

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE FIJACIÓN BIOLÓGICA
DE NITRÓGENO DE CEPAS SILVESTRES DE RIZOBIOS EN
SIMBIOSIS CON TRES VARIEDADES DE FREJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

MARISOL HORMAZÁBAL HORMAZÁBAL

SANTIAGO - CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE FIJACIÓN BIOLÓGICA
DE NITRÓGENO DE CEPAS SILVESTRES DE RIZOBIOS EN
SIMBIOSIS CON TRES VARIEDADES DE FREJOL**
(Phaseolus vulgaris L.)

**EVALUATION OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION
CAPACITY ON WILD STRAIN OF RIZOBIA IN SYMBIOSIS WITH
THREE VARIETIES OF BEAN (*Phaseolus vulgaris L.*)**

MARISOL HORMAZÁBAL HORMAZÁBAL

SANTIAGO - CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE FIJACIÓN BIOLÓGICA
DE NITRÓGENO DE CEPAS SILVESTRES DE RIZOBIOS EN
SIMBIOSIS CON TRES VARIEDADES DE FREJOL**
(Phaseolus vulgaris L.)

Memoria para optar al Título Profesional de:
Ingeniero Agrónomo
Mención: Agroindustria

MARISOL HORMAZÁBAL HORMAZÁBAL

Profesor Guía	Calificaciones
Sra. Cecilia Baginsky G. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,0
Profesores Evaluadores	
Sr. Claudio Pastenes V. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,6
Sr. Luis Luchsinger L. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6,5

SANTIAGO - CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, en particular a mi madre por el apoyo incondicional y sacrificio para entregarme la mejor educación.

Sé que no fue fácil dar este gran paso, fueron muchos meses intentando terminar, pero no hubiese sido posible sin el apoyo de mi gran amiga Carolina Contardo y de Héctor, siempre me acompañaste y me apoyaste en todo.

Por último, quiero agradecer a mi profesora guía Cecilia Baginsky por sus comentarios e importantes aportes en esta investigación.

*“La vida es como un arcoiris:
necesitas tanto el sol como la lluvia
para hacer que sus colores aparezcan”*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis	7
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Lugar de estudio	8
Materiales	8
Variedades	8
Cepas y aislados	8
Método	9
Tratamiento y diseño experimental	9
Procedimiento	10
Esterilización de semillas	10
Instalación del ensayo	11
Variables a medir	12
Análisis estadístico	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Ensayo I: Variedad Cimarrón	14
Ensayo II: Variedad Apolo INIA	16
Ensayo III: Variedad Torcaza INIA	19
Efecto huésped y eficiencia de fijación de nitrógeno	20
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	31
APÉNDICES	33

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno en los cultivos de leguminosas resulta cada vez más importante en vista de los esfuerzos para desarrollar una producción agrícola sostenible, siendo una alternativa económica y natural de la fertilización química; sin embargo estos cultivos son muy variables en su eficiencia para fijar nitrógeno. El frejol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerada una planta con baja capacidad para fijar nitrógeno en comparación con otras leguminosas.

Con el objetivo de estudiar la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno de aislados silvestres de rizobios y determinar diferencias en función de la variedad de frejol utilizada, se realizaron 3 ensayos con variedades de frejol de uso común en Chile: Cimarrón, Apolo INIA y Torcaza INIA. Cada ensayo se realizó bajo condiciones controladas y se evaluó la eficiencia de 6 aislados silvestres de rizobios provenientes de frejol variedad Torcaza INIA cultivados en la zona centro sur de Chile. Esta eficiencia se comparó con un inoculante comercial ofrecido en Chile. Para cada tratamiento en los 3 ensayos, se realizaron mediciones de peso seco aéreo, de raíz y nódulos, contenido de proteína y contenido de clorofila de las plantas a los 15 y 28 días de la siembra.

Para cada ensayo se eligieron los tres mejores aislados, en función de los más eficientes, fueron comparados entre sí a través de un análisis de varianza y se determinó que: para las variedades Cimarrón y Torcaza INIA, ninguno de los aislados fue sobresaliente, en tanto que, para la variedad Apolo INIA, el aislado silvestre que presentó la mayor eficiencia fue Aurora 60.3. No obstante, en los tres ensayos y bajo condiciones controladas ningún aislado fue más efectivo que el inoculante comercial. Cabe destacar que este inoculante está compuesto por 3 o más cepas, por lo que se recomienda probar mezclas de los aislados más efectivos para cada variedad y fabricar inoculantes más eficientes.

Palabras claves: inoculación, rizobios, aislado silvestre.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation in legume crops is becoming increasingly important in view of the efforts to develop sustainable agricultural production, because is the natural alternative to chemical fertilizers. However, these crops are highly variable in their efficiency to fix nitrogen. The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered a plant with low capacity to fix nitrogen compared to other legumes.

In order to study the efficiency of biological nitrogen fixation, focusing on the bacterial component and to observe differences in terms of the variety of bean used as host, three trials were conducted with varieties commonly used in Chile; Cimarron, Apollo INIA and Torcaza INIA. Each trial was conducted under controlled conditions and efficiency was assessed of 6 *Rhizobium* wild isolated coming from bean variety Torcaza INIA grown in south-central Chile. This efficiency was compared with a commercial inoculant offered in Chile. For each treatment on the 3 trial, were measured dry weight of root and nodules, protein and chlorophyll content at 15 and 28 days after seeding.

The three best isolates, based on the most efficient ones, of each trial were compared by performing an analysis of variance. Results indicated that none of the isolated was outstanding in either Cimarrón or Torcaza INIA variety, whereas Aurora 60.3 wild isolate was the most efficient in Apolo INIA variety. However, the commercial inoculant was more effective compare with any of the three trials under controlled conditions. The commercial inoculant comprises three or more strains, therefore it is recommended to test with isolate mixtures incorporating the most effective isolates for each variety and produce more efficient isolates.

Palabras claves: inoculation, *Rhizobium*, wild isolated.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la demanda por alimentos ha impulsado al sector agrícola a ser más eficiente en el uso de sus recursos, así como a lograr potenciar la producción de los principales cultivos alimenticios a nivel mundial. Este hecho ha significado un aumento importante en el input dirigido hacia los cultivos, siendo los aportes de nitrógeno, los que más han aumentado a través del tiempo (Urzua, 2005). Esto trae consigo un mayor costo energético generado por el aumento en la producción de fertilizantes, un aumento en el costo en la producción de cultivos y lo que es más grave aún, un alto riesgo de potencial contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del nitrato de los suelos (Aparicio *et al.*, 1999).

Una de las formas de reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, es a través de la utilización del nitrógeno atmosférico; sin embargo a pesar de su abundancia en la atmósfera (78%) no es aprovechable directamente por las plantas, pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en productos asimilables. Las plantas absorben el nitrógeno del suelo principalmente en formas orgánicas como nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+); en el caso de este último, también puede ser adquirido a través de la reducción de N_2 atmosférico a NH_4^+ , que llevan a cabo bacterias que establecen relaciones simbióticas con plantas (Urzúa, 2005). Estos microorganismos pertenecen a los grupos *Bacteria* y *Archaea*, siendo ellos los únicos seres vivos capaces de llevar a cabo esta reducción. Este proceso recibe el nombre de fijación biológica de nitrógeno (FBN), siendo mayoritariamente plantas pertenecientes al grupo de las leguminosas las que establecen esta asociación (Graham y Vance, 2000).

Según Azcon-Bieto y Talon (1999), la simbiosis fijadora de nitrógeno más conocida e importante desde una perspectiva económica, es la que se establece entre raíces de leguminosas y bacterias de los género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* y *Azorhizobium*. Todos ellos llamados colectivamente rizobios, caracterizándose por presentar morfología bacilar, ser aerobios gram-negativos, no ser formadores de esporas y además utilizar una gran variedad de azúcares como fuente de carbono.

Para que ocurra FBN, deben existir en el suelo estos rizobios, y que ellos infecten y colonicen las raíces de las plantas, provocando deformaciones conocidas como nódulos. En ellos se produce la transformación de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio por acción de la enzima nitrogenasa, permitiendo de esta manera que la planta cuente con el nitrógeno necesario para sus procesos fisiológicos, entre ellos, la síntesis de proteínas (Urzúa, 2005).

Para que se produzca la nodulación es necesario que los rizobios reconozcan a la planta hospedera, existiendo en muchos casos una alta especificidad para ambas partes (bacteria-planta). A esta interacción se le ha denominado “efecto huésped” y comienza con la atracción quimiotáctica entre bacteria y raíz de la planta hospedera. La raíz libera al medio flavonoides (flavonas e isoflavonas) que inducen la expresión de un gran número de genes

de nodulación en las bacterias (genes nod); estas, por su parte reconocen el exudado de su posible hospedador provocando la liberación de un compuesto denominado factor Nod (factor de transcripción presente en todas las especies de rizobios), que induce una serie de deformaciones en los pelos radicales que permitirán la formación del nódulo (Castellanos *et al.*, 1998). Cada tipo de *Rhizobium* tiene un espectro específico de plantas con las que son capaces de formar nódulos. Por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum* establece simbiosis con *Glycine max* (soya), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con *Pisum sativum* (arveja) o *Vicia faba* (haba), *Sinorhizobium meliloti* con *Medicago sativa* (alfalfa) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* con *Phaseolus vulgaris* L. (frejol) (Pascual, 2008).

Dentro de las ventajas de esta simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se pueden destacar:

- a) La planta puede autoabastecerse de nitrógeno, disminuyendo la aplicación de fertilizantes nitrogenados.
- b) Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante (ejemplo: gramíneas-leguminosas).
- c) Puede dejar nitrógeno disponible para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el nitrógeno.
- d) La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación al 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo.

La cantidad de nitrógeno que puede fijar la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa está en función de la efectividad del rizobio, la especie de leguminosa, las condiciones edafoclimáticas y del manejo del cultivo (Urzúa, 2005). Los valores pueden fluctuar entre 50 y 800•kg•ha año⁻¹ de N, pudiendo de esta manera sustituir grandes cantidades de fertilizante nitrogenado (Peña-Cabriales, 2000). Así por ejemplo, el rango frecuente de fijación en alfalfa está entre 120 y 800 kg•ha•año⁻¹ de N fijado, en habas entre 100 y 300 kg•ha•año⁻¹ de N fijado y en frejol entre 25 y 100 kg•ha•año⁻¹ N fijado (Peña-Cabriales *et al.*, 1999). Otros estudios indican que en haba la FBN aporta en promedio un 70% de las demandas totales de nitrógeno de la planta; en el caso de soya, este aporte fluctúa entre 40 y 60%; en tanto que en frejol y arveja estos valores son bajos, cercanos al 30% (Peña-Cabriales *et al.*, 1999).

