

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Recuperación de Rhizobacterias del Cultivo de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Linneo)
de San Andrés Tlalamac, Estado de México

Por:

ALONSO YÁÑEZ AMARO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Recuperación de Rhizobacterias del Cultivo de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Linneo)
de San Andrés Tlalamac, Estado de México

Por:

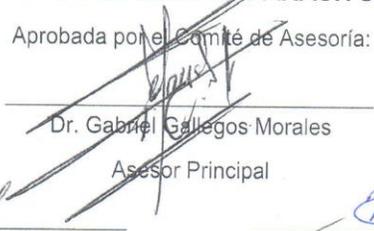
ALONSO YÁÑEZ AMARO

TESIS

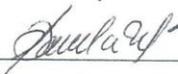
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

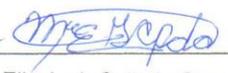
Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Gabriel Gallegos Morales

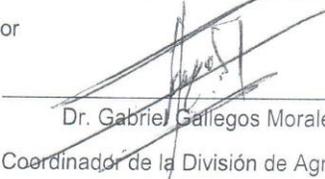
Asesor Principal


Dra. Miriam Desiree Dávila Medina

Coasesor


Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

A **mi Dios**, por haberme dado la Vida, y salud durante todo este tiempo en el cual curse mi carrera profesional, por los momentos gratos, por ayudarme en las malas, por cuidarme y protegerme y ayudarme a salir adelante, por haberme dado la facultad y la fuerzas para así concluir satisfactoriamente mi carrera profesional así como darme la fortaleza para no rendirme ante los problemas que se presentaron durante todo este tiempo en el que estuve lejos de mi familia, por darme la inteligencia, paciencia para continuar adelante.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, principalmente por permitir realizar mi sueño más grande en mi vida, me abrió las puertas y dio oportunidad de ser parte de su comunidad estudiantil, por la calidad y el compromiso educativo que me ofreció durante mi formación profesional, por los valores inculcados profesionalmente, por todo este tiempo que me abrigaste.

Al **Departamento de Parasitología** por los conocimientos inculcados por sus excelentes catedráticos que con su paciencia, actitud y sus consejos, quienes con sus sabios conocimientos hicieron de mi un profesionista lleno de conocimiento, lleno de valores y responsabilidad ante todo para dar solución a los problemas actuales en campo, por su valioso tiempo y dedicación dentro y fuera del aula.

A todos los catedráticos de mi **Alma Terra Mater** por brindarme parte de sus conocimientos y formar parte de mi formación profesional.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales** por permitirme realizar el proyecto, brindarme la oportunidad de realizar esta investigación, así mismo agradezco por los conocimientos impartidos por la orientación.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** que con sus valiosos conocimientos me oriento, coordino, motivo apoyando siempre.

A la **Dra. Mirian Desireé Dávila Medina** por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto tan importante para mí, por su comprensión, apoyo, orientación y coordinación.

Al **Ing. Osvaldo Aguilar Ramírez** por su apoyo y colaboración durante el tiempo de investigación, por el tiempo brindado en laboratorio y campo.

A mis **padres y hermano** por confiar plenamente en mí, por su apoyo brindado en todo este tiempo en lo moral brindando palabras de apoyo, a pesar de la distancia nunca me abandonaron.

DEDICATORIA

A mis padres

Jaime Yáñez Rodríguez te doy mi mayor agradecimiento, por ser la fuente de mi vida gracias padre por ser un gran ejemplo de lucha, valentía, humildad por enseñarme a creer en mí, por demostrarme tu total confianza en todo momento, para poder lograr este sueño, por darme tus sabios consejos, por soportarme en los momentos difíciles de angustia, siempre comprendiéndome alentándome ayudándome a salir de la angustia, compartiendo los logros, las tristezas y todos tus sacrificios por compartir juntos este sueño que hoy se lleva acabo, por tus enseñanzas padre con todo mi amor, cariño te agradezco padre con todo el respeto que te mereces y admiración muchas gracias.

María Victoria Amaro Rojas te doy mi mayor agradecimiento, por ser la principal fuente de mi vida, por ser la fuente de mi inspiración por tu ejemplo a seguir por tu liderazgo, por darme esas palabras de aliento que solo tú sabes cuándo más las necesito, por demostrarme tu apoyo incondicionalmente, a pesar de la distancia siempre has estado ahí para mí, por brindarme tu fuerza, valentía amor de madre, comprensión, por tus sacrificios, tu perseverancia y siempre dándome los mejores consejos, guiándome y haciendo de mí una persona de bien por ser parte de este sueño que hoy se hace realidad gracias madre con todo mi amor, mi cariño te doy las gracias y respeto que te mereces y admiración muchas gracias.

Sin su apoyo incondicional, no habría logrado la meta propuesta, ahora sé que sus sacrificios abran valido la pena. ¡Gracias por darme todo sin esperar nada a cambio!

A mi hermano

Cesar Yáñez Amaro a quien agradezco de lo más profundo de mi corazón. Por ser ejemplo de lucha, valentía, tenacidad, por enseñarme a creer en mí y mirar en mi

Cualidades que no conocía, por ser parte de este gran sueño que con tus sacrificios y palabras de aliento he llegado a la meta, gracias por tu gran amor de hermano y con todo mi cariño y respeto hacia ti te agradezco inmensamente.

A mis amigos

Agradezco por todos los momentos vividos dentro y fuera de mi Alma Terra Mater, por su compañía, apoyo y calidez humana que me brindaron durante todo este tiempo, sin esperar nada a cambio por ser parte de mi gran familia y siempre apoyándome en los momentos difíciles.

A ti **Luz Adilene Castro Ugalde** por tu calidez humana, por tu gran amistad, humildad, apoyo y aquellas palabras de aliento que me daban fuerzas para continuar adelante, en tan poco tiempo te ganaste mi cariño, respeto y admiración, agradezco por tantos momentos vividos llenos de alegrías.

A **Marco Antonio, Rigoberto, Jorge Olivar, Edgardo, Héctor David, Yurimarilu, Nicolás Atanacio, José Luis Arizpe, Jorge Noh, José Gpe, Mario Alberto, Edwin German, Max, José molina, Pedro Pablo.**

Por haber formado parte de mi gran familia narro gracias por su compañía y su apoyo durante todo este tiempo en vivencias dentro y fuera de mi Alma Terra Mater.

