado a la disminución de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y a la salud de las plantas, lo cual trae como resultado el incremento de los rendimientos agrícolas (Giller, 2001). Estos sistemas simbióticos aportan la mayor fuente de nitrógeno (N) a los agroecosistemas, incorporando como promedio un 80 % de los requerimientos de N mediante la fijación simbiótica del N (Graham y Vance, 2000). Sin embargo, los cultivos de leguminosas son muy variables en cuanto a su eficiencia para fijar dinitrógeno ( $N_2$ ) atmosférico, especialmente el cultivo del frijol común, el cual se considera por varios autores como ineficiente en este proceso, alcanzando niveles del 40 % del N derivado de la atmósfera (Remans *et al.*, 2007, Torres-Gutiérrez, 2008).

Torres-Gutiérrez *et al.* (2009) y Granda-Mora *et al.* (2009) reportan la abundancia de cepas nativas del género *Rhizobium* en los suelos de la región central de Cuba, aisladas de nódulos de frijol común, e identificadas mediante métodos moleculares (16S rRNA). Estos autores identificaron varias especies, tales como: *Rhizobium* sp., *R. tropici*, *R. etli*, *R. rizogenes* y *R. pisi*, sin embargo, los estudios del efecto de estas cepas en genotipos de frijol común, ya sea para evaluar su incidencia sobre parámetros morfológicos, fisiológicos o el rendimiento agrícola de este cultivo, no se han llevado a cabo, es esa razón esta investigación tiene como objetivos dilucidar el efecto de cepas de *Rhizobium* sobre parámetros morfológicos y la fijación de N en los genotipos contrastantes de frijol común BAT-304 e ICA Pijao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias y el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, donde se realizaron ensayos con los genotipos contrastantes BAT-304 e ICA Pijao.

Las cepas bacterianas utilizadas en el ensayo fueron aquellas caracterizadas morfológicamente e identificadas genéticamente por Torres-Gutiérrez *et al.* (2009), las cuales se muestran en la tabla 1.

### Preparación del inoculó, montaje del experimento e inoculación

Todas las cepas utilizadas se sembraron en medio Fred sólido (Manitol 10 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g; NaCl 0,1 g;  $CaCO_3$  0,5 g;  $K_2HPO_4$  0,5 g; Extracto de levadura 0,5 g; Agar 15 g; esto para 1 L) durante 72 h e incubadas a 30 °C. Para la preparación del preinoculó se dispuso de 10 ml de medio Fred modificado y se ajustó el pH a 7 añadiendo HCl. En este medio se sembraron las cepas previamente crecidas. Los tubos se incubaron a 30 °C durante 24 h en incubadora zaranda (Gerhardt, THO-500, Alemania) para contar con título mínimo de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup>. Al cabo del tiempo establecido se inoculó el cultivo de cada cepa en 500 ml de medio Fred modificado para obtenerse el inoculó final, el cual se incubó a 30 °C durante 24 h en la incubadora.

Luego del tiempo necesario para el crecimiento de las bacterias se realizó el conteo de las células viables en cada una de los aislados. Todas las cepas contaron con títulos

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el ensayo en condiciones controladas

Identificador	Identificación genética	Zona de aislamiento
R-40979	<i>Rhizobium pisi</i>	Cifuentes - Villa Clara
R-40980	<i>Rhizobium pisi</i>	Lajas – Cienfuegos
R-40981	<i>Rhizobium etli</i>	Carretera de Maleza - Villa Clara
R-40982	<i>Rhizobium pisi</i>	Sagua la Grande - Villa Clara
R-40983	<i>Rhizobium pisi</i>	Camajuaní-1 - Villa Clara
R-43451	<i>Rhizobium etli</i>	Camajuaní-2 - Villa Clara
CNPAF-512*	<i>Rhizobium etli</i>	Cepa tipo

\*cepa tipo procedente del Centro de Genética de Plantas y Microorganismos, Universidad Católica de Leuven, Bélgica

de  $10^9$  o  $10^{10}$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  para la realización de la inoculación de las semillas.

En la fase de adaptación del IBP se realizó el ensayo, para el cual se dispuso de un diseño experimental totalmente aleatorizado con 10 réplicas por cada cepa objeto de análisis, además de un tratamiento control con la inoculación de la cepa tipo CNPAF-512 y un control sin inoculación de bacterias. Se depositaron dos bandejas de poliespuma de 96 hoyos, aunque solo se utilizaron para cada variedad un total de 80 hoyos, en los cuales se añadieron 200 g de zeolita inactiva como sustrato para el crecimiento de las plantas. En cada hoyo se sembraron las semillas de las variedades ICA Pijao y BAT-304, las que se inocularon con 1 ml de inóculo de cada cepa en el momento de la siembra. A las semillas del tratamiento control sin inoculación se les añadió 1 ml de agua.