Estudios relacionados con la simbiosis frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) - *Rhizobium*, han determinado que la baja eficiencia de fijación de esta asociación podría ser atribuida tanto a la planta, al componente bacteriano o a la interacción entre ambos (Aparicio *et al.*, 1999).

A nivel de planta puede haber una resistencia a la infección por rizobios o su incapacidad para establecer la simbiosis. Estudios de Jadue (1993) indican que factores estresantes en el desarrollo del cultivo pueden limitar el aporte energético a la bacteria. Además, otros estudios han demostrado que aquellos factores que conducen a un incremento de la fotosíntesis conllevan a un incremento de la cantidad de nitrógeno fijado (Soussana y Hartwig, 1996). También influye el hábito de crecimiento de la leguminosa, donde se ha demostrado que plantas de frejol de tipo IV con hábito de crecimiento indeterminado trepador, fijan más nitrógeno que las de tipo III y las de tipo I con crecimiento arbustivo

determinado, estas son pobres fijadoras de nitrógeno (Peña-Cabriales, 2000).

En cuanto a las limitaciones debidas al componente bacteriano, una de ellas es la deficiencia de rizobios en los suelos o la baja efectividad de ellos. La ausencia de rizobios puede estar asociada a las características propias del suelo, las que pueden no ser óptimas para la bacteria. Existe por tanto, la posibilidad de introducir artificialmente estos microorganismos en el suelo o en la semilla a través de la práctica de inoculación, incrementando la simbiosis y al mismo tiempo la fijación biológica de nitrógeno (Urzúa, 2005). Normalmente las bacterias que se utilizan como inóculo han sido previamente probadas en laboratorio y campo en su eficiencia de fijación y sometidas a diferentes pruebas para medir su capacidad competitiva (Stephens y Rask, 2000). Pese a esta práctica, muchas veces la inoculación no produce los efectos esperados en términos de una mayor fijación de nitrógeno. Las razones de ello están asociadas a la existencia en el suelo de bacterias silvestres, adaptadas a las condiciones de suelo y que compiten con las bacterias inoculadas, logrando desplazarlas (Buttery *et al.*, 1992).

Existen en el mercado distintas formulaciones de inoculantes, entre ellos, están los que son aplicados a la semilla o los diseñados para aplicación directa al suelo. Los más comunes son los aplicados directamente a la semilla; sin embargo, en ocasiones en las cuales se utiliza semilla tratada con productos químicos tóxicos para el rizobio, o cuando la siembra se realiza bajo condiciones adversas (altas o bajas temperaturas, suelos ácidos o alcalinos), se prefiere el uso de inoculantes aplicados directamente al suelo (Fernández, 2003).

Dentro de los factores agronómicos y ambientales que afectan la fijación de nitrógeno, destacan: temperatura, pH, humedad, acidez y componentes químicos como el contenido de nitrógeno, fósforo, calcio y molibdeno. Estos varían de una localidad a otra y con frecuencia es difícil separar el efecto de los factores mencionados en forma independiente. Por ejemplo, altas y bajas temperaturas son fuertemente influyentes en la fijación de nitrógeno y nodulación, observándose que en frejol, con temperaturas superiores a 35°C se anula el proceso de fijación (Bliss, 1999). Además la acidez, así como la concentración de calcio, aluminio y magnesio, interactúan y afectan tanto la proliferación bacteriana, la infección de los pelos radicales y el crecimiento de las plantas (Peña-Cabriales, 2000). Suelos ácidos están normalmente desprovistos de rizobios efectivos, tales como *Rhizobium etli* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, en cambio existen ciertas cepas de *Rhizobium tropici* que pueden fijar nitrógeno en estas condiciones (Graham *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 2002). Altas condiciones salinas, de magnesio o de aluminio afectan directamente el crecimiento de *Rhizobium* y conducen a pérdidas de efectividad (Graham, 1992; Bordeleau y Prévost, 1994). A esto hay que sumar las prácticas agronómicas en las cuales se utilizan productos químicos para el control de plagas, enfermedades y/o malezas, que afectan severamente a las bacterias fijadoras de nitrógeno y son mayormente tóxicos para la microbiota del suelo (Pascual, 2008).

En Chile, el frejol es un cultivo muy importante dentro de las leguminosas, tanto por la superficie que ocupa, como por los ingresos que genera, ya sea como producto de consumo interno o de exportación. Se utiliza tanto como grano seco, vaina verde o granado. Debido a

su gran calidad proteica, es una de las más consumidas. Según datos entregados por ODEPA (2013), en la temporada 2011-2012 la superficie total de siembra en Chile abarcó 6.428 há, con una producción de 11.249 toneladas y un rendimiento de 17.5 qq•há⁻¹. Siendo la superficie cultivada para poroto granado y seco de 3.163 há y para poroto verde de 3.195 há.

Las cepas de rizobios capaces de nodular en las raíces de frejol forman un grupo muy heterogéneo y hasta la fecha se han descrito al menos seis especies: *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* y *R. giardinii* (Amarger *et al.*, 1997; Herrera-Cervera *et al.*, 1999) y el más reciente *R. lusitanum* sp. nov. (Valverde *et al.*, 2006). Algunos estudios relacionados con la inoculación de plantas de frejol con cepas de rizobios han mostrado incremento de las plantas en su producción de materia seca, contenido de nitrógeno y rendimiento; no obstante, esta respuesta está muy influenciada por la variedad de frejol utilizada (Hardarson *et al.*, 1999; Hardarson, 1993).

Existen diferentes métodos para medir de forma directa e indirecta el contenido de nitrógeno fijado simbióticamente. El método más adecuado depende en gran medida del objetivo del experimento, entre ellos se encuentran: método de la producción de materia seca, método de la diferencia del contenido de nitrógeno total, observación de nódulos, actividad de reducción de acetileno, solutos en el xilema, actividad enzimática, utilización del ¹⁵N, etc. (Peña-Cabriales y Zapata, 1999).

Un estudio molecular realizado por Cañete (2007) utilizando la técnica RFLP-PCR, determinó que existe diversidad de especies de rizobios presentes en los suelos de la Región Centro-Sur de Chile, identificó 8 patrones RFLP diferentes, siendo uno de ellos similar a la especie *Rhizobium tropici* y otros similares a *Rhizobium etli* en suelos de la localidad de Ñiquén. Posteriormente, un estudio realizado por Labbé (2008), utilizando algunos aislados del trabajo de Cañete (2007) logró identificar que los aislados obtenidos de las localidades Santa Bárbara y Antumapu pertenecen a la especie *Rhizobium etli* y los aislados obtenidos de la localidad San Agustín de Aurora pertenecen a *Rhizobium leguminosarum*. Lo que confirma la presencia de cepas *R. tropici* y *R. etli* en suelos chilenos.

Con el objetivo de evaluar los mismos aislados identificados por Labbé (2008), se llevó a cabo este estudio, tendiente a determinar si existe un efecto huésped por parte de los aislados, probándolos en distintas variedades de frejol.

Hipótesis

Aislados silvestres de *Rhizobium* obtenidos a partir de nódulos de plantas de frejol variedad Torcaza INIA, son más efectivos en la fijación de nitrógeno que los utilizados en el inoculante comercial, observándose respuestas diferenciales en función de la variedad de frejol utilizada como huésped.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la eficiencia en fijación de nitrógeno de aislados silvestres de *Rhizobium* obtenidos de plantas de frejol variedad Torcaza INIA y compararlas con el inoculante comercial ofrecido en Chile.

Objetivos específicos

- Evaluar la eficiencia de fijación de nitrógeno de aislados silvestres, respecto del comercial, en términos de producción de materia seca, contenido de proteína y clorofila de las plantas.

- Evaluar el efecto huésped en la simbiosis analizando la eficiencia de fijación de nitrógeno de la bacteria en simbiosis con las variedades Cimarrón, Apolo INIA y Torcaza INIA.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Específicamente en el laboratorio de Leguminosas de Grano; en cámara de crecimiento con ambiente controlado y laboratorios de Fisiología del Estrés, ambos pertenecientes al Departamento de Producción Agrícola.

Materiales

Variedades

Se trabajó con tres variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris*): Cimarrón INIA, una de las más utilizadas para consumo de poroto granado en Chile; Apolo INIA, principal variedad para consumo de poroto verde fresco y, Torcaza INIA, la que corresponde a la de mayor importancia para consumo de grano seco.

Cepas y aislados

En el estudio se utilizaron 6 aislados silvestres de *Rhizobium*, que fueron obtenidos a partir de nódulos de plantas de frejol variedad Torcaza INIA establecidas entre la RM y la VIII Región, y cuyo nombre se asignó según la localidad de extracción. En estudios anteriores de estos mismos aislados, fueron caracterizados molecularmente a través de un marcador molecular RFLP-PCR para el gen *nodC*, para el gen rDNA 16S y con la técnica RAPD utilizando distintos partidores (Cañete, 2007; Labbé, 2008).

Con el objetivo de comparar la eficiencia de fijación de los distintos aislados con cepas comerciales, se utilizó el inoculante comercial en base a turba, Nitrofix de Biomat. Además como cepa control se utilizaron tres cepas provenientes de España que han presentado una muy buena eficiencia de fijación, UPM 8026 de *Rhizobium etli* y CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, otorgadas por la Universidad Politécnica de Madrid, España y TAL 1121 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, otorgada por la Universidad de Sevilla, España. En el Cuadro 1 se presentan cada uno de los aislados, especie a la que corresponden y localidad y ubicación de su procedencia.

Cuadro 1. Aislados silvestres de *Rhizobium* utilizados para inocular plantas de frejol.

Nombre	Especie de <i>Rhizobium</i>	Lugar de origen	Ubicación geográfica
Aurora 60.3	<i>R. leguminosarum</i> .	San Agustín de Aurora, VII Región.	35°25' LS y 71°40' LO
Aurora 15.3	<i>R. leguminosarum</i> .	San Agustín de Aurora, VII Región.	35°25' LS y 71°40' LO
Ñiquén 14.3	<i>R. leguminosarum</i> .	San Dionisio, VII Región.	36°19' LS y 72°20' LO
Santa Bárbara 21.3	<i>R. etli</i> .	Santa Bárbara, VIII Región.	37°36' LS y 71°47' LO
Antumapu 12.3	<i>R. etli</i> .	Santiago, Región Metropolitana.	33°34' LS y 70°38' LO
Ñiquén 17.3	<i>R. tropici</i> .	Ñiquén, VIII Región.	36°19' LS y 72°20' LO

Fuente: Cañete (2007), Labbe (2008).