A mis tíos **Israel y Roberta** por brindarme apoyo moral, y cuidar de mi cuando lo necesite, por sus palabras de ánimo para salir siempre adelante con todo mi cariño muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	2
HIPÓTESIS.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	3
Antecedentes	3
Generalidades del cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	3
Clasificación botánica del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	4
Descripción botánica del frijol según (Barreiro, 1995).....	4
Planta	4
Raiz	4
Tallo.....	5
Hojas	5
Flores	6
Fruto o Legumbre	6
Importancia del cultivo	6
Producción Nacional de Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en México.....	6
Consumo nacional.....	7
Producción primaria.....	8
Fertilizantes comunes.....	8
Biofertilizantes	8
Que es la Biofertilización	9
Beneficios de la biofertilización.	9
<i>Rhizobium</i> en el cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	9

Características del Género <i>Rhizobium</i>	11
Diversidad de <i>Rhizobium</i>	12
Inoculante de <i>Rhizobium</i>	13
Beneficios importantes del <i>Rhizobium</i> (Paerl, 1998).....	13
Precauciones en el manejo del <i>Rhizobium</i> (Paerl, 1998).....	13
Fijación biológica del nitrógeno	14
Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	15
Infección de <i>Rhizobium</i> en leguminosas.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Ubicación del experimento	17
Obtención de plantas de frijol	17
Recuperación de nódulos	18
Aislamiento de cepa de <i>Rhizobium</i>	19
Composición de medio selectivo de aislamiento (LMA-RC)	19
Purificación de la bacteria.....	20
Identificación de los aislamientos	21
Pruebas bioquímicas de identificación.....	21
Diseño experimental	21
Aislamiento de cepas de <i>Rhizobium</i>	22
Caracterización morfológica	22
Caracterización bioquímica.....	24
Evaluación experimental del inoculante.....	25
Diámetros de tallo.....	26
Peso fresco.....	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Nódulos de <i>Rhizobium</i> en Raiz de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	11
Figura 2. Departamento de Parasitología (UAAAN).....	17
Figura 3. Mapa estado de Coahuila	17
Figura 4. Mapa del área de recolección de las plantas.....	18
Figura 5 y 6. Recuperación y lavado de nódulos	18
Figura 7. Toma de pH de medio de cultivo	20
Figura 8. Esterilización de medio de cultivo.....	20
Figura 9. Enfriamiento de medio de cultivo.....	20
Figura 10. Siembra de la bacteria en medio de cultivo	20
Figura 11. Crecimiento de la bacteria en medio de cultivo agar manitol.....	21
Figura 12. Nodulación frijol negro.....	22
Figura 13. Nodulación frijol matero.....	22
Figura 14. Bacilos del genero <i>Rhizobium</i>	22
Figura 15. Características de colonias de <i>Rhizobium</i>	23
Figura 16. Pruebas bioquímicas.....	24
Figura 17. Diametro de tallo plantas de frijol inoculado con <i>Rhizobium</i>	26
Figura 18. Peso fresco de plantas de frijol inoculada con <i>Rhizobium sp</i>	27

ÍNDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Consumo nacional	7
Cuadro 2. Características morfológicas	23
Cuadro 3. Pruebas bioquímicas.....	24
Cuadro 4. Pruebas bioquímicas de diferenciación.....	25

RESUMEN

Las leguminosas como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) tiene la capacidad de asociarse a bacterias del suelo del género *Rhizobium*. Dicha asociación, comprende a la mayoría de las 18,000 especies de leguminosas y resulta en una simbiosis fijadora de nitrógeno de importancia ecológica. El objetivo de este proyecto fue aislar cepas *Rhizobium* del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y determinar su efecto al usarlo como inoculante mediante la medición de algunos parámetros como altura y peso. A partir de nódulos, de cuatro variedades de frijol colectadas en San Andrés Tlalamac Estado de México, se logró recuperar igual número de aislamientos en el medio de cultivo Agar manitol (LMA-RC), las cuales se identificaron como *Rhizobium spp.* El aislamiento de nódulos de la variedad de frijol flor de mayo se empleó para evaluarse como inoculante entre variedades de frijol, inoculando la semilla directamente con la cepa de *Rhizobium* F.M propagada en el caldo manitol. Se encontró que inoculando *Rhizobium* en plantas de frijol se obtiene mayor peso fresco en las variedades de matero y flor de mayo, incrementando el grosor de tallo por la inoculación de *Rhizobium*.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, características morfológicas, parámetros, simbiosis.

INTRODUCCIÓN

El frijol se originó y domesticó en América Latina en dos orígenes geográficos Mesoamérica y los Andes Genéticamente que derivan de un ancestro común de 100,000 años de antigüedad. En México y América del Sur, el frijol se domesticó de manera independiente hace aproximadamente 8,000 años. (Bitocchi *et al.*, 2013). Se tienen registros de semillas cultivadas de (*Phaseolus vulgaris*) de 3,000 años de antigüedad (Brown, 2006).

Como todas las leguminosas, el frijol tiene la capacidad de asociarse a bacterias del suelo llamadas *Rhizobios* (singular *Rhizobium*). Dicha asociación entre leguminosas y *Rhizobium*, comprende a la mayoría de las 18,000 especies de leguminosas y resulta en una simbiosis fijadora de nitrógeno de importancia ecológica que aporta, anualmente, una cuarta parte del nitrógeno fijado en la biósfera (Catherine *et al.*, 2009).

En las raíces de la planta, la bacteria induce la formación de un órgano denominado nódulo, dentro del cual se establece de forma intracelular. En estas condiciones, la bacteria es capaz de convertir el N_2 atmosférico en amonio NH_4^+ , el cual constituye la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de la planta. Estas asociaciones simbióticas entre leguminosas y *Rhizobium*, fertilizan el suelo y se calcula que incorporan de 60 a 120 kg de nitrógeno por hectárea. Tradicionalmente y desde hace cientos de años, el agricultor mexicano ha sembrado en sus chinampas y milpas, de forma combinada, frijol y maíz. El tallo del maíz sirve de sostén a la enredadera del frijol y éste, a su vez, fertiliza el suelo favoreciendo una mayor producción del cereal. Este ecosistema (la milpa), en donde tradicionalmente se siembra maíz, frijol y calabaza, además de chile y tomate, constituye un modelo de agricultura ecológica el cual favorece un control biológico de insectos además de la ya referida fijación biológica de nitrógeno. Las características nutricionales de cada uno de estos cultivos, sumados, producen una dieta equilibrada. (Catherine *et al.*, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La fijación biológica de nitrógeno puede sustituir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura y prevenir la pérdida de la fertilidad del suelo mejorando los costos de producción, así mismo evitar la contaminación al medio ambiente. Este proceso de simbiosis leguminosa-*Rhizobium* proporcionan crecimiento y desarrollo de la planta por la fijación de nitrógeno de la bacteria.