### Condiciones de crecimiento y evaluaciones

Las bandejas de poliespuma sembradas e inoculadas se colocaron en la cámara 5 de la casa de cultivo 1 del IBP, donde existía adecuada iluminación y se mantuvo el riego manual diario para evitar la desecación de la zeolita.

A los 21 días después de la siembra (DDS) se analizaron los parámetros morfológicos y fisiológicos de la nodulación: número de nódulos totales (NN) y peso fresco y seco de los nódulos (PFN, PSN en gramos) (FAO, 1995); además del contenido de biomasa de la raíz y el follaje: peso fresco y seco de la raíz (PFR, PSR) y el peso fresco y seco del follaje (PFF, PSF en gramos). Para los análisis se cosecharon todas las plantas, por lo que se dispuso de 10 muestras por cada tratamiento. El análisis de la biomasa se realizó en balanza (Explorer Pro, EP64, Suiza).

Luego del análisis del contenido de materia seca mediante el secado de la parte aérea de las plantas, se precedió determinar la fijación de N para cada tratamiento tomando dos réplicas como muestra. Este parámetro se realizó mediante el porcentaje de N total (% N total). Para esta determinación se utilizó el método Kjeldahl (1980), El cálculo del % N total se efectúa por la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{Vm - VB}{PM} * 0,14$$

Donde:

% N= porcentaje de N total de la muestra

Vm= volumen de la muestra

VB= volumen del blanco ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  sin muestra)

PM= peso de la muestra

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizándose el paquete STATGRAPHIC® Plus ver. 5.0 sobre Windows. Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, los genotipos o la interacción de estos factores en los parámetros de nodulación y la biomasa de las plantas, se realizó un análisis de varianza multifactorial (*Multifactor ANOVA*), donde se determinó el grado de independencia de los tratamientos y las variedades, realizándose la prueba paramétrica Bonferroni con nivel de significación  $p < 0,05$ .

Para correlacionar los parámetros de nodulación y la biomasa de las plantas se realizó un análisis de regresión lineal mediante coeficiente de correlación de Pearson (*Pearson Linear Correlation*) teniendo niveles de significación  $0,01 < p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de los parámetros de nodulación, referente al número de nódulos totales, el peso fresco, el peso seco de nódulos (g) por cada genotipo analizado y la comparación entre los genotipos en las diferentes variables evaluadas.

Como se observa en las figuras, todas las cepas aisladas fueron capaces de nodular las raíces de BAT-304 e ICA Pijao indicando la compatibilidad en la interacción micro y macrosimbionte. Para el genotipo ICA Pijao (figura 1-A) se observan como mejores tratamientos la inoculación de los aislados procedentes de Santa Clara-Maleza y Sagua respectivamente (*R. etli* y *R. pisi*), los cuales defirieron significativamente con los de menores valores en la nodulación, los que correspondieron a la inoculación con *R. pisi* aislado de Camajuaní-2 y el control.

Para el genotipo BAT-304 (figura 1-B) se observaron mayores números de cepas que lograron estimular la nodulación que para ICA Pijao. En este genotipo la inoculación con las cepas aisladas de Santa Clara-Maleza (*R. etli*), Cienfuegos (*R. pisi*), Camajuaní-1 (*R. etli*) y la cepa tipo CNPAF- 512 (*R. etli*) fueron los tratamientos de mejores resultados estadísticos, al diferir significativamente con el control. Se destaca que la diferencia de nódulos entre los tratamientos *R. etli*-Santa Clara-Maleza y el control asciende a 61,7 %, lo que evidencia la superioridad de la cepa en este genotipo.