Método

Tratamientos y Diseño Experimental

En una primera etapa se llevaron a cabo tres ensayos independientes; el ensayo I, correspondió a la variedad Cimarrón, el ensayo II a la variedad Apolo INIA y el ensayo III a Torcaza INIA. En cada ensayo se realizaron once tratamientos, tal como se muestra en el Cuadro 2, cada uno de ellos con 8 repeticiones. La unidad experimental correspondió a una maceta tipo Jarra Leonard (Figura 2) con tres plantas y los ensayos se llevaron a cabo en cámaras de crecimiento con ambiente controlado, manteniendo esterilizado el lugar de trabajo para no contaminar las plántulas.

Cuadro 2. Cepas utilizadas en cada tratamiento. Estructura se utilizada en cada ensayo.

Tratamientos	Cepa
T1	Antumapu 12.3 (<i>R. etli</i>)
T2	Aurora 60.3 (<i>R. leguminosarum</i>)
T3	Aurora 15.3 (<i>R. leguminosarum</i>)
T4	Ñiquén 14.3 (<i>R. leguminosarum</i>)
T5	Ñiquén 17.3 (<i>R. tropici</i>)
T6	Santa Bárbara 21.3 (<i>R. etli</i>)
T7	UPM 8026 (<i>R. etli</i>)
T8	CIAT 899 (<i>R. tropici</i>)
T9	TAL 1121 (<i>R. leguminosarum</i>)
T10	Inoculante Comercial
T11	Testigo

Los tres ensayos fueron realizados en base a un diseño estadístico totalmente aleatorizado. De los resultados obtenidos en la primera etapa, y con el fin de evaluar si existió o no un efecto huésped de los aislados sobre cada variedad de frejol, se eligieron los tres tratamientos que presentaron los mejores resultados de cada ensayo y se compararon con el inoculante comercial. El diseño estadístico utilizado fue totalmente al azar con 4 tratamientos de 8 repeticiones cada uno.

Procedimiento

Siguiendo la metodología descrita por Vincent (1970) (Anexo II); tanto los aislados como las cepas de referencia se hicieron crecer en Placas Petri con Agar-YMB (medio manitol-extracto de levadura) durante 3 a 4 días a 28°C. Luego, en matraces erlenmeyer que contenían 50 mL de YMB líquido estéril, se realizaron repiques con los aislados desde el medio sólido al líquido. Estos matraces se mantuvieron en un agitador orbital GFL modelo 3005, durante 3 a 4 días a temperatura de 28° C, periodo durante el cual la concentración de las bacterias llega a una densidad óptica promedio de 1,5 conteniendo alrededor de 1×10^8 bacterias mL^{-1} (Vincent, 1970). Este medio de cultivo fue el inoculante utilizado al momento de la siembra en cada uno de los tratamientos. Para los tratamientos con inoculante comercial, marca Nitrofix, 1g de turba presenta alrededor de $1 \cdot 10^8$ bacterias. En este caso y dado que la formulación es en base a turba, se utilizó directamente sobre la semilla, el cual fue depositado al momento de la siembra.

Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de inocuidad en cámara de flujo laminar Heraeus modelo HP48, para evitar la contaminación entre macetas.

Esterilización de semillas

Las semillas correspondientes a las tres variedades de frejol fueron esterilizadas superficialmente siguiendo el protocolo descrito por Aguilar *et al.* (2001), en el cual las semillas previamente seleccionadas se depositaron durante 1 minuto en alcohol al 95%, posteriormente, 3 minutos en una solución comercial de hipoclorito sódico diluido al 25% y luego se lavaron reiteradas veces con agua estéril. Todo este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar. Una vez desinfectadas se hicieron germinar en placas con agar-agua estériles al 1% a 28°C por 2 a 3 días (Figura 1). Una vez que la radícula estuvo expuesta se pasaron a macetas.

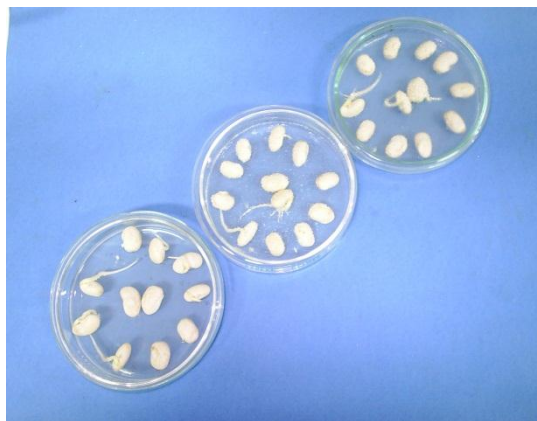


Figura 1. Placas con semillas germinadas, desinfectadas según protocolo descrito por Aguilar *et al.* (2001).

Instalación del ensayo

La siembra se realizó en macetas tipo Jarras Leonard (Figura 2), que consisten en una maceta de greda de 10 cm de diámetro, a la cual se le insertó en su orificio basal un cordón de gasa por el cual la planta obtendrá el medio nutritivo líquido, definido por Vincent (1970) (Anexo I). Este medio estaba contenido en un tarro de aluminio, sobre el cual fue depositada la maceta, en cuyo interior contenía vermiculita, utilizada como soporte inerte para el crecimiento de las plantas. Previo a la siembra estas unidades Leonard se sellaron con papel aluminio y fueron esterilizadas en autoclave Huxley modelo HL-341, por 2 horas a una temperatura de 120 °C.



Figura 2. Estructura macetas tipo Jarras Leonard. Unidad experimental.

Las macetas Leonard, previamente esterilizadas, se llevaron a cámara de flujo laminar para realizar la siembra. Se depositaron 3 semillas pre-germinadas por maceta a una profundidad aproximada de 2 cm. Cada semilla fue inoculada con 2 mL del correspondiente medio de cultivo bacteriano crecido en medio YMB. En el caso del inoculante comercial, se utilizó 2 g de turba, que fue incorporada junto a la semilla. Luego, se taparon con arena de cuarzo estéril, para mayor aislamiento y así minimizar la contaminación entre macetas. Posteriormente se llevaron a cámara de crecimiento con una temperatura entre 25/17 °C (día y noche).

Las Jarras Leonard permitieron mantener la sanidad de las plantas y regular las condiciones hídricas, mediante riegos de 500 mL de solución nutritiva estéril cada 7 días, realizadas en cámara de flujo laminar.

Variables a medir

Todos los tratamientos se evaluaron a los 28 días de la siembra y las variables a medir fueron las siguientes:

Peso seco aéreo (g por maceta): Para medir la eficiencia simbiótica se determinó la acumulación de peso seco de la parte aérea de las plantas de cada tratamiento. Las muestras se secaron en una estufa con ventilación forzada a 80 °C durante 48 horas. Según Hardarson (1999) el peso seco de la planta usualmente se correlaciona positivamente con la eficiencia de fijación de nitrógeno cuando el nitrógeno es el único factor limitante del crecimiento. Posterior a esto se pesaron en una balanza ADAM modelo AFP-4100L, con 0.001g de precisión.

Número de nódulos (nódulos por maceta): Se realizó un recuento de nódulos totales por tratamiento, para lo cual, se lavaron las raíces con abundante agua para eliminar restos de vermiculita y se contabilizó el número de nódulos.

Peso seco de los nódulos (g por maceta): Los nódulos extraídos en la etapa anterior, fueron secados en estufa con ventilación forzada a 80 °C durante 48 horas y posteriormente pesados en una balanza ADAM modelo AFP-4100L.

Peso seco de raíces (g por maceta): Una vez extraídos los nódulos de las raíces éstas se guardaron en sobres de papel y se secaron en estufa con ventilación forzada a 80 °C durante 48 horas, posteriormente se pesaron en una balanza ADAM modelo AFP-4100L.

Contenido de proteína: Se determinó según el protocolo descrito por Bradford (1976) (Anexo III). Para ello se extrajeron con un sacabocado muestras foliares de 0.385 cm² provenientes de la segunda hoja trifoliada de todas las plantas. Se rotularon y llevaron de inmediato a -80 °C hasta el momento de la medición.

Los datos obtenidos se midieron en un espectrofotómetro, luego se llevaron a la fórmula obtenida de la curva de calibración, dando como resultado el contenido de proteína en μg de proteína por cm² de hoja.

Contenido de clorofila: Esta determinación se realizó de acuerdo a la metodología de Lichtenthaler y Wellburn (1983) (Anexo IV). Primeramente se utilizó un medidor portátil, SPAD (Optiscience-CCM200, USA), con el que se registró el índice de clorofila. Esta medición se llevó a cabo en la primera hoja trifoliada a los 15 días y en la segunda hoja trifoliada a los 28 días de la siembra, respectivamente. Para la obtención de resultados fue necesario construir una curva de calibración, para lo cual, con un sacabocado se tomaron muestras aleatorias de 0.385 cm² de hoja y se midió contenido de clorofila. Las muestras fueron rotuladas y congeladas de inmediato a -80 °C. El contenido de pigmentos se determinó mediante espectrofotómetro leyendo absorbancia a 649 y 665 nm (Shimadzu, UV – 1601).

Análisis estadístico

Los resultados de los tres ensayos, Cimarrón, Apolo INIA y Torcaza INIA se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) con un 95% de confianza ($P \leq 0.05$) y en los casos que se presentaron diferencias significativas se usó la prueba de comparación múltiple de Tukey, con el objetivo de identificar diferencias entre los tratamientos. Para la segunda etapa, en la cual se eligieron los tres mejores tratamientos y se compararon con el inoculante comercial, se realizó el mismo análisis de varianza entre tratamientos.

Los supuestos del ANDEVA paramétrico, normalidad y homogeneidad de varianza fueron evaluados por medio de las pruebas de Anderson Darling y Bartlett, respectivamente. Para las variables que no cumplieron estos supuestos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, análisis de varianza no paramétrico y una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran a continuación, son presentados de forma independiente según cada variedad de frejol. Por lo tanto el ensayo I, corresponde a Cimarrón, el ensayo II a Apolo INIA y el ensayo III a Torcaza INIA. Para cada ensayo se evaluaron 6 aislados silvestres de rizobios, 3 cepas control: UPM 8026 (*Rhizobium etli*), CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) y TAL 1121 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), un inoculante comercial y un testigo sin inoculante.