OBJETIVOS

Aislamiento e identificación de cepas de *Rhizobium* de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L).

Determinar el efecto de *Rhizobium* en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas bajo condiciones de invernadero.

HIPOTESIS

Una variedad de frijol inoculada con *Rhizobium* tendrá mayores valores agronómicos que una planta no inoculada.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Antecedentes

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) se originó y domesticó en América Latina con dos orígenes geográficos (Mesoamérica y los Andes) genéticamente diferenciables que derivan de un ancestro común de 100,000 años de antigüedad. En México y América del Sur, el frijol se domesticó de manera independiente hace aproximadamente 8,000 años. (Bitocchi *et al.*, 2013). Se tienen registros de semillas cultivadas de *Phaseolus vulgaris* de 3,000 años de antigüedad (Brown, 2006).

Por su alto contenido proteico (20–25%) es, entre las leguminosas, el tercer cultivo más importante en el mundo, después de la soya y el cacahuate (Singh *et al.*, 1999). Como la mayoría de las Leguminosas, sus proteínas son deficientes en aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína, sin embargo, una ingesta regular de frijol favorece en la disminución de los niveles de colesterol y reduce los riesgos de padecer cáncer. Particularmente en México, el frijol es la Leguminosa de mayor consumo humano y representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas (Anderson y Gustafson, 1989).

Generalidades del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Dentro del grupo leguminosas, el frijol común es una de las más importantes. Es una planta anual, herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas. Es originario de América y se le conoce con diferentes nombres: poroto, fréjol, hatico, caraota, judía, aluvia, habichuela y otros. El frijol es uno de los alimentos básicos en México, (Ulloa y Ramírez, 2007).

Clasificación botánica del frijol *Phaseolus vulgaris* (Linneo, 1753)

Reino: Plantae.

Subreino: Franqueahionta.

División: Spermatophyta.

Subdivisión: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliatae.

Orden: Fabales.

Familia: Fabaceae.

Género: *Phaseolus*.

Especie: *P vulgaris*, L

Descripción botánica del frijol (Barreiro, 1995).

Planta

Anual, herbácea, arbustiva y bastante abundante en hojas; de estación cálida, ± erecta, con ramas que proceden del tallo principal, las que dependen de las condiciones ambientales, siendo de gran importancia la densidad poblacional, pues también incide en la altura y dureza del tallo; tiene hojas, tallos y vainas pubescentes.

Raiz

Consta de una raíz pivotante capaz de alcanzar gran profundidad. La germinación comienza con el desarrollo de la radícula, que se ramifica abundantemente y es la encargada, junto con las sustancias de reserva almacenadas en los cotiledones, de nutrir a la planta durante sus primeros días de vida. Luego, el crecimiento de la raíz principal se detiene y se desarrollan muchas raicillas laterales.

Tallo

Las plantas poseen un tallo principal, el cual, dependiendo del cultivar, puede presentar un hábito de crecimiento erecto, semierecto, semiprostrado o prostrado, pudiendo alcanzar de 30-90 cm. de longitud, en variedades determinadas. En variedades indeterminadas, puede alcanzar 2 o más m. El tallo está conformado por nudos y entrenudos; al primer nudo se le denomina cotiledonar luego aparece el

Segundo nudo que es el de las hojas primarias unifoliadas, después de estas, el tallo continúa con una sucesión de nudos (punto de intersección de hojas trifoliadas en el tallo y un grupo de yemas axilares) y entrenudos (espacio entre dos nudos) Los tallos pueden presentar pelos cortos, pelos largos, una combinación de pelos cortos y largos, o ser glabros. Además de lo señalado, siempre existen pequeños pelos en forma de gancho llamados uncinulados, incluso en los tallos glabros. El número total de nudos en el tallo principal puede fluctuar entre 6 y más de 30. Según su forma y su hábito de crecimiento, los cultivares se agrupan en dos tipos: los de crecimiento determinado y los de crecimiento indeterminado. Los tipos de crecimiento determinado se ramifican más, la altura total de la planta es menor (30-90 cm.) y al comenzar la floración cesa el desarrollo de la misma. Los de crecimiento indeterminado son los trepadores, que tienen la capacidad de seguir desarrollándose después de la floración. Debido a esta circunstancia, la altura de sus tallos puede variar desde los 50 cm hasta los 3 m.

Hojas

El primer par de hojas, que se origina a partir de los cotiledones, es opuesto y de forma acorazonada. Las hojas definitivas las forman tres folíolos; el central es ovoide y simétrico y los laterales, asimétricos. El tamaño varía con el cultivar y las condiciones de cultivo.

Flores

Están organizadas en racimos, situados en las axilas de las hojas, y su color varía del blanco al morado. Aunque el frijol produce menos flores que otras leguminosas, como la soya, cuajan en él en mayor proporción. Las flores, hermafroditas y completas, comienzan a desarrollarse por la parte inferior de la planta. Puesto que suelen auto fecundarse, los cultivares se pueden multiplicar por semilla sin perder las características genéticas de la planta madre a medio plazo.

Fruto o Legumbre

El fruto del frijol es una vaina o legumbre, que varía mucho en forma, tamaño y número de semillas. Las semillas, a su vez, también presentan gran diversidad de formas (cilíndricas, elípticas u ovales) y colores (desde el blanco hasta el negro), pudiendo ser la coloración uniforme o manchada.

Importancia del cultivo

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en nuestro país, ubicándose en segundo lugar por superficie destinada, la mayor importancia radica en el papel que juega para la economía campesina y como fuente vital de proteínas para la población mexicana (Barreiro, 1995).

Sin embargo, a pesar de ser un producto tan necesario, la producción de frijol en nuestro país es sensible a las condiciones climáticas que se presentan durante el año agrícola (Barreiro, 1995).

Producción Nacional de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) en México

La producción nacional de frijol en el año agrícola 2015 se ubicó en 969.1 miles de toneladas. Dicho volumen significó una reducción a la tasa anual de 23.9 por ciento. La producción del ciclo Otoño-Invierno se redujo 34.6 por ciento con respecto al año agrícola previo, derivado de la reducción anual de 47.8 por ciento en la cosecha de frijol en Sinaloa y 51.4 por ciento en Nayarit (SAGARPA, 2015).