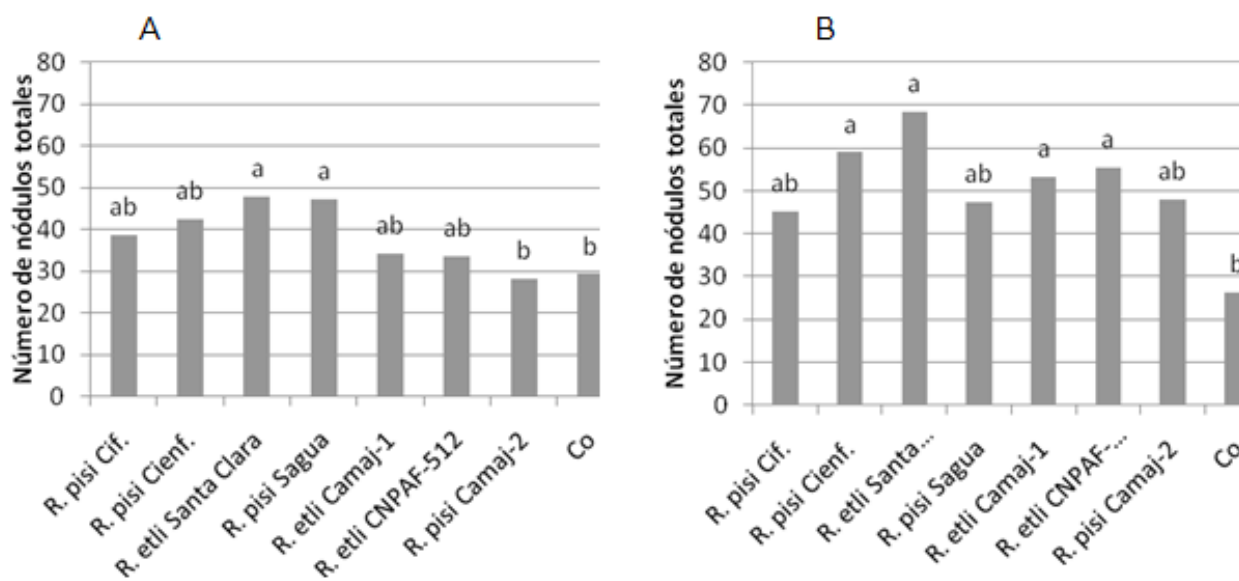


Figura 1. Total de nódulos por genotipos. A: número de nódulos para ICA Pijao. B: número de nódulos para BAT-304

Tratamientos: *R. pisi*-Cifuentes, *R. pisi*- Cienfuegos, *R. etli*-Santa Clara-Maleza, *R. pisi*-Sagua, *R. etli*-Camajuani-1, *R. etli*-cepa tipo CNPAF512, *R. pisi*-Camajuani-2, Control. Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  por Bonferroni

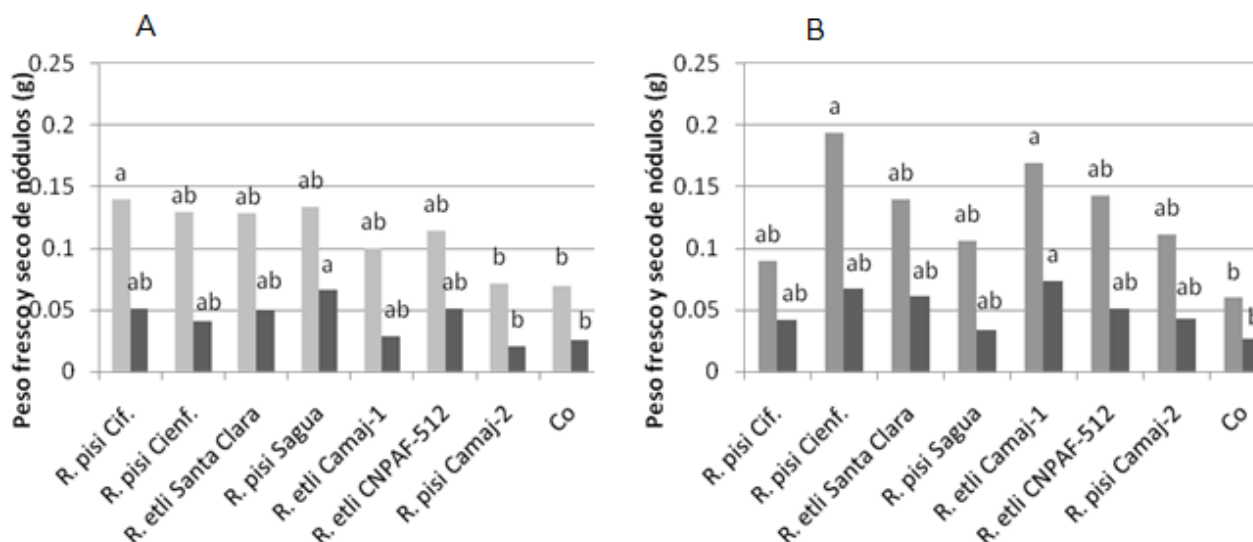


Figura 2. Análisis del peso fresco y seco de los nódulos por genotipos. A: peso fresco y seco (g) para ICA Pijao. B: peso fresco y seco (g) para BAT-304