En cada uno de los ensayos, transcurridos 15 días de la siembra, se tomaron muestras de la primera hoja trifoliada para medir clorofila (clorofila 1); y luego, a los 28 días de la siembra, de la segunda hoja trifoliada se tomaron las muestras para contenido de proteína y clorofila 2. También se midió el número de nódulos por planta, materia seca de nódulos, raíces y parte aérea. Según Peña-Cabriales (2000) la biomasa y nitrógeno total en la planta son indicadores útiles en la fijación de nitrógeno. Estos métodos son simples y baratos, por ende son usados a menudo para evaluar una gran cantidad de cepas de rizobios y plantas huésped. El nitrógeno, por su parte, interviene además en la síntesis de la clorofila, por lo que está involucrado en la fotosíntesis. El síntoma visual característico de carencia de nitrógeno es el amarillamiento de los tejidos y la reducción del crecimiento. Al respecto Urzúa (2005), indica que plantas con mayor área fotosintética fijan más nitrógeno que las plantas con menor capacidad. En cuanto a la observación de nódulos, cuando se realizan en conjunto con otras mediciones, son especialmente útiles para relacionarlos con parámetros de crecimiento de la planta, tales como los indicados anteriormente.

Se tomarán como indicadores para la discusión de los resultados los estudios anteriormente realizados por Cañete (2007) y por Labbé (2008), donde se trabajó con los mismos aislados silvestres y se determinó a que especie de rizobio pertenecían.

Ensayo I: Variedad Cimarrón

La variedad Cimarrón, es utilizada en Chile principalmente para consumo de poroto granado, sus vainas son rojas con vetas de color verde claro. Se caracteriza por presentar un hábito de crecimiento indeterminado, tipo III, es decir, con la parte terminal de los tallos con una guía vegetativa, y además, numerosos tallos secundarios que se postran sobre el suelo desde el inicio del llenado de granos. La altura de estas plantas es superior a las de tipo I y II, y asimismo la longitud de los entrenudos. Son variedades tardías de entre 118 a 135 días desde la siembra a la madurez de la cosecha. Estas características dificultan su manejo, especialmente el uso de altas densidades de plantas, el riego tecnificado y la cosecha mecanizada (Alvarado, 2004).

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos para esta variedad, en donde se aprecian los distintos parámetros indicados anteriormente. Los valores mínimos fueron obtenidos por el testigo y el aislado Ñiquén 14.3 de *R. leguminosarum*. Los aislados de la cepa control UPM 8026 (*R. etli*), inoculante comercial, Aurora 15.3 de *R. leguminosarum* y Santa Bárbara 21.3 de *R. etli* obtuvieron valores significativamente más altos a Ñiquén 14.3 y el testigo, en la mayor parte de los parámetros medidos.

Cuadro 3. Peso seco aéreo, de raíz y nódulos, número de nódulos, clorofila 1, clorofila 2 y proteína para cada tratamiento en variedad Cimarrón.

Tratamiento	Peso aéreo g maceta ⁻¹	Peso de raíz g maceta ⁻¹	Peso de nódulos g maceta ⁻¹	Número de nódulos maceta ⁻¹	Clorofila 1 ugcm ⁻²	Clorofila 2 ugcm ⁻²	Proteína ugcm ⁻²
I Comercial	3.18 a ^z	0.86 a ^z	0.39 a ^z	838.3 a ^z	21.7 a ^z	26.5 ab ^z	366.5 b ^z
<i>R. etli</i>	2.71 ab	0.77 ab	0.34 ab	544.0 bc	24.2 a	33.7 a	493.3 a
Aurora 15.3	2.58 ab	0.62 abc	0.24 bc	659.4 ab	24.8 a	23.3 b	365.2 b
Ñiquén 17.3	2.24 abc	0.59 abc	0.23 bc	587.1 abc	20.7 a	23.3 b	249.6 cd
<i>R. tropici</i>	2.06 abc	0.51 bc	0.16 cd	432.9 bcd	19.8 ab	22.6 b	313.8 bc
Santa Bárbara 21.3	1.93 bc	0.52 bc	0.19 c	581.9 abc	20.3 ab	27.0 ab	385.3 b
Aurora 60.3	1.87 bcd	0.48 c	0.15 cd	461.5 bcd	19.7 ab	23.4 b	334.0 b
Antumapu 12.3	1.84 bcd	0.46 c	0.15 cd	371.5 cd	22.4 a	26.5 ab	343.0 b
<i>R. leguminosarum</i>	1.74 bcd	0.49 bc	0.15 cd	535.9 bc	20.5 a	24.4 b	256.4 cd
Ñiquén 14.3	1.37 cd	0.66 abc	0.06 d	250.3 d	13.6 c	11.0 c	211.1 de
Testigo	0.77 d	0.48 c	-	-	12.5 c	10.5 c	169.4 e

^z Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para cada variable. Cepas control: *Rhizobium etli* (UPM 8026), *Rhizobium tropici* (CIAT 899) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (TAL 1121).

El peso total de cada tratamiento se muestra en la Figura 3, observándose diferencias significativas entre tratamientos. Las plantas tratadas con inoculante comercial fueron las que presentaron valores más altos, siendo significativamente igual sólo a los tratamientos de cepa control de UPM 8026 (*R. etli*), Aurora 15.3 de *R. etli* y Ñiquén 17.3 de *R. tropici*; tratamientos que a su vez se diferenciaron del testigo sin inocular. Por su parte, Ñiquén 14.3 de *R. leguminosarum* y el testigo lograron los valores más bajos, diferenciándose significativamente sólo de *R. etli* e inoculante comercial.

A partir de los resultados se puede inferir que bajo las condiciones del presente ensayo y para esta variedad, la inoculación con cepas silvestres de rizobios no aumenta la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno, ya que en ninguno de los tratamientos los resultados fueron superiores a las plantas inoculadas con inoculante comercial. Esto se explicaría ya que dichos inoculantes se fabrican con una mezcla de bacterias, a diferencia de los otros tratamientos, los cuales estaban formados por un solo tipo de bacterias.

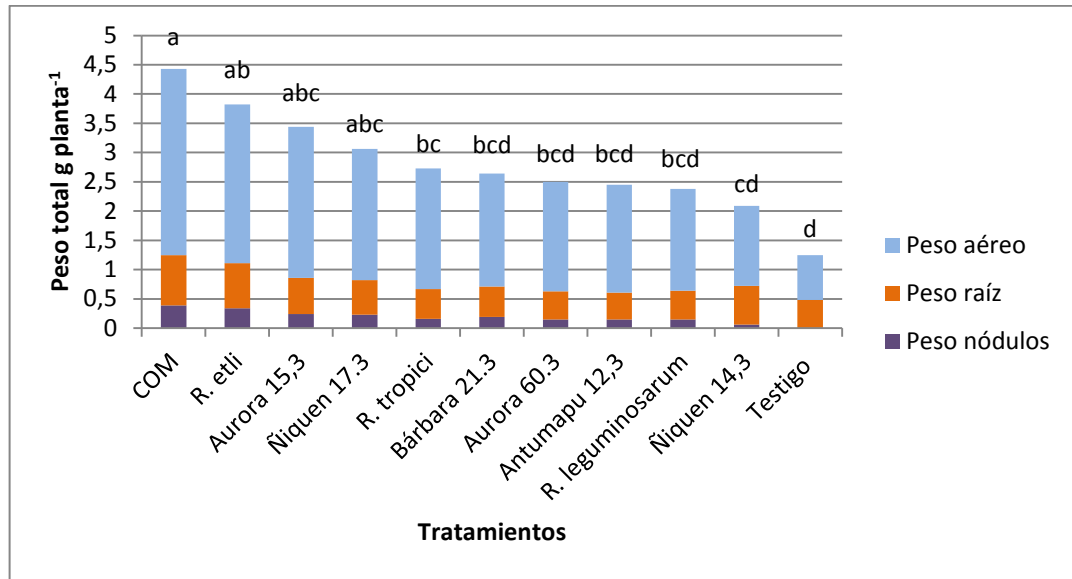


Figura 3. Peso seco total por planta (peso aéreo, peso nódulos y peso raíz) para variedad Cimarrón (Ensayo I) inoculada con seis aislados silvestres y comparada con inoculante comercial (COM); cepas control: UPM 8026 (*R. etli*), CIAT 899 (*R. tropici*) y TAL 1121 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) y un testigo sin inocular. Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Según los resultados obtenidos en este ensayo se pre seleccionaron los mejores tratamientos correspondientes a: Aurora 15.3 de *R. leguminosarum*, Sta. Bárbara 21.3 de *R. etli* y cepa control UPM 8026 (*R. etli*).

Ensayo II: Variedad Apolo INIA

La variedad Apolo INIA es la de mayor importancia para el consumo de vaina verde en Chile. Se caracteriza por presentar un hábito de crecimiento determinado arbustivo, tipo I, donde el tallo principal y las ramas secundarias terminan en una inflorescencia desarrollada. Cuando esta inflorescencia está formada, el crecimiento del tallo y de las ramas generalmente se detienen. En general el tallo es fuerte, permaneciendo erecto hasta la madurez de cosecha, con un bajo número de nudos. Es una variedad precoz, la cual puede alcanzar entre 64 a 70 días desde siembra a cosecha en verde (Alvarado, 2004).

En el Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos para esta variedad, para los distintos parámetros previamente mencionados. Específicamente en lo que se refiere a proteína y clorofila, los valores mínimos fueron obtenidos por el inoculante comercial, Ñiquén 14.3 de *R. leguminosarum* y el testigo, diferenciándose significativamente de Aurora 60.3 de *R. leguminosarum* que presentó los más altos valores. Por tanto, en este caso y para estos parámetros, el inoculante comercial presentó un mal comportamiento. Esta situación cambia para el caso de materia seca, puesto que el inoculante comercial mostró los valores

más altos tanto a nivel de peso seco aéreo, de nódulos y de raíz, tal como ocurrió en la variedad Cimarrón (ensayo I). Además, para peso seco total, sólo el tratamiento testigo se diferenció significativamente del inoculante comercial (Figura 4). Este hecho podría estar asociado a que en la variedad Apolo INIA, al ser de tipo I y precoz, tiende a una rápida acumulación de materia seca, y al tratarse de una leguminosa que se cosecha en estado de vaina verde y en períodos breves, el aporte de la nutrición nitrogenada proveniente de la fijación podría ser menor (Alvarado, 2004). Estudios realizados por Hardarson (1999) donde evaluó 29 variedades de frejol bajo condiciones de campo en Chile, mostraron que las de hábito de crecimiento tipo III fueron las que reportaron la mayor capacidad de fijación de nitrógeno equivalente a 45-115 kg•N•ha⁻¹, mucho más que los tipos I y II, cuyos valores fueron de 40-55 kg•N•ha⁻¹ y 25-75 kg•N•ha⁻¹, respectivamente.

Cuadro 4. Peso seco aéreo, de raíz y nódulos, número de nódulos, clorofila 1, clorofila 2 y proteína para cada tratamiento en variedad Apolo INIA.