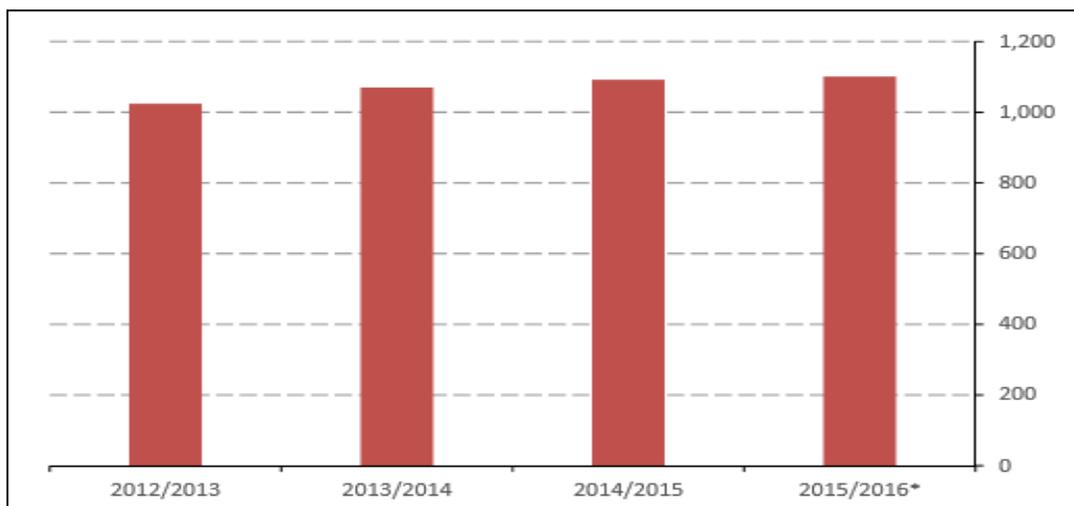
Consumo nacional

El consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en México durante los últimos tres años se ubicó en un promedio de 1.1 millones de toneladas. Dicho volumen representa el 88 por ciento de la producción nacional promedio de frijol entre 2013 y 2015 (SIAP-SAGARPA, 2015).

El consumo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a nivel regional varía de acuerdo con el tipo de grano. Así, por ejemplo, en la región norte de México existe preferencia por los frijoles pintos, en la zona noroeste por los frijoles azufrados, en la región centro por las variedades Flor de mayo y Flor de junio, mientras que en el sur y suroeste se tiene preferencia por frijol negro (SIAP – SAGARPA, 2015).

Cuadro 1. Consumo nacional

Consumo de frijol en México, 2012-2016.
(Miles de toneladas)



Fuente: (SIAP - SAGARPA).

El frijol es el cuarto cultivo en importancia por la superficie sembrada en México, después del maíz grano, pastos y el sorgo grano; por el valor de la producción primaria que genera, ocupa la undécima posición, considerando cultivos cíclicos y perennes. Por su amplia adaptación y por el número de variedades mejoradas disponibles, el cultivo de esta leguminosa se realiza prácticamente en todas las regiones, condiciones climáticas y tipos de suelos en el país (SAGARPA, 2015)

Producción primaria

Durante el año agrícola 2015 se cosecharon 1.56 millones de hectáreas de frijol en México, lo que significó una disminución de 7.5 por ciento con respecto a la superficie cosechada en el 2014. El 90.1 por ciento de la superficie cosechada fue de temporal; y el 87.4 por ciento correspondió al ciclo Primavera-Verano (P-V). En 2015, se cosechó el 92.6 por ciento de las 1.68 millones de hectáreas sembradas de frijol (SAGARPA, 2015).

Fertilizantes comunes

La dosis de fertilización recomendada es la 40-60-00; esta fórmula se obtiene mezclando 90 kg de urea con 130 kg de superfosfato de calcio triple o bien 200 kg sulfato de amonio con 300 kg de superfosfato de calcio simple. La sembradora coloca el fertilizante entre cada dos hileras de plantas, quedando éste a una distancia de 12.5 cm entre ellas. El fertilizante se aplica todo al momento de la siembra, debido a que el cultivo de frijol es de ciclo corto (INIFAP, 2017).

Biofertilizantes

Ayudan al proceso de la nutrición biológica de las plantas, permitiendo así un buen aprovechamiento del nitrógeno atmosférico desarrollando un sistema radicular, ayudando a una mayor solubilidad y conductividad de nutrientes (Biofertilizantes, 2014).

Rhizobium es una bacteria cuyo hábitat se encuentra en el suelo, que puede ser capaz de colonizar las raíces de leguminosas y fija el nitrógeno atmosférico mediante simbiosis. La morfología y la fisiología de *Rhizobium* varían de un estado de vida libre a la bacterioide de nódulos. Ellos son el biofertilizante más eficiente por la cantidad de nitrógeno que fijan (Biofertilizantes 2014).

Que es la biofertilización

Son sustancias que contienen poblaciones microbianas variadas, su alto contenido en nutrientes le permite reaccionar con la materia orgánica del suelo y así producir sustancias que son benéficas para las plantas (Biofertilizantes 2014).

Beneficios de la biofertilización.

- Disminución de costos de producción
- Aumento de producción agrícola
- Disminución de costos en la aplicación de fungicidas y protección al agricultor
- No degradación de suelos y contribución a la reparación de estos.

***Rhizobium* en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*)**

Todas las especies de *Rhizobium* forman nódulos en las raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas estructuras en donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Existe especificidad en esta relación, lo que significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un limitado número de especies de *Rhizobium* (Long, 1989).

Se han identificado diferentes sitios de diversificación de las leguminosas y éstos coinciden con los sitios de diversificación de los rhizobios que son capaces de establecer simbiosis con las leguminosas en cuestión (Martínez *et al.*, 1996).

En los últimos años se ha incrementado el número de especies y géneros de *Rhizobium* porque se han analizado leguminosas que no se habían estudiado y porque la metodología para clasificar bacterias es más determinante (Van Berkum y Eardly, 1998).

México es uno de los sitios de origen del frijol (*Phaseolus vulgaris*), y de otras muchas leguminosas. El aislamiento de las bacterias de estas leguminosas ha revelado en algunos casos una gran diversidad genética por lo que se han propuesto nuevas especies de *Rhizobium*, las cuales son nativas de México. Por ejemplo, encontramos que las semillas de frijol pueden diseminar a sitios geográficos distantes a la especie *Rhizobium etli*, que portan sobre su testa (Pérez *et al.*, 1998).

La diversidad genética de *Rhizobium* aislados de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*), disminuye considerablemente en algunas variedades (*Phaseolus vulgaris*), si se siembran éstas en presencia de fertilizantes nitrogenados (Caballero y Martínez, 1999).

El nitrógeno fijado añadido como fertilizante químico inhibe la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno cuando se añade a plantas noduladas. El proceso de fijación de nitrógeno es muy costoso energéticamente y esto tal vez explique la fácil pérdida de los genes de fijación de nitrógeno (Martínez *et al.*, 1999).