Tratamientos: *R. pisi*-Cifuentes, *R. pisi*- Cienfuegos, *R. etli*-Santa Clara-Maleza, *R. pisi*-Sagua, *R. etli*-Camajuani-1, *R. etli*-cepa tipo CNPAF512, *R. pisi*-Camajuani-2, Control. Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  por Bonferroni

Sorprendentemente en las plantas pertenecientes al control se observaron nódulos en las raíces, este fenómeno pudo estar originado a que la zeolita utilizada no se esterilizó, por lo que pudo estar contaminada con bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, sin embargo, fueron los tratamientos de menores valores estadísticos para ambos genotipos.

En la figura 2 se muestran los resultados para el peso fresco y seco de los nódulos (PFN y PSN). Este último parámetro es de gran importancia ya que sirve como indicador para estimar las tasas de fijación de N<sub>2</sub> atmosférico por el cultivo de leguminosas, en condiciones de bajos insumos (Urquiaga y Zapata, 2000).

Para el genotipo ICA Pijao (figura 2-A) no se observan grandes diferencias entre los tratamientos, obteniéndose el de mejores resultados para el peso fresco de los nódulos aquel donde se aplicó la cepa aislada de Cifuentes (*R. pisi*), mientras que para el peso seco de los nódulos la inoculación del aislado procedente de Sagua tuvo los mejores valores significativos. En ambas variables evaluadas la inoculación con la cepa *R. pisi* de Camajuaní-2 y el control obtuvieron los valores más bajos estadísticamente, comportándose de la misma forma que para la nodulación total.

Para BAT-304 (figura 2-B) los valores también se comportaron muy relativos a los analizados en el número de nódulos totales. El peso fresco de nódulos se estimula con la inoculación de las cepas *R. pisi*-Cienfuegos y *R. etli* Camajuaní-1 y se observa que ambas difieren estadísticamente con el tratamiento control, el cual obtuvo el menor valor estadístico. La biomasa seca nodular en este genotipo demostró una correlación positiva con la nodulación, ya que el único aislado que tuvo diferencias significativas con el control fue el procedente de Camajuaní-1 (*R. etli*). Aunque los aislados *R. etli*-Santa Clara-Maleza y *R. etli* CNPAF-512 no tuvieron diferencias con el tratamiento control, se observa una tendencia al incremento de la biomasa seca nodular de 56,7 y 55 % respectivamente con ese tratamiento.

Según Dobbelaere *et al.* (2003) estas bacterias son capaces de excretar al medio donde se desarrollan abundantes cantidades de sustancias que son conocidas como estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como auxinas, las cuales intervienen en la arquitectura radical y de este modo se facilita la invasión, colonización y la nodulación en interacciones eficientes. Recientemente Remans *et al.* (2008), reportaron

diferentes QTLs (*quantitative trait loccus*) que ejercen un marcado efecto sobre la producción de auxinas en frijol común inoculado con la cepa *R. etli* CNPAF-512. Estos reportes se encuentran estrechamente relacionados con la estimulación de la producción de auxinas y la nodulación en frijol común (Remans *et al.*, 2008; Torres-Gutiérrez, 2008).

La figura 3 muestra el análisis de la biomasa tanto para ICA Pijao y BAT-304. En cada cuadro de la figura se observa el peso fresco o seco del follaje y la raíz para ICA Pijao (A, C) y BAT-304 (B, D) respectivamente. De forma general se observa que existe mayor variabilidad para los parámetros fisiológicos de la raíz que para el follaje en ambos genotipos. Estas variables se ven más afectadas positivamente mediante la inoculación con aquellas bacterias que ejercen un marcado efecto sobre los parámetros de nodulación, 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, además del incremento de las tasas de N fijado al follaje como resultado de la eficiencia de la interacción.

Resultados similares a los obtenidos en el ensayo se reportan por Torres-Gutiérrez *et al.* (2004) al evaluar la biomasa del cultivo del frijol, donde no observan diferencias significativas en cuanto al peso fresco y seco del follaje en los tratamientos de inoculación combinada y la inoculación con *Rhizobium* en solitario.