Tratamiento	Peso aéreo g maceta ⁻¹	Peso de raíz g maceta ⁻¹	Peso de nódulos g maceta ⁻¹	Número de nódulos maceta ⁻¹	Clorofila 1 ugcm ⁻²	Clorofila 2 ugcm ⁻²	Proteína ugcm ⁻²
I Comercial	3.67 a ^z	0.87 a ^z	0.41 a ^z	514.5 bcde ^z	15.7 bc ^z	22.8 c ^z	274.2 c ^z
<i>R. tropici</i>	3.19 ab	0.58 bc	0.17 c	625.9 abc	17.6 ab	28.2 ab	352.1 b
Aurora 60.3	3.02 ab	0.52 bc	0.22 c	385.6 de	21.2 a	28.7 ab	428.5 a
Antumapu 12.3	2.95 ab	0.42 c	0.15 cd	385.1 de	16.8 bc	30.0 a	340.3 bc
<i>R. etli</i>	2.84 ab	0.53 bc	0.19 c	352.0 e	17.4 abc	26.3 abc	299.2 bc
Aurora 15.3	2.82 ab	0.52 bc	0.18 c	461.0 cde	17.7 ab	26.0 abc	294.3 bc
<i>R. leguminosarum</i>	2.82 ab	0.50 bc	0.18 c	563.0 bcd	18.5 ab	27.0 abc	394.3 bc
Santa Bárbara 21.3	2.58 b	0.63 abc	0.31 b	814.5 a	16.6 bc	24.8 bc	288.8 bc
Ñiquen 17.3	2.36 b	0.51 bc	0.17 c	569.1 bcd	16.9 bc	23.7 c	355.9 ab
Ñiquen 14.3	2.33 b	0.64 abc	0.08 d	687.0 ab	14.8 bc	10.3 d	155.1 d
Testigo	2.17 b	0.72 ab	-	-	13.5 c	10.5 d	141.6 d

^z Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para cada variable. Cepas control: *Rhizobium etli* (UPM 8026), *Rhizobium tropici* (CIAT 899) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (TAL 1121).

El número de nódulos no es un factor determinante en la eficiencia de fijación, puesto que la planta puede tener muchos nódulos, pero estos no estar activos (rojos, por actividad de la leghemoglobina). También puede ocurrir que una planta tenga pocos nódulos con una alta actividad y otra con muchos nódulos pero poco eficientes. En el caso del tratamiento Santa Bárbara 21.3 de *R. etli*, presentó un gran número de nódulos en comparación con los demás tratamientos, con un peso de 0.31 g•maceta⁻¹ y no fue sobresaliente en la fijación de nitrógeno. Por el contrario, para el tratamiento Aurora 60.3 de *R. leguminosarum* presentó menor número de nódulos y mayor peso, además se obtuvieron altos valores para clorofila y proteína, lo que muestra una buena eficiencia; siendo el tratamiento más sobresaliente en la fijación de nitrógeno para este ensayo (Cuadro 4).

El peso total de cada tratamiento se muestra en la Figura 4, observándose diferencias significativas entre tratamientos. Las plantas tratadas con inoculante comercial fueron las que presentaron valores más altos, siendo significativamente igual sólo con la cepa control

CIAT 899 (*R. tropici*) y Aurora 60.3 de *R. leguminosarum*. El resto de los tratamientos no se diferenciaron significativamente del testigo (sin inocular).

A partir de los resultados se puede inferir que bajo las condiciones del presente ensayo y para esta variedad, la inoculación con cepas silvestres de rizobios no aumenta la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno, ya que en ninguno de los tratamientos los resultados fueron superiores a las plantas inoculadas con inoculante comercial. Esto, al igual que el ensayo anterior, se explicaría ya que el inoculante comercial se fabrica con una mezcla de bacterias, a diferencia de los otros tratamientos, los cuales estaban formados por un solo tipo de bacterias.

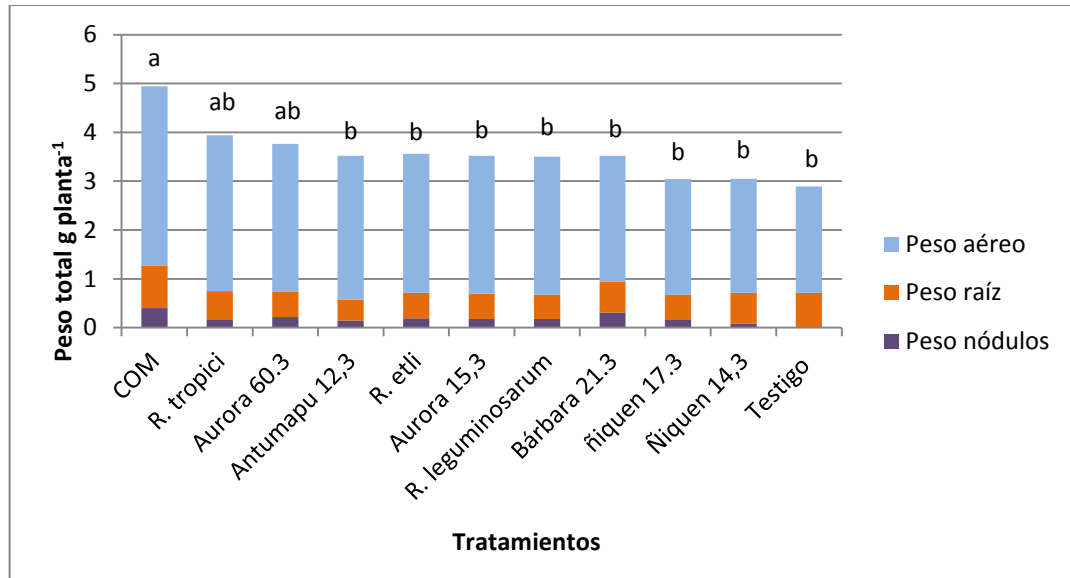


Figura 4. Peso seco total por planta (peso aéreo, peso nódulos y peso raíz) para variedad Apolo INIA (Ensayo II) inoculada con seis aislados silvestres y comparada con inoculante comercial (COM); cepas control: UPM 8026 (*R. etli*), CIAT 899 (*R. tropici*) y TAL 1121 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), y un testigo sin inocular. Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Según los resultados obtenidos en este ensayo se pre seleccionaron los mejores tratamientos correspondientes a: Aurora 60.3 de *R. leguminosarum*, Antumapu 12.3 de *R. etli* y cepa control CIAT 899 de *R. tropici*.

Ensayo III: Variedad Torcaza INIA

La variedad Torcaza INIA se utiliza actualmente para consumo de grano seco en Chile. Se caracteriza por presentar un hábito de crecimiento indeterminado, semi erecto, tipo III, pero con menor producción de guía en comparación a la variedad Cimarrón y cuyo ciclo se completa entre 115 y 118 días desde la siembra a la madurez de la cosecha (Tay *et al.*, 1997).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos de la variedad Torcaza INIA. El aislado Ñiquén 14.3 de *R. leguminosarum* junto al testigo, mostraron para gran parte de los parámetros evaluados los valores más bajos, siendo en la mayor parte de los casos significativamente distintos a Aurora 15.3 de *R. leguminosarum*, inoculante comercial y Ñiquén 17.3 de *R. tropici*, los cuales se consideran más eficientes para esta variedad. Se pudo apreciar, además, que a nivel de proteínas, la cepa control UPM 8026 (*R. etli*) y el aislado Santa Bárbara 21.3, ambos pertenecientes a la especie *R. etli*, tendieron a mostrar un mejor comportamiento que en los demás parámetros. En general, no destaca ningún tratamiento en particular, los resultados para cada medición son parejos, en comparación a los ensayos I y II, donde se apreciaron diferencias.

Cuadro 5. Peso seco aéreo, de raíz y nódulos, número de nódulos, clorofila 1, clorofila 2 y proteína para cada tratamiento en variedad Torcaza INIA.

Tratamiento	Peso aéreo g maceta ⁻¹	Peso de raíz g maceta ⁻¹	Peso de nódulos g maceta ⁻¹	Número de nódulos maceta ⁻¹	Clorofila 1 ugcm ⁻²	Clorofila 2 ugcm ⁻²	Proteína ugcm ⁻²
Aurora 15.3	4.48 a ^z	0.72 ab ^z	0.24 bc ^z	715.4 abc ^z	22.8 a ^z	21.3 bcde ^z	309.0 ab ^z
I Comercial	4.36 a	0.87 a	0.37 a	791.5 a	19.6 ab	27.1 abc	277.1 ab
<i>R leguminosarum</i>	4.02 a	0.56 b	0.26 bc	747.9 ab	19.6 ab	28.1 ab	266.3 ab
Ñiquen 17.3	3.83 a	0.66 ab	0.20 c	513.6 de	16.3 bc	29.5 a	303.4 ab
Antumapu 12.3	3.83 a	0.58 b	0.23 c	616.5 bcd	22.8 a	23.2 abcd	324.9 ab
Aurora 60.3	3.55 ab	0.61 b	0.21 c	623.4 bcd	20.6 ab	21.5 bcde	280.8 ab
Sta Bárbara 21.3	3.61 ab	0.55 b	0.21 c	583.4 cde	20.8 ab	20.5 cde	333.3 ab
<i>R tropici</i>	3.53 ab	0.61 ab	0.20 c	570.3 cde	18.7 abc	18.8 de	310.8 ab
<i>R. etli</i>	3.47 ab	0.53 b	0.32 ab	439.0 e	18.7 abc	24.1 abcd	357.9 a
Testigo	2.75 b	0.70 ab	-	-	9.9 d	8.5 f	140.4 c
Ñiquen 14.3	2.71 b	0.68 ab	0.11 d	465.5 e	14.4 cd	14.8 ef	224.4 bc

^z Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para cada variable. Cepas control: *Rhizobium etli* (UPM 8026), *Rhizobium tropici* (CIAT 899) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (TAL 1121).

En la Figura 5, se presenta la producción de materia seca total (aérea, raíz y nódulos) para cada tratamiento. Como se observa, el inoculante comercial no presentó los mejores resultados, como ocurrió en los ensayos I y II (Figuras 4 y 5); se observa una cierta homogeneidad en los resultados de los distintos tratamientos, los cuales a su vez fueron significativamente diferentes a los tratamientos Ñiquen 14.3 de *R. leguminosarum* y el testigo.