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas y, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Martínez y Hernández, 1999).

Esta capacidad de ser noduladas por una elevada variedad de bacterias se ha relacionado con el espectro de inductores de genes de nodulación que secretan, considerándose *Phaseolus vulgaris* como una de las leguminosas que libera mayor cantidad y variedad de flavonoides, exudados tanto por la raíz como por la semilla (Morón *et al.*, 2006).

Existen numerosos estudios sobre la diversidad de bacterias que nodulan algunas de las especies englobadas en el género *Phaseolus*. (García *et al.*, 2010). Aunque se ha descrito la nodulación de algunas especies de *Phaseolus* en América por microorganismos del género *Bradyrhizobium* según (Ormeño *et al.*, 2006), los que nodulan *P. vulgaris* de un modo eficiente se incluyen dentro de la familia **Rhizobiaceae** en los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.



Figura 1. Nódulos de *Rhizobium* en raíz de frijol.

En frijol, la experiencia de inoculación ha tenido resultados muy variables. El problema principal que existe es la población de *Rhizobium etli* nativa, altamente adaptada y competitiva para nodular. En general, las bacterias introducidas como inoculante forman una proporción muy pequeña, menor al 5% de los nódulos. El resto lo forman las cepas nativas. Para resolver este problema, se ha propuesto que la selección de las mejores fijadoras se realice a partir de la población nativa del sitio donde se piensa trabajar y que se analicen los determinantes genéticos de la competencia (Martínez y Rosenblueth, 1990).

Características del Género *Rhizobium*.

Son bacilos que miden 0.5-1.0x1.2-3.0 μm . Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YMA.. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos (Becker y Pühler, 1998)

Diversidad de *Rhizobium*

Utilizando enfoques de biología molecular, se han establecido también las relaciones filogenéticas de estas bacterias (Van Berkum y Eardly, 1998). En el cuadro se enlistan las especies y géneros de *Rhizobium*.

Género	Especie	Huésped
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> (soya)
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i> (garbanzo)
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarium</i>	Acacia, <i>Leucaena</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> , <i>Sophora</i> , <i>Glycine</i> y otras
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol), <i>Mimosa affinis</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosanthes</i> , <i>Centrosema</i> , <i>Desmodium</i> , <i>Tephrosia</i>
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia</i> (chícharo), <i>Trifolium</i> (trébol)
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp</i>
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>S. terangae</i>	<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glycine max</i>

Inoculante de *Rhizobium*

Existen varias razas de la bacteria *Rhizobium*, pero se han evaluado para reproducir las que mejor relación tienen con el frijol, es decir, las que mayor cantidad de Nitrógeno atrapan cuando están en las raíces. Al multiplicarse las bacterias en el laboratorio, se les llama inoculo y estamos seguros que se están multiplicando bacterias puras que nos ayudarán en la fertilización nitrogenada en el frijol (Anon, 2017).

Beneficios importantes del *Rhizobium* (Paerl, 1998).

- ✓ Se reducen las aplicaciones en más del 50% de fertilizante nitrogenado (urea).
- ✓ Es menor el costo en las aplicaciones (el inoculante es más barato que la urea).
- ✓ Esta tecnología es más amigable con el ambiente, no contamina por la fertilización.
- ✓ Tecnología compatible con el manejo agroecológico.
- ✓ Tecnología que se puede generar con *Rhizobium* nativo.

Precauciones en el manejo del *Rhizobium* (Paerl, 1998).

- ✓ No ponga el inoculante cerca del calor excesivo durante el transporte o en el campo.
- ✓ Almacénelo en lugares frescos, secos y limpios, con temperaturas menores de 25°C
- ✓ No deje la semilla inoculada puesta al sol.
- ✓ Cuando siembre cubra la semilla inmediatamente.
- ✓ Utilice la totalidad del inoculante, no almacenar ningún sobrante.
- ✓ En épocas de mucho sol y altas temperaturas, realice la inoculación y siembra durante las primeras horas de la mañana o en las últimas horas de la tarde.

Fijación biológica del nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos químicos esenciales para todos los seres vivos ya que forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas y, por lo tanto, es fundamental en la estructura y el metabolismo celular (Paerl, 1998). Las plantas toman el nitrógeno directamente desde el suelo en forma de nitratos (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), algo que no pueden hacer los animales, que precisan tomarlo en forma de compuestos orgánicos. Sólo algunos procariontes pueden tomar el nitrógeno directamente desde la atmósfera, vía fijación de nitrógeno, convirtiendo el nitrógeno molecular en nitrógeno asimilable por otros seres vivos. Teniendo en cuenta que este elemento es muy abundante en la atmósfera, la obtención de nitrógeno directamente desde ésta es una de las vías más importantes para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno, del que forman parte las bacterias fijadoras de nitrógeno, junto con otros grupos de bacterias que llevan a cabo procesos intermedios de transformación de compuestos nitrogenados y de desnitrificación, que devuelve finalmente el nitrógeno a la atmósfera. (Paerl, 1998).

La fijación biológica de nitrógeno supone más del 60% de la fijación global del nitrógeno en la tierra y los microorganismos que llevan a cabo este proceso se denominan diazotrofos. La enzima responsable de la fijación de nitrógeno se denomina nitrogenasa y está compuesta por dos metaloproteínas, una con Fe (ferroproteína o nitrogenasa reductasa) y otra con Fe y Mo (ferromolibdoproteína o nitrogenasa propiamente dicha) como grupos activos (Lloret y Martínez, 2005).

Dentro de los diazotrofos hay muchas especies que llevan a cabo la fijación de nitrógeno en vida libre, mientras que otras lo hacen a través de asociaciones simbióticas con plantas. Los fijadores de vida libre están distribuidos en numerosos grupos de bacterias que comprenden bacterias anaerobias como *Clostridium*, anaerobias facultativas como *Klebsiella* y aerobias como *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Beijerinckia* (De Felipe, 2006).

La eficiencia de la fijación de nitrógeno es relativamente baja en el caso de los fijadores libres ya que el nitrógeno fijado es posteriormente metabolizado y eliminado por desnitrificación y lavado. La fijación en vida libre sólo aporta al suelo unos cientos de gramos de nitrógeno por hectárea y año que, si bien son suficientes en condiciones naturales, están muy lejos de satisfacer las necesidades de los cultivos (Olivares, 2004).

Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

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

El establecimiento de una simbiosis *Rhizobium* - leguminosa eficiente conlleva una serie de etapas que comienzan con un intercambio de señales entre ambos organismos: las raíces de la planta liberan a la rhizósfera flavonoides (Spaink *et al.*, 1998), moléculas de naturaleza fenólica que promueven la expresión en las bacterias de los genes nod, lo cual origina la síntesis y secreción de lipo-oligoquitinas llamadas factores nod (Geurts *et al.*, 2005; Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1998). Éstas son percibidas por la raíz de la planta, la cual experimentará diversos cambios dependiendo del tipo de leguminosa (Bauer y Mathesius, 2004).

Infeción de *Rhizobium* en leguminosas

En las leguminosas en las que la infección se produce a través de pelos radicales se produce una deformación de los mismos que origina un cambio en la dirección del crecimiento, produciéndose en el extremo apical la morfología típica denominada “cayado de pastor”, de modo que algunas de las bacterias quedan recluidas en el interior de la curvatura de la misma. Estas bacterias inducen una degradación local de la pared celular de la planta (Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008), la membrana plasmática se invagina y los *Rhizobium* entran en su interior. En otros casos, como ocurre en la nodulación del cacahuate (*Arachis hypogea*) por bacterias del género *Bradyrhizobium*, la entrada es directa por los espacios intercelulares que se abren al emerger las raíces laterales, lo que se conoce como crack entry (De Lajudie *et al.*, 1998). En el caso de *Phaseolus* la entrada del *Rhizobium* es mixta, por pelos radicales y por crack.

El *Rhizobium*, una vez invadidas las células de la planta, proliferan y se diferencian a bacteroides, responsables de la fijación de nitrógeno, que están rodeados por una membrana peribacteroidea de origen vegetal y constituyen un nuevo orgánulo denominado simbiosoma. La planta aporta esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, el bacteroide aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Lodwig y Poole, 2003). Para que tenga lugar la reducción de N_2 , el ambiente del simbiosoma debe ser microaerobio, puesto que la nitrogenasa es muy sensible a la oxidación por O_2 (Zehr *et al.*, 1993). La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno la lleva a cabo la leghemoglobina, una proteína monomérica cuya función es combinarse con gran afinidad con el oxígeno, transportándolo hasta la membrana de los simbiosomas, manteniendo en su interior una concentración de O_2 libre de tan sólo 10-50 nM. Por eso, los nódulos efectivos presentan una coloración rojiza debido a la presencia de leghemoglobina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación Del Experimento

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología y en el campo experimental “El bajo” (invernaderos) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).



Figura 2. Depto. Parasitología (UAAAN)



Figura 3. Mapa estado de Coahuila.

Obtención de plantas de frijol

Se recolectaron plantas de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en cultivos situados en la localidad de San Andrés Tlalamac del municipio de Atlautla Estado de Mexico, para ello con una espátula se marcó una circunferencia en el terreno alrededor de la planta con un radio de 15 cm aproximadamente cavándose en el contorno definido a una profundidad de 20 cm, levantando el bloque y removiendo la tierra de las raíces. Cada muestra se acondiciono y se rotulo, para ser trasladadas al laboratorio para su posterior procesamiento.



Figura. 4 Mapa del área de recolección de las plantas de frijol en la localidad de San Andrés Tlalamac estado de Mexico.

Recuperación de Nódulos

Se separaron los nódulos de cada variedad de frijol de las raíces secundarias, de los cuales se obtuvieron los nódulos más intactos, de forma redonda, coloración rojiza y tamaño, preservándolos en frascos de plástico, donde se lavaron siete veces, posteriormente se maceraron hasta obtener el líquido derivado de los nódulos.



Figura 5 y 6. a) Recuperación b) lavado de nódulos de raíz de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Aislamiento de cepa de *Rhizobium*

El aislamiento se realizó a partir del macerado de los nódulos de las diferentes variedades, las muestras fueron sembradas por estría en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo Agar Manitol Extracto de Levadura - Rojo Congo (LMA-RC), con pH de 7, se incubaron a 28°C por 3 a 5 días hasta observar el crecimiento y cambio de coloración de las colonias típicas del género *Rhizobium*.

Composición de Medio Selectivo de Aislamiento (LMA-RC)

Extracto Agar Manitol Extracto de Levadura - Rojo Congo (LMA-RC) en las siguientes concentraciones:

- 10.0 gr de manitol /1000 ml de agua
- 4.0 gr de extracto de levadura / 1000 ml de agua
- 0.5 gr de K_2PHO_4 / 1000 ml de agua
- 0.2 gr de $MgSO_4$ / 1000 ml de agua
- 0.1 gr de $NACL$ / 1000 ml de agua
- 15 gr de agar / 1000 ml de agua
- Rojo Congo
- pH 7

Para propagar los rhizobios se preparó el mismo medio de cultivo en matraz Erlen Meyer, sin el agar ni el colorante rojo congo una vez obtenido el aislado se sometió a agitación giratoria a 100 rpm durante 3 días.



Figura 7. Ajuste de pH de cultivo



figura 8. Esterilización de medio de cultivo.



Figura 9. Enfriamiento de medio cultivo.



Figura 10. Medio rojo congo.

Purificación de la bacteria

En placas del medio de cultivo Extracto Agar Manitol Extracto de Levadura - Rojo Congo (LMA-RC) se procedió a realizar las resiembras de las cepas de *Rhizobium* en condiciones asépticas para evitar contaminación, posteriormente se incubaron a una temperatura de 28°C por 3 a 5 días.



Figura 11 . Crecimiento de la bacteria en medio agar manitol.

Identificación de los Aislamientos

Los rizobios obtenidos de cada planta de frijol una vez purificados en el mismo medio de aislamiento(LMA-RC) fueron precesados en frotis *in vivo*, semipermanentes y teñidos para ser observados al microscopio compuesto para observar la morfología de las cepas y la forma de crecimiento colonial característico de borde redondo de elevación convexa de un aspecto mucoide.

Pruebas bioquímicas de identificación

Las pruebas bioquímicas utilizadas para diferenciar el género de los rizobios aislados fueron: prueba de tinción Gram, prueba de oxidasa, catalasa y peroxidasa.

Diseño experimental

Para evaluar la capacidad de inoculante de *Rhizobium spp* F.M se planeo un experimento completamente al azar con tres tratamientos (variedades de frijol) y un testigo sin aplicar inoculante bajo un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones donde cada unidad experimental fue de una planta, los datos fueron sometidos en un análisis de varianza (ANOVA) y por comparación de medias, por el paquete estadístico SAS versión 9.1 con nivel de significancia α 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas de *Rhizobium*.