La figura 4 muestra los valores obtenidos en la fijación de N mediante el porcentaje de N total. Con relación a ICA Pijao, los mejores resultados se obtienen con el aislado procedente de *R. pisi*-Sagua, este último conjuntamente la inoculación del aislado de *R. pisi* Cienfuegos tuvieron un incremento de 30,3 y 26,7 % respectivamente en comparación con tratamiento control.

En el genotipo BAT-304, se observa como el tratamiento *R. pisi* Camajuaní-2, *R. etli*-Santa Clara-Maleza y *R. etli*-Camajuaní-1 obtuvieron los mejores resultados en los niveles de fijación de N, al tener un incremento de 41,8, 37,6 y 35,1 % respectivamente frente al control. Los resultados obtenidos en estos últimos tratamientos demuestran una relación estrecha entre todos los parámetros evaluados, los cuales para ambos genotipos estimularon desde el análisis morfológico, hasta la nodulación, parámetros fisiológicos y la fijación de N, en especial para BAT-304.

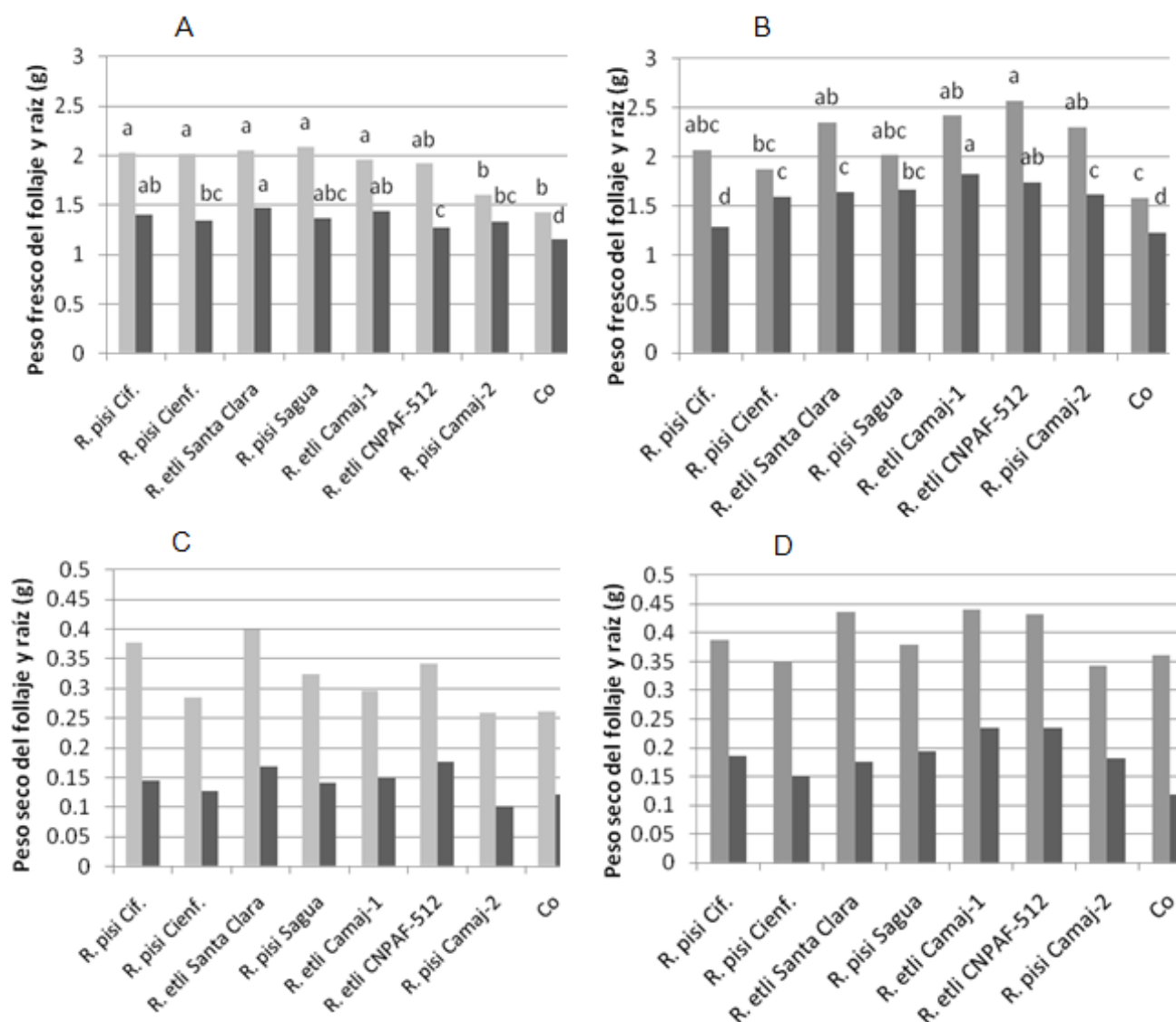


Figura 3. Análisis de parámetros fisiológicos en los genotipos estudiados. A: peso fresco del follaje y la raíz ICA Pijao, B: peso fresco del follaje y la raíz BAT-304, C: peso seco del follaje y la raíz ICA Pijao, D: peso seco del follaje y la raíz BAT-304