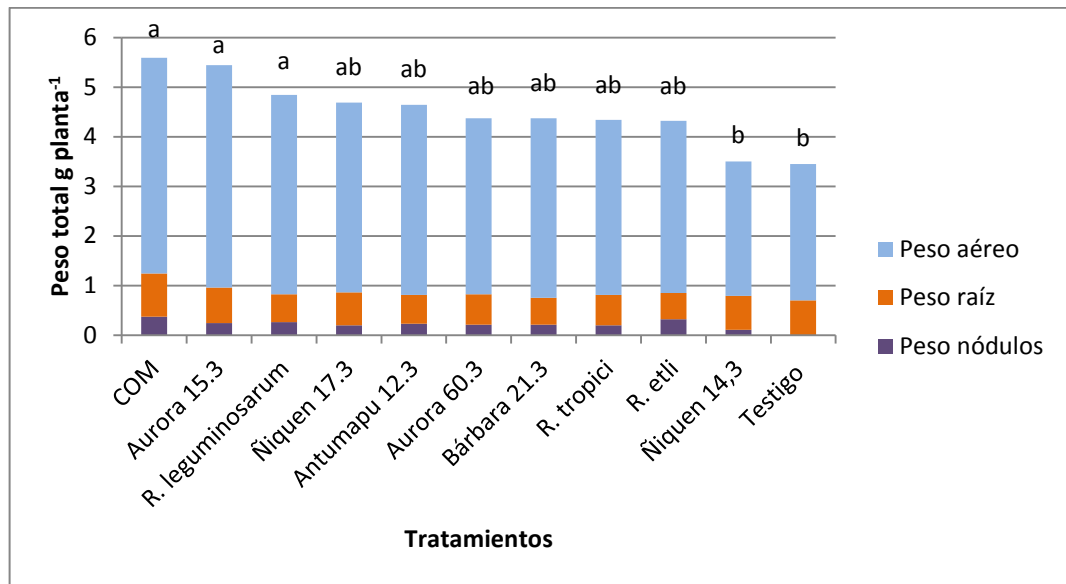


Figura 5. Peso seco total por planta (peso aéreo, peso nódulos y peso raíz) para variedad Torcaza INIA (Ensayo III) inoculada con seis aislados silvestres y comparada con inoculante comercial (COM); cepas control: UPM 8026 (*R. etli*), CIAT 899 (*R. tropici*) y TAL 1121 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), y un testigo sin inocular. Valores con letras iguales no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Basado en estos resultados y teniendo en cuenta que ninguno fue sobresaliente, los tratamientos seleccionados fueron: Aurora 15.3 de *R. leguminosarum*, Ñiquen 17.3 de *R. tropici* y Antumapu 12.3 de *R. etli* como los tres tratamientos que arrojaron los mejores resultados.

Efecto huésped y eficiencia de fijación de nitrógeno

En el Cuadro 6, se muestran los tres mejores tratamientos obtenidos del ensayo I, II y III, y se comparan con el inoculante comercial. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza en forma independiente para cada ensayo. Como se dijo anteriormente, cada uno de los aislados ha sido clasificado según especie, y por lo tanto a través de este estudio se podría determinar si existe o no efecto huésped, es decir, que una determinada especie de rizobio se comporte mejor con una determinada variedad de frejol (Hardarson, 1993; Herrera-Cervera *et al.*, 1999). El reconocimiento o interacción entre variedad de frejol y rizobio es un proceso complejo en el que intervienen numerosos factores genéticos y ambientales. Se ha determinado que existe potencial para el incremento de la fijación de nitrógeno en frejol mediante una adecuada combinación entre cepas y variedades (Mora, 1995).

Para la variedad Cimarrón, según los parámetros evaluados, ninguno de los dos aislados sobresale, sin ser mejores que el inoculante comercial, observándose eso sí que las bacterias

pertenecientes a *R. etli* tuvieron un mejor comportamiento en términos de proteína y clorofila, parámetros asociados junto al peso seco a una mayor eficiencia de fijación biológica de nitrógeno. Además, el contenido de materia seca, clorofila y proteína son los indicadores que discriminan más y se asocian más significativamente con la eficiencia de fijación biológica de nitrógeno (Baijukya y Semu, 1998). Por lo tanto, no fue posible encontrar efecto huésped de algún aislado para esta variedad.

Para variedad Apolo INIA (Cuadro 6), el aislado que se comportó mejor fue Aurora 60.3 de *R. leguminosarum* ya que presenta significativamente mayor contenido de proteína y clorofila 1, y según el contenido de materia seca total fue similar estadísticamente al observado por Aurora 15.3 de *R. leguminosarum*. Por lo que en este caso *R. leguminosarum* podría tener mejor comportamiento en la variedad Apolo INIA y se infiere que para esta cepa silvestre existe un efecto huésped sobre esta variedad, pero al igual que Cimarrón, el inoculante comercial superó en rendimiento para esta variedad (Figura 6).

Para la variedad Torcaza INIA (Cuadro 6), los tres aislados silvestres presentan buen comportamiento. Esta variedad no presentó efecto huésped, ya que los distintos aislados arrojaron resultados similares, no hubo ningún aislado silvestre que se haya destacado más que otro, incluso para el caso del inoculante comercial, los resultados obtenidos son similares al resto de los aislados. Por lo tanto, en condiciones de campo los aislados silvestres o inóculos formados por mezcla de aislados deberían dar buenos rendimientos si son inoculados en esta variedad.

Cuadro 6. Clorofila 1, clorofila 2, proteína y peso total para los tres mejores tratamientos de cada ensayo en comparación con los valores obtenidos del tratamiento con inoculante comercial.

Ensayo/ Variedad	Cepas	Especie	Peso total g maceta ⁻¹	Clorofila 1 ugcm ⁻²	Clorofila 2 ugcm ⁻²	Proteína ugcm ⁻²
Cimarrón	UPM 8026	<i>R. etli</i>	3.8 ab ^z	24.2 a ^z	33.7 a ^z	493.3 a ^z
	Aurora 15.3	<i>R. leguminosarum</i>	3.4 ab	24.8 a	24.5 b	365.2 b
	Sta. Bárbara 21.3	<i>R. etli</i>	2.7 b	20.3 a	27.0 ab	385.3 b
	I Comercial		4.4 a	21.7 a	26.5 ab	366.5 b
Apolo	Aurora 60.3	<i>R. leguminosarum</i>	3.8 ab	21.2 a	28.7 a	428.5 a
	CIAT 899	<i>R. tropici</i>	3.9 ab	17.6 b	28.2 a	352.1 b
	Antumapu 12.3	<i>R. etli</i>	3.5 b	16.8 b	30.0 a	340.3 b
	I Comercial		5.0 a	15.7 b	22.8 b	274.2 c
Torcaza	Ñiquén 17.3	<i>R. tropici</i>	4.7 ab	16.3 b	28.5 a	303.4 a
	Antumapu 12.3	<i>R. etli</i>	4.6 ab	22.8 a	23.2 ab	324.9 a
	Aurora 15.3	<i>R. leguminosarum</i>	5.4 a	20.8 ab	21.3 b	309.0 a
	I Comercial		5.6 a	19.6 ab	27.1 ab	277.1 a

^z Valores con letras iguales en sentido vertical no presentaron diferencias significativas. Prueba de Tuckey ($p \leq 0.05$) para cada variable. Cepas control: UPM 8026 (*Rhizobium etli*) y CIAT 899 (*Rhizobium tropici*).

Estudios realizados en campo con cepas de rizobios altamente efectivas indican que solo el 10% de los nódulos son formados por las cepas introducidas y al parecer estas son

desplazadas fácilmente por las cepas nativas, que son habitantes naturales y escasos del suelo. Estas cepas pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo y su población se incrementa debido al efecto rizosférico (Mora, 1995). Por tal motivo, si al seleccionar, dentro de los aislados silvestres estudiados, a los más eficientes, estos podrían presentar un mejor comportamiento en campo en comparación a uno introducido de otra zona, sobre todo si esa bacteria está siendo utilizada en el mismo lugar de origen donde ya está adaptada. Por lo tanto, al determinar el aislado silvestre que tiene mejor afinidad con cada una de las tres variedades de frejol, y como cada aislado silvestre proviene de una localidad específica (Cuadro 1), se puede inferir que se obtendrán mejores rendimientos si se siembra la variedad de frejol inoculada con el aislado que presente mejor afinidad a esa variedad. Así el aislado Aurora 60.3 proveniente de la localidad de San Agustín de Aurora, de la región del Maule, potenciaría su eficiencia de fijación si se siembra en esa zona la variedad Apolo INIA para consumo en fresco.

Es muy importante tomar en cuenta las características de los suelos al momento de elegir una variedad de frejol a sembrar en un determinado lugar. En general, la distribución y la diversidad genética de los aislados silvestres chilenos de rizobios, están influenciados por los niveles de pH en los suelos (Cañete, 2007), así por ejemplo, en suelos alcalinos, como los de Antumapu (pH 8.2) se pueden encontrar mayoritariamente cepas del tipo *R. etli*, y en suelos ligeramente ácidos, como los de San Agustín de Aurora (pH 6.0), se pueden encontrar con mayor frecuencia cepas del tipo *R. leguminosarum*. Por otra parte, y también proveniente del estudio de Cañete (2007), se observó que en suelos ácidos, como los encontrados en la localidad Ñiquen (pH 5.2), predominan mayoritariamente aislados Ñiquen 17.3 del tipo *R. tropici*. Estudios de Aguilar *et al.* (2001), avalan que la cepa CIAT 899 (*R. tropici*) presenta un muy buen comportamiento simbiótico bajo condiciones de estrés, tales como suelos ácidos y altos niveles de aluminio. En el presente estudio no se encontró efecto huésped entre *R. tropici* y alguna de las variedades de frejol estudiadas; las razones de ello podrían estar relacionadas con el hecho que el medio de crecimiento tenía pH cercano al neutro, por tal motivo podría ser recomendable llevar a cabo estudios con distintos niveles de pH y evaluar bajo esas condiciones el efecto huésped.

Dentro de las características de los suelos, la salinidad, es otra condición ambiental que limita la producción. La concentración de sal reduce la simbiosis rizobio-leguminosa y por ende la fijación biológica de nitrógeno, además, disminuye el tamaño de nódulos, se reduce considerablemente el peso seco, tanto de la parte aérea como de raíces y hay inhibición de la actividad nitrogenasa, por disminución del traspaso de oxígeno al nódulo. Se considera a la soya (*Glycine max*) y el haba (*Vicia faba*) como legumbres tolerantes a la salinidad, mientras que el garbanzo (*Cicer arietinum* L.), la arveja (*Pisum sativum* L.) y el frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) son sumamente sensibles a las concentraciones de sal (Bouhmouch *et al.*, 2005). Estudios en variedad de frejol Coco Blanc indican que la salinidad afectó el crecimiento y desarrollo de nódulos, donde en ausencia de NaCl, las leguminosas tienden a una acumulación de peso seco considerablemente más alto. Además, se evidencia que las leguminosas cuando realizan fijación biológica de nitrógeno son más sensibles a la concentración de sal que cuando dependen de la fertilización mineral (Serraj *et al.*, 1994).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el efecto negativo de la salinidad; entre ellas: el suministro de fotosintetizados a los nódulos, suministro reducido de sustratos respiratorios al bacteroide y alteraciones en la barrera de difusión de oxígeno (Bouhmouch *et al.*, 2005). Según Delgado *et al.* (1994), estas limitaciones en la fijación de nitrógeno causadas por la salinidad están dadas por factores exógenos y podría ser resuelta por la selección y generación de variedades mejoradas de frejol.