Se recuperaron cuatro aislamientos de nódulos de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), procedentes de la localidad de San Andrés Tlalamac, Estado de México. Cada aislado presento características de crecimiento y nodulación particulares, siendo la cepa aislada de frijol flor de mayo (Figura 12), la de mayor nodulación y la de matero (Figura 13), que tuvo menor número de nódulos. En esta última planta los nódulos fueron de mayor tamaño.

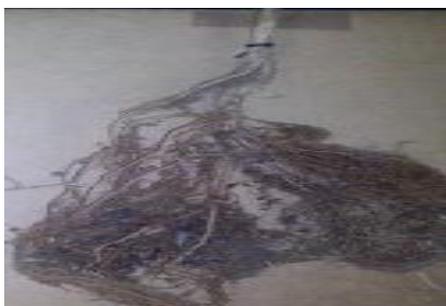


Figura 12. Nodulación frijol negro

Figura 13. Nodulación en frijol matero

Caracterización morfológica

Según las características morfológicas los cuatro aislados presentaron forma bacilar (Figura 14), no esporulados, de colonias circulares, borde liso y de aspecto mucoide (Cuadro 2). Al crecer sobre el medio de cultivo rojo congo (LMA-RC), las colonias absorben el colorante transformándose de mucoide transparente a color rojo característica pertenecientes en el género *Rhizobium* según (Aguilar *et al.*, 2004).



Figura 14. Bacilos del genero *Rhizobium*.

En la figura 15, se observa la forma característica del desarrollo de *Rhizobium* particular del aislamiento de la variedad de flor de mayo obtenido después de 5 días en de incubacion en el medio Agar manitol, este crecimiento es tipico del género, además se observó un rápido desarrollo en el mismo medio de cultivo con manitol lo que permite su diferenciación de otros fijadores de nitrógeno que crecen lentamente.

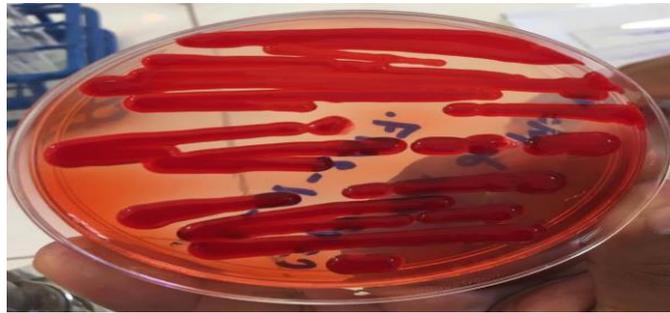


Figura 15. Característica de colonias de *Rhizobium*.

La forma colonial también fue uniforme y característica descriptiva de *Rhizobium* en su aspecto, tamaño y elevación con bordes lisos y tamaño grande en los cuatro aislamientos obtenidos fue casi uniforme diferenciando solo por la rapidez en aparecer las colonias sobre la estría y en la transformación de su aspecto de mucoide a rojo intenso en el medio de cultivo.

Cuadro 2. Características morfológicas coloniales de *Rhizobium*.

CEPAS	FORMA	BORDE	ELEVACION	ASPECTO
F.M 1	Circular	Redonda	Convexa	Mucoide
N 2	Circular	Redonda	Convexa	Mucoide
P.S 3	Circular	Redonda	Planoconvexa	Mucoide
M 4	Circular	Redonda	Planoconvexa	Mucoide

Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas primarias son usadas para determinar el género de la mayoría de las bacterias donde se destacan la tinción Gram, oxidasa, catalasa y peroxidasa que se muestra el (Cuadro 3.) Como se observan, las pruebas tanto de Gram y oxidasa fueron negativas (-) tal y como se reporta para el género *Rhizobium*, igualmente para catalasa y peroxidasa cuyo resultado fue positivo (+) para los cuatro aislados. Estos resultados concuerdan con pruebas bioquímicas donde se reporta datos similares para el género *Rhizobium*. Estas características se describen en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Kuykendall *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas

PRUEBAS	CEPAS			
	F.M 1	N 2	P.S 3	M 4
TINCION GRAM	-	-	-	-
OXIDASA	-	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+
PEROXIDASA (KOH)	+	+	+	+

En la figura 16 se muestran imágenes ilustrativas de las reacciones bioquímicas del genero *Rhizobium* identificado.

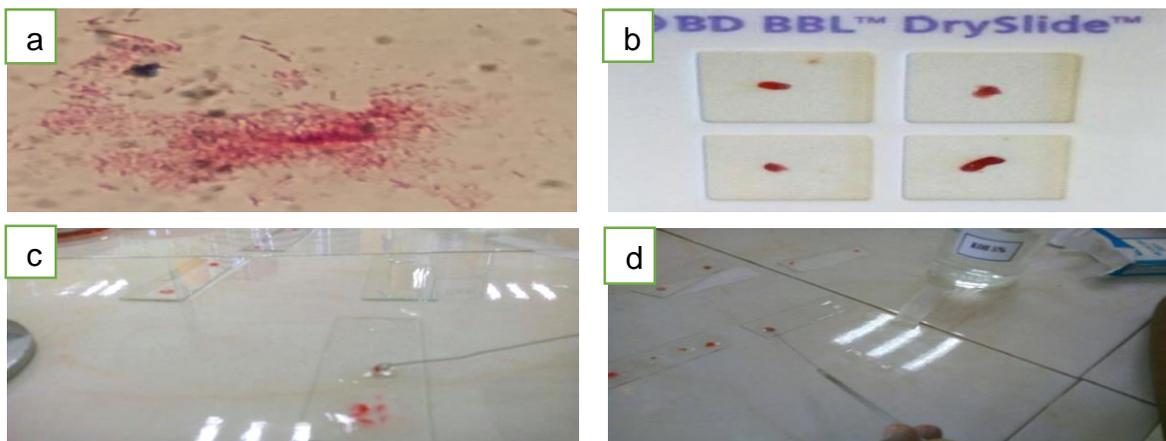


Figura 16. Pruebas bioquímicas a) Tinción Gram b) Oxidasa c) Catalasa d) Peroxidasa (KOH)

El comportamiento que manifestaron los cuatro aislamientos el crecimiento fue de manera uniforme en medios conteniendo NaCl al 2, 3 y 5% que referencia la capacidad de este género para identificarse como *Rhizobium* y crecer en medios salinos así como crecer en un amplio rango de pH ácido y alcalinos igualmente en medios con levadura donde crecen abundantemente.

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas en diferentes medios de cultivo.