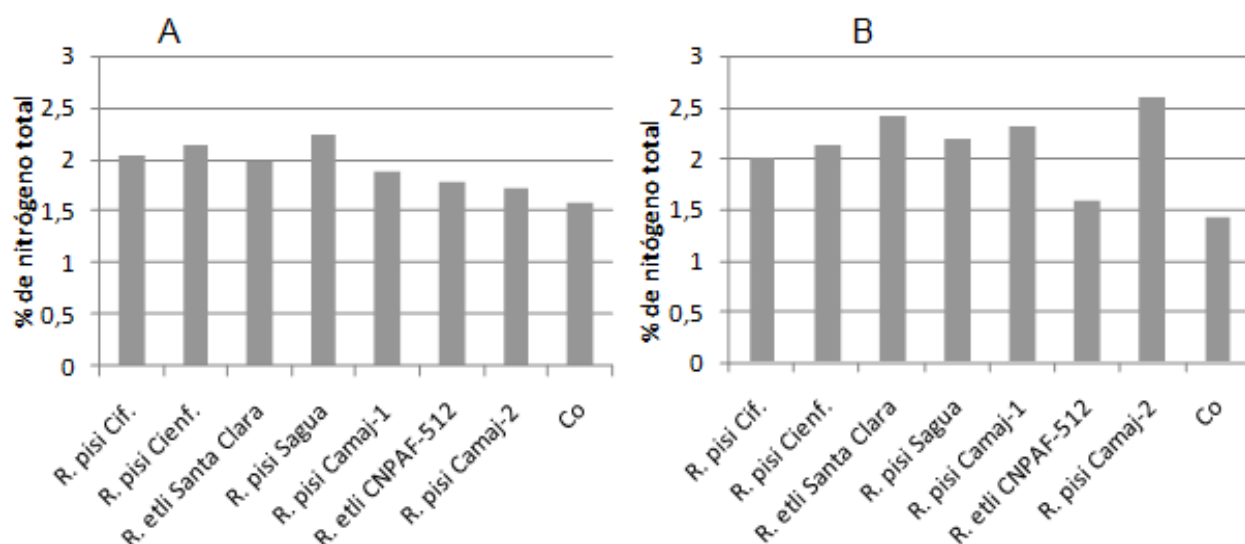
Tratamientos: *R. pisi*-Cifuentes, *R. pisi*-Cienfuegos, *R. etli*-Santa Clara-Maleza, *R. pisi*-Sagua, *R. etli*-Camajuaní-1, *R. etli*-cepa tipo CNPAF512, *R. pisi*-Camajuaní-2, Control. Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0,05$  por Bonferroni

Las diferencias en la eficiencia de la FSN entre cepas de *Rhizobium* son consecuencia al menos de dos causas: *i*) estabilidad en el material genético involucrado en la fijación, el cual está sometido a frecuentes pérdidas por reordenamiento del mismo (Martínez *et al.*, 1988) y *ii*) relación entre la capacidad para formar masa seca nodular, fijar N y transferir este a la parte aérea de las plantas (Dobereigner, 1988). Teniendo en cuenta estos aspectos se puede atribuir que la cepa *R. pisi* Camajuaní-2 para el genotipo BAT-304 es un caso típico de estabilidad en los genes *nif* involucrados

en la fijación de N, aunque formó relativamente menos masa seca nodular que la cepa aislada de Camajuaní-1, fue capaz de fijar y transformar adecuadas tasas de N.

En las tablas 2 y 3 se muestran los valores obtenidos mediante el análisis de correlación de Pearson  $p < 0,05$  entre las diferentes variables evaluadas tanto para los parámetros de fijación y parámetros fisiológicos bajo condiciones controladas esto con respecto para cada variedad estudiada.