En cuanto al inoculante comercial, el ensayo I (Cimarrón) presentó una gran cantidad de nódulos, sin embargo, este hecho sólo se acentúa para esta variedad, puesto que, en los otros dos ensayos (Apolo INIA y Torcaza INIA) el número de nódulos fue igual al resto de los tratamientos o incluso menor, como ocurrió en el ensayo II (Cuadro 4). Cabe destacar, que los tratamientos con inoculante comercial fueron aplicados en base a turba, en tanto, el resto de los tratamientos fueron aplicados en un sustrato líquido, lo que pudo haber influenciado en el número de nódulos, al ser la turba un sustrato que puede presentar mejores condiciones para la mantención de las bacterias en el tiempo (Peña-Cabriales, 2000). Es importante indicar, además, que los resultados fueron obtenidos bajo condiciones controladas, y sin la competencia de otro grupo de bacterias con las cuales interactuar; en tanto que, bajo condiciones de campo, este inoculante pudiera ser menos competitivo que los inoculantes compuestos por cepas silvestres, y sobre todo si estos son utilizados en su lugar de origen. Probablemente los inoculantes líquidos, constituidos por un sólo aislado, podrían ser potenciados si se aumenta el número de aislados en el inoculante, llegando a obtener una mezcla lo suficientemente eficiente, incluso mejor que el inoculante comercial. Un estudio realizado por Kyei-Boahen (2005), donde comparó la eficiencia de cepas individuales y de una multicepa en condiciones controladas y campo, demostró que la multicepa puede reducir el riesgo de una falla en la colonización de la raíz o fijación de nitrógeno en condiciones de estrés, es decir, su uso permite abarcar una mayor amplitud de condiciones ambientales. Labbé (2008), recomienda fabricar un inoculante en base a otro sustrato, con mezcla de aislados silvestres y probar si de esa forma se obtienen mejores resultados.

El inoculante líquido también presenta una ventaja en su formulación, puesto que este se podría distribuir en una mayor superficie de contacto con las raíces, permitiendo con ello, que los nódulos no se localicen concentradamente de las raíces, como ocurre con el inoculante en base a turba (Apéndice 1), en el cual los nódulos crecen sólo en el área donde se aplicaron las bacterias (Amager *et al.*, 1997). En este sentido y según resultados de un estudio realizado por Hardarson (1999) en el cual varía el procedimiento de inoculación, se estudió la profundidad en que se aplicó el inóculo y la importancia de los nódulos en las raíces laterales. El inoculante colocado sobre la semilla o en el surco de siembra probablemente no alcanza la parte más profunda del sistema radical, no logrando con ello potenciar la fijación a través del aporte que hacen los nódulos en las raíces laterales.

No necesariamente, una gran cantidad de nódulos se traduce en un mayor peso de nódulos, así igualmente, una mayor habilidad de las cepas para formar nódulos no indica mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno (Gómez *et al.*, 1998). Por ejemplo, el tratamiento con inoculante comercial del ensayo I (Cuadro 3) originó un gran número de nódulos (838.25

nódulos) y el peso total de nódulos también fue alto ($0.39 \text{ g} \cdot \text{maceta}^{-1}$); sin embargo, se observó lo opuesto, en el tratamiento *R. tropici* del ensayo II (Cuadro 4), donde plantas con gran número de nódulos (625.88 nódulos) originaron plantas con un bajo peso ($0.17 \text{ g} \cdot \text{maceta}^{-1}$). Este hecho se debe a la presencia de gran número de nódulos inactivos de una coloración pálida y muy pequeños. Por lo tanto, el número de nódulos no es un buen parámetro para medir eficiencia de fijación de nitrógeno. Estudios realizados por Baijukya y Semu (1998) muestran el peso de nódulos a los 28 días de la siembras (igual período que el presente estudio), donde se obtuvieron pesos secos entre 0.09 y 0.27 g de nódulos por planta. El número varía según el estado de desarrollo de la planta; en este sentido, estudios han demostrado que la actividad nodular alcanza su mayor nivel durante la floración, para caer bruscamente cuando comienza el llenado de granos (Longeri *et al.*, 1999). No obstante, también las diferencias pueden ser atribuidas a la variedad de frejol utilizada.

En los tres ensayos se observó que los tratamientos que contemplan la inoculación con Ñiquen 14.3 de *R. leguminosarum*, presentaron una fijación muy pobre y poco efectiva, baja acumulación de materia seca, proteína y clorofila, casi alcanzando los mismos resultados que testigos (sin inocular). Los nódulos para estos tratamientos siempre fueron muy pequeños y amarillentos (Apéndice 1, 2 y 8). Las razones no están claras, pero podrían ser atribuidas a la posibilidad que este aislado haya perdido su plásmido simbiótico y por lo tanto no es capaz de fijar nitrógeno¹. En los tres ensayos, este aislado no sirve para ser utilizado como inoculante ya que no es efectivo.

En cuanto al hábito de crecimiento, hay muchos estudios donde se comparan los rendimientos de genotipos indeterminados y determinados. En general, la mayor parte concuerdan en que los genotipos indeterminados presentaron un mayor rendimiento y mostraron una mayor estabilidad. Al parecer esta diferencia se debería a que los genotipos de hábito de crecimiento determinado, como la variedad Apolo INIA, poseen pocos nudos antes de la floración, desarrollan una escasa área foliar, tienen un corto periodo reproductivo y son más precoces (Rodiño *et al.*, 2004). Se puede apreciar esta diferencia entre Apolo INIA (Figura 4), de genotipo determinado y Torcaza INIA (figura 5), de genotipo indeterminado, donde el contenido de materia seca total en Torcaza INIA es mayor en todos los tratamientos.

El frejol sigue siendo una de las leguminosas pobres en el establecimiento de una simbiosis efectiva y en su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, debido principalmente a la presencia en los suelos de cepas silvestres de poca eficiencia y altamente competitivas en el proceso de infección. Por este motivo, se sugiere inocular con cepas seleccionadas efectivas y competitivas, realizar pruebas de estos mismos aislados en otras variedades y/o probar mezclas de aislados para fabricar inoculantes más efectivos (Gómez *et al.*, 1998).

¹ Baginsky, C. 2012, oct. Fijación de nitrógeno. [Entrevista personal]. Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

En la actualidad la práctica de inoculación es muy utilizada en toda Latinoamérica, abarcando grandes extensiones y utilizando diversas variedades de frejol. No obstante, el desarrollo científico de los últimos años ha permitido establecer nuevas potencialidades de biofertilización, no tan sólo para leguminosas, sino también para cereales, producciones hortícolas y las forestales, utilizando bacterias y hongos. Esto abre un abanico de posibilidades para la aplicación de este tipo de tecnología a prácticamente todos los cultivos de importancia nacional e internacional. La biofertilización es aplicable hoy día a prácticamente cualquier especie de interés agronómico y proporciona una serie de ventajas frente a la aplicación de fertilizantes químicos, entre otras la reducción de costos de producción, el aumento de productividad y de la calidad de los productos finales, la reducción de la dependencia externa por fertilizantes, aumento de la estabilidad de las producciones, y una significativa reducción de impacto ambiental de la agricultura (San Juan, 2009).



Figura 6. Es posible observar diferencia entre plantas de frejol variedad Apolo INIA, inoculadas con inoculante comercial, cepa control TAL 1121 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) y testigo sin inocular.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible concluir que:

El inoculante comercial resulta ser más efectivo en la fijación biológica de nitrógeno en comparación a los aislados silvestres evaluados en este estudio.

Para las variedades Cimarrón y Torcaza INIA no hay efecto huésped, sólo para la variedad Apolo INIA existe efecto huésped, siendo el aislado Aurora 60.3 de *R. leguminosarum* el más efectivo.

Se recomienda sembrar la variedad Apolo INIA en la localidad de San Agustín de Aurora, región del Maule, ya que existen en el suelo mayoritariamente cepas silvestres de Aurora 60.3 de *Rhizobium leguminosarum* eficientes capaces de nodular esta variedad de frejol bajo esas condiciones de suelo.

Se recomienda la fabricación de un inoculante que tenga una mezcla de aislados silvestres (dos o tres) que puedan potenciar su efecto benéfico de fijación de nitrógeno, donde la capacidad fijadora de cada aislado se exprese en forma satisfactoria, ya sea en condiciones controladas como en campo. Por ejemplo, para la variedad Torcaza INIA, inocularla con una mezcla entre Aurora 15.3 de *R. leguminosarum*, Ñiquén 17.3 de *R. tropici* y Antumapu 12.3 de *R. etli*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, O.M.; M.V. López y P.M. Riccillo. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J Biotechnol*, 91: 181-188.
- Alvarado, K. 2004. Evaluación de líneas experimentales de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) de hábito de crecimiento arbustivo para producción de poroto granado. Tesis de Agronomía. Universidad de las Américas. Santiago, Chile. 44p.
- Amarger, N.; V. Macheret y G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov y *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 996-1006.
- Andrade, D.S.; P.J. Murphy y K.E Giller. 2002. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acidic soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl Environ Microbiol*, 68: 4025-4034.
- Aparicio, P.; C. Arrese y M. Becana. 1999. Fijación de nitrógeno: 193-212. In: Azcon-Bieto, J. y M. Talón. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Ediciones Interamericana McGraw-Hill. 517p.
- Azcon-Bieto, J. y M. Talón. 1999. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Ediciones Interamericana McGraw-Hill. Cap. 16.
- Baijukya, F. y E. Semu. 1998. Effects of kocide 101 on the bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Rhizobium symbiosis*. *Soil and Science*, 48: 175-183.
- Bordeleau, L.M. y D. Prevost. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161: 115-125.
- Bouhmouch, I.; B. Souad-Mouhsine; B. Fatiha y A. Jamal. 2005. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species in the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. In: *Journal of Plant Physiology*, 162: 1103-1113.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-252.
- Buttery, B.R.; S.J. Park y D.J. Hume. 1992. Potencial for increasing nitrogen fixation in grain legumes. *Can. Plant Sci*, 72: 323-349.
- Cañete, A. 2007. Caracterización molecular de aislados silvestres chilenos de *Rhizobium* a través del uso de marcadores moleculares basados en amplificación por PCR-RFLP. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 33p.

Castellanos, J.; J.J. Peña; V. Badillo; A. Aguilar; J.A. Acosta y A. Rodríguez. 1998. Características agronómicas del frijol asociadas a la capacidad de fijación de N₂ en el centro de México. *Terra*, 16(4): 351-357.

Delgado, M.J.; F. Ligeró; C. Lluch. 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol Biochem*, 26: 371-376.

Fernández, M. 2003. Manual de Nodulación. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.nitragin.com.ar>> Consultado el: 26 de septiembre de 2012.

Graham, P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y nodulation under adverse soil condition. *Can. J. Microbiol*, 38: 475-484.

Graham, P.H.; K. Draeger; M.L. Ferry; J.M. Conroy; B.E. Hammer; E. Martínez. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol*, 40: 198-207.

Graham, P.H. y C.P. Vance. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Fiel Crops Res*, 35: 93-106.

Gómez, L.; G. Hernández y T. Sánchez. 1998. *Agronomía Mesoamericana*, 9(1): 93-97.

Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 152: 1-17.

Hardarson, G. 1999. Métodos para aumentar la fijación simbiótica de nitrógeno. Pp.1-17. In: Peña-Cabriales, J.J. y Zapata, F. (eds) Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en el frijol común en América Latina. Improsa, México. 203p.

Hardarson, G.; F.A. Bliss; R. Cigales-Rivero y R. Henson. 1999. Variación genotípica en la fijación biológica de nitrógeno en el frijol común. Pp.67-78. In: Peña-Cabriales, J.J. y Zapata, F. (eds) Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en el frijol común en América Latina. Improsa, México. 203p.

Herrera-Cervera, J.; J. Caballero-Mellad; G. Laguerre; H. Tichy; N. Amarger; N. Requena; E. Martínez-Romero; F. Olivares y J. San Juan. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soli. *FEMS. Microbiol Ecol*, 30: 87-97.

Jadúe, Y. 1993 Evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* y efecto de inoculación y fertilización nitrogenada en dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de vaina cilíndrica. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 50p.

Kyei-Boahen, S.; T. Nleya; R. Hynes y F. Walley. 2005. Single and multistrain rhizobial inocula for pinto and black bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 1679-1693.

Labbé, S. 2008. Caracterización molecular de aislados silvestres de *Rhizobium* sp. y evaluación de la eficiencia de fijación simbiótica de nitrógeno en plantas de poroto. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 53p.

Lichtenthal, H. y A.R. Wellbur. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603: 591-592.

Longeri, L.; I. Vidal y A. Herrera. 1999. Fijación y removilización de nitrógeno a través del ciclo de desarrollo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), usando la metodología de 15N. In: Peña_Cabriales y Zapata, F. Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en el frejol común en América Latina. Improsa, México. 203p.

Mora, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rizobium leguminosarum* bv *phaseoli* eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 6: 68-74.

ODEPA c(Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). Temporada Agrícola. [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://www.odepa.gob.cl>> Consultado el: 07 de enero de 2013.

Pascual, J. 2008. Fijación Biológica de Nitrógeno, Estación Experimental de Zaidín, Granada. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.eez.csic/olivarez>> Consultado el: 08 de febrero de 2008.

Peña-Cabriales, J. 2000. La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de técnicas isotópicas. Improsa. México. 120p.

Peña-Cabriales, J. y F. Zapata. 1999. Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en el frejol común en América Latina. Improsa, México. 203p.

Rodiño, AP.; M. Santalla; J. Drevon y A. Deron. 2004. Fijación simbiótica de nitrógeno de poblaciones de judía de la península Ibérica. *Actas de Agricultura 41, II Congreso de Mejora Genética de Plantas*. 348-345.

San Juan, J. 2009. Bacterias y hongos como fertilizantes biológicos: situación actual y perspectivas. VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. 25-26.

Serraj, R.; G. Roy y J. Drevon. 1994. Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiol Plantarum*, 91: 161-168.

- Somaseragan, P. y B. Bohlool. 1990. Single-strain versus multistrain inoculation: Effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean and bean. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11): 3298-3303.
- Soussana, J.F. y U.A. Hartwig. 1996. The effect of elevated CO₂ on symbiotic N₂ fixation: a link between the carbon y nitrogen cycles in grassy ecosystems. *Plant and Soil*, 187: 321-332.
- Stephens, J.H.G. y H. Rask. 2000. Inoculant production y formulation. *Field Crops Res*, 65: 249-258.
- Tay, J.; M. Paredes; A. Vega; A. Valenzuela y F. Venegas. 1997. Torcaza INIA. Nueva variedad de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) de grano tórtola con planta semi erecta. *Agricultura Técnica, Chile*, 57(4): 302-303.
- Urzúa, H. 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32(2): 133-150.
- Valverde, A.; J.M. Igual; A. Peix; E. Cervantes y E. Velázquez. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. Nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2631-2637.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Ltd. v15.

ANEXOS

Anexo I: Solución Leonard definida por Vincent (1970)

Se prepara con agua desionizada estéril.

- ClK $29.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- K_2HPO_4 $69.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- $\text{SO}_4 \text{ Mg } 7\text{H}_2\text{O}$ $98.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Citrato férrico $1.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Oligoelementos
 - $\text{Cu SO}_4 5\text{H}_2\text{O}$ $0.078 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 - $(\text{NH}_4)_6 \text{ Mo } 7 \text{ O}_2 4\text{H}_2\text{O}$ $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 - $\text{Zn SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ $0.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 - $\text{H}_3 \text{ BO}_3$ $1.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 - $\text{Mn SO}_4 7\text{H}_2\text{O}$ $2.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Para un bidón de 15 L

- 37.5 mL de fosfatos.
- 37.5 mL de KCl.
- 37.5 mL de $\text{SO}_4 \text{ Mg } 7\text{H}_2\text{O}$.
- 15 mL de citrato férrico.
- 7.5 mL de oligoelementos.
- 5.16 g de $\text{SO}_4 \text{ Ca}$ directamente al bidón.

Anexo II: Medio Extracto Levadura – Manitol

Medio de cultivo para el crecimiento bacteriano YMB (Vincent 1970).

- Manitol $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua destilada.
- Extracto levadura $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua estilada.
- Solución Stok.
 - Sulfatos: 1 mL por cada 100 mL agua destilada.
 - Fosfocloruros: 1 mL por cada 100 mL agua destilada.
- Llevo a pH 6.8 con HCl en pH- metro.

Anexo III: Método de Bradford de extracción de proteínas

Tomo una muestra de 0.385 cm² de disco de hoja, en un mortero la homogenizo con 1000 uL de buffer de extracción (10 mL de buffer + 10 uL de PMSF) y una pisco de PVP. Esta muestra la centrifugo a 500 rpm por 5 minutos a 4 °C, 20 uL de súper nadante es removido y agregado 200 uL de Reactivo de Bradford y 780 uL de agua destilada. La mezcla se mantuvo incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se leyó su absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. El contenido de proteína fue calculado de la curva de calibración (0 – 100 ug de BSA).

Reactivo de Bradford

- 50 mL metanol.
- 50 mg Azul de coomasie 6250.
- 100 mL ácido fosfórico.
- 50 mL agua destilada.

Anexo IV: Método de Lichtenthaler y Wellburn para contenido de clorofila

Tomo una muestra de 0.385 cm² de hoja, en un mortero la homogenizo con 1 mL de etanol al 96% a -20 °C, lo centrifugo a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El supernadante es leído a 665 y 649 nm en espectrofotómetro.

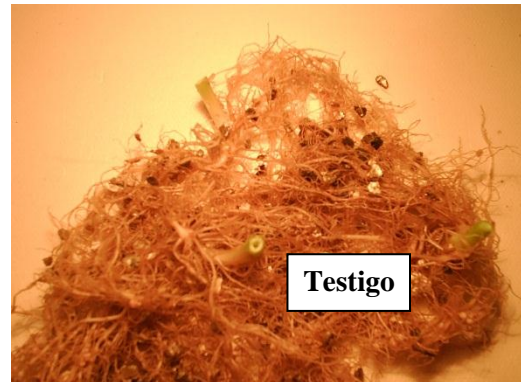
Clorofila a (13.96 • Abs 665) - (6.88 • Abs 649) ug Clorofila/mL.
Clorofila b (24.96 • Abs 649) - (7.32 • Abs 665) ug Clorofila/mL.

APÉNDICES

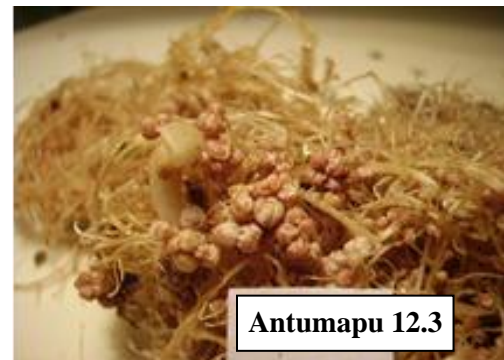
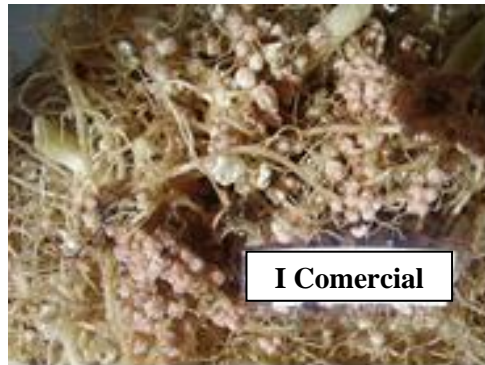
Apéndice I: Nódulos Ensayo I variedad Cimarrón



Apéndice 1. Raíces de frejol variedad Cimarrón, se aprecia diferencia en la cantidad, tamaño y coloración de nódulos entre el testigo, cepas nativas e Inoculante Comercial

Apéndice II: Nódulos Ensayo II variedad Apolo INIA

Apéndice 2. Raíces de frejol variedad Apolo INIA, se aprecia diferencia en la cantidad, tamaño y coloración de nódulos entre el testigo, cepas nativas e Inoculante Comercial.

Apéndice III: Nódulos Ensayo III Variedad Torcaza INIA

Apéndice 3. Raíces de frejol variedad Torcaza INIA, se aprecia diferencia en la cantidad, tamaño y coloración de nódulos entre el testigo, cepas nativas e Inoculante Comercial.