Para BAT-304 se observan correlaciones significativas entre todas las variables evaluadas,



**Figura 4. Fijación de N por tratamiento en los genotipos evaluados. A: % de N para ICA Pijao, B: % de N para BAT-304**

Tratamientos: *R. pisi*-Cifuentes, *R. pisi*-Cienfuegos, *R. etli*-Santa Clara-Maleza, *R. pisi*-Sagua, *R. etli*-Camajuani-1, *R. etli*-cepa tipo CNPAF512, *R. pisi*-Camajuani-2, Control

**Tabla 2. Correlación de parámetros de nodulación y biomasa en el genotipo BAT-304**

<b>BAT-304</b>	Correlaciones	PFN	PSN	PFR	PSR	PFF	PSF
NN	Pearson Corr.	<b>0,5424</b>	<b>0,5201</b>	<b>0,4896</b>	<b>0,2034</b>	<b>0,4628</b>	<b>0,3415</b>
	Valor- P	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0044
PFN	Pearson Corr.		<b>0,5645</b>	<b>0,6303</b>	<b>0,2450</b>	<b>0,3241</b>	<b>0,2789</b>
	Valor- P		0,0000	0,0000	0,0440	0,0070	0,0213
PSN	Pearson Corr.			<b>0,4150</b>	0,1984	<b>0,4158</b>	<b>0,3419</b>
	Valor- P			0,0004	0,1048	0,0004	0,0043
PFR	Pearson Corr.				<b>0,3706</b>	<b>0,4861</b>	0,1997
	Valor- P				0,0019	0,0000	0,1025
PSR	Pearson Corr.					<b>0,5212</b>	0,1773
	Valor- P					0,0000	0,1480
PFF	Pearson Corr.						<b>0,5820</b>
	Valor- P						0,0000

siendo las más importantes de nuestro estudio el número de nódulos totales, peso seco de nódulos, y el peso seco del follaje, quienes correlacionan positivamente entre si, entre NN y el peso seco de los mismos 52 %, mientras que entre el número de nódulos totales y PSF un 34 %. Inverso a esto sucede para ICA Pijao donde no todas las variables evaluadas tienden a correlacionarse

positivamente entre si, tal es el caso entre peso seco de la raíz con el número de nódulos, donde la misma es negativa. Los valores más significativos para esta variedad se presentan entre PSN-PFN con un 77 %, seguido por PFN-NN con 68 %, y PSR-PFR con un 63 %, el resto de los valores siendo menos significativos. A pesar de que esos valores son significativos para las variables, los

Tabla 3. Correlación de parámetros de nodulación y biomasa en el genotipo ICA Pijao

ICA Pijao	Correlaciones	PFN	PSN	PFR	PSR	PFF	PSF
NN	Pearson Corr.	<b>0,6802</b>	<b>0,4983</b>	<b>0,2378</b>	-0,0158	<b>0,4213</b>	0,1909
	Valor- P	0,0000	0,0000	0,0442	0,8951	0,0002	0,1082
PFN	Pearson Corr.		<b>0,7748</b>	<b>0,3138</b>	0,1647	<b>0,4302</b>	0,0823
	Valor- P		0,0000	0,0073	0,1669	0,0002	0,4917
PSN	Pearson Corr.			0,1675	0,1097	0,2033	0,1118
	Valor- P			0,1597	0,3590	0,0867	0,3500
PFR	Pearson Corr.				<b>0,6342</b>	<b>0,5016</b>	<b>0,2810</b>
	Valor- P				0,0000	0,0000	0,0168
PSR	Pearson Corr.					<b>0,3079</b>	0,2204
	Valor- P					<b>0,0085</b>	0,0629
PFF	Pearson Corr.						<b>0,4776</b>
	Valor- P						0,0000

NN: Número de nódulos, PFN: peso fresco de nódulos, PSN: peso de nódulos, PFR: peso fresco de la raíz, PSR: peso seco de la raíz, PFF: peso fresco del follaje, PSF: peso seco del follaje

valores en los parámetros de fijación son menos significativos al compararlos con BAT-304 donde los mismos se presentan mejor en esta variedad que los reportados para ICA Pijao, esto 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  $N_2$ , dando como resultado el aumento en la materia seca de la parte aérea y radicular de las plantas, esto al corroborar la correlación positiva entre el peso seco de los nódulos y el peso seco del follaje, así como el peso fresco de raíz y peso fresco de nódulos, lo que no sucede para ICA Pijao. Frente a esto podemos concluir diciendo que la inoculación de aislados de *Rhizobium* afecto positivamente en el crecimiento, desarrollo y fijación de  $N_2$  en las dos variedades de frijol, pero sobre todo en BAT-304.

## CONCLUSIONES

1. Mediante los ensayos realizados y los resultados obtenidos, se demuestra que todas las cepas aisladas son capaces de formar nódulos en las raíces de los genotipos ICA Pijao y BAT-304. En los parámetros de nodulación se destacan las cepas *R. etli*-Santa Clara-Maleza y *R. pisi*-Sagua para ICA Pijao, mientras que para BAT-304 los

mejores aislados fueron *R. etli*-Santa Clara-Maleza, *R. etli*-Camajuaní-1, *R. etli*-CNPAF-512 y *R. pisi*-Cienfuegos.

2. La variabilidad genotípica en todos los parámetros evaluados se vieron afectados positivamente para BAT-304, no siendo así para ICA Pijao. Los mejores resultados globales se establecen por combinaciones cepas-genotipo (*R. pisi*-Sagua-ICA Pijao, *R. pisi*-Cifuentes-ICA Pijao, *R. etli*-Santa Clara-Maleza-BAT-304, *R. etli*-Camajuaní-1-BAT-304 y *R. pisi*-Camajuaní-2-BAT-304), por lo que puede inferirse que para el genotipo ICA Pijao los aislados identificados como *R. pisi* tuvieron los mejores resultados estadísticos, mientras que para BAT-304 fueron aquellos identificados como *R. etli*.

3. Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de usar las cepas de diazotófos identificadas para la realización de inoculantes, sin embargo, se requieren de estudios en condiciones de campo para la validación de sus potencialidades.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Broughton, W. J.; G. Hernandez; M. Blair; S. Beebe; P. Gepts y J. Vanderleyden: Beans



- (*Phaseolus* spp.), model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128, 2003.
2. Dobbelaere, S.; J. Vanderleyden; Y. Okon: Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci*, 22: 107–149, 2003.
  3. Dobereigner, J. 1988. Biotechnology: Recent advances in biological nitrogen fixation. VI Japan-Brazil Symposium on Science and Technology. En: VI JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY. Vol. IV. Academia de Ciencia do Estado de Sao Paulo. p. 145-160, 1988.
  4. FAO: Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. Leguminosa/*Rhizobium*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 93 pp, 1995
  5. Giller, K. E.: Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2Da edition CABI publishing, Wallingford, UK. 423 pp, 2001.
  6. Graham, P. H. y C.P. Vance: Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res*, 65: 93-106, 2000.
  7. Granda-Mora, K.I.; A. Colás-Sánchez; R. Cupull-Santana y R. Torres-Gutiérrez: Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*, 36 (1): 11-14, 2009.
  8. Martínez, E.; M. Flores; S. Brom; D. Romero; G. Davila; R. Palacios: *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. *Plant and Soil*, 108: 179-184, 1988.
  9. Quintero, E.: Manejo agrotécnico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Cuba. Monografía. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, Cuba. 2000.
  10. Remans, R.; S. Beebe; M. Blair; G. Manrique; E. Tovar; I. Rao; A. Croonenborghs; R. Torres-Gutiérrez; M. El-Howeity; J. Michiels y J. Vanderleyden: Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil*, 302: 149-161, 2008.
  11. Remans, R.; A. Croonenborghs; R. Torres-Gutiérrez; J. Michiels y J. Vanderleyden: Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of (*Phaseolus vulgaris* L.), are dependent on plant P nutrition Eur. *J Plant Pathol*, 119: 341-351, 2007.
  12. Torres-Gutiérrez, R.: Phytoestimulatory effect of *Rhizobium* and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) interaction. Dissertaciones de Agricultura. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Lovaina, Bélgica. 2008, 155 pp.
  13. Torres-Gutiérrez, R.; C. Pérez y N. Canino: Increments of biological nitrogen fixation by means of combined inoculation of atmospheric fixation bacterias. 6th European Nitrogen Fixation Conference. 24-28 July. Toulouse, France. P6.12: 109, 2004.
  14. Torres-Gutiérrez, R.; R. Remans; A. Willems; B. Eichler-Lobermann; M. Morales; J. Michiels y J. Vanderleyden: Morphological characterization and genetic identification of rhizobacteria in Cuban agricultural soils. Biophysical and Socio-economic Frame Conditions for the Sustainable Management of Natural Resources. Tropentag., Hamburg, Germany. October 6-8, 2009.
  15. Urquiaga, S. y F. Zapata: Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. Ed. GENESIS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Brasil. 2000, 88 p.

---

Recibido el 15 de septiembre y aceptado el 10 de diciembre de 2015