	CEPAS			
	F.M 1	N 2	P.S 3	M 4
Crecimiento en NaCl 2, 3 y 5 %	+	+	+	+
Crecimiento en pH 4, 5, 7 y 9	+	+	+	+
Crecimiento MacConckey	+	+	+	+
Crecimiento LMA- ABT	+	+	+	+
Crecimiento EAM	+	+	+	+

Evaluación experimental del inoculante

De las variedades de frijol usadas para determinar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de la cepa de *Rhizobium* F.M, se encontró que en todas ellas existió nodulación e incluso en el testigo, lo cual fue probablemente inducido por *Rhizobium* nativo, sin embargo los datos representativos del comportamiento se muestran a continuación.

Diámetros de tallo

Se aprecia que no existe diferencia estadísticamente significativa (0.05), entre los tratamientos inoculados y el testigo sin embargo existe diferencia numérica fácilmente apreciable donde el frijol matero sobresale con el mejor diámetro comparado con el testigo y los demás tratamientos..

Santillana *et al.*, 2005; Etesami *et al.*, 2009 mencionaron que *Rizhobium* tiene la capacidad de sintetizar sustancias promotoras de crecimiento vegetal tales como auxinas, giberelinas, y citocininas. Estas sustancias promueven la división celular así como el alargamiento de las células, es decir, que incrementan la extensibilidad de la pared celular, produciendo un cambio de elongación en el diámetro en los tallos de las plantas.

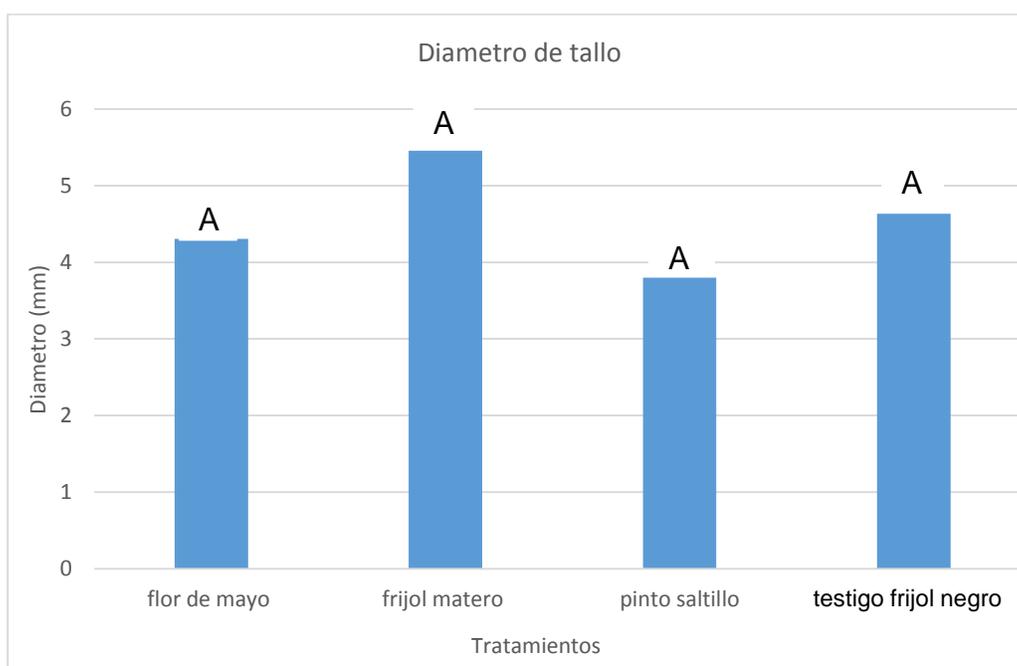


Figura 17. Diámetro de tallo plantas de frijol inoculado con *Rhizobium*

Peso fresco

En la cuantificación de peso fresco se puede apreciar diferencia significativa siendo el tratamiento frijol matero con mayor peso en comparación con las demás variedades de frijol. Las plantas inoculadas con *Rhizobium* F.M aportaron valores numéricos superiores al testigo siendo la variedad flor de mayo y matero las que se observó el peso fresco diferente estadísticamente (Cuadro 6.)

Soriano y González (2012) reportaron que la inoculación de *Rhizobium etli* incrementa el peso de la materia seca de la parte aérea, peso de la materia seca de la parte radicular y el peso de la materia seca total de las plantas a los 20 días posterior a la inoculación. Esto debido a que dicha bacteria favorece este desarrollo. En este sentido la inoculación de *Rhizobium* se observó mayor vigor en la planta de frijol inoculada en comparación al testigo aun y cuando en todas hubo presencia de nódulos, siendo la variedad matero la que mejores resultados de peso y altura desarrollo.

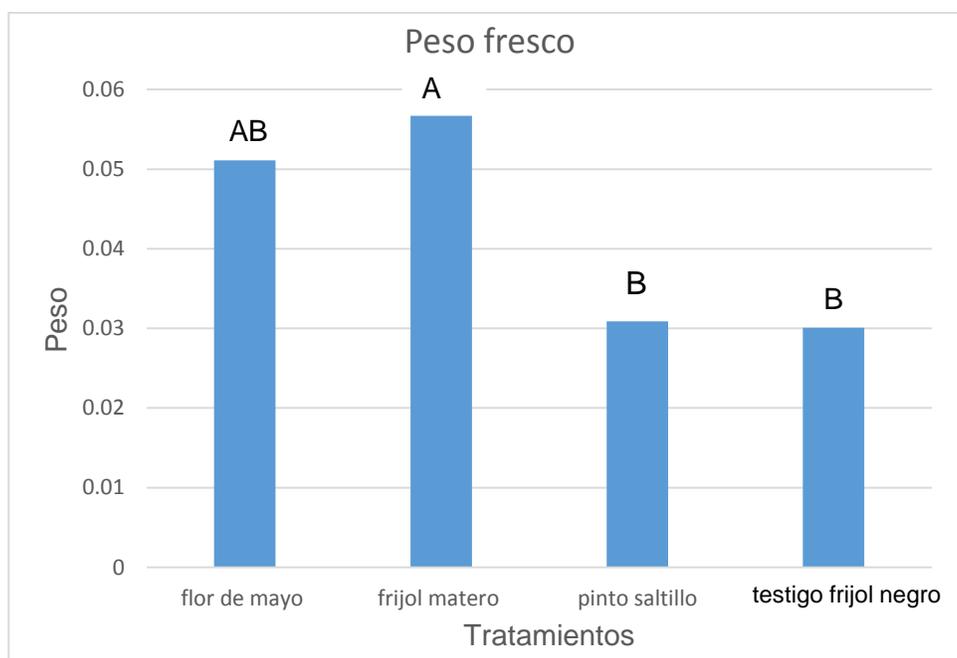


Figura 18. Peso fresco de plantas de frijol inoculada con *Rhizobium* sp

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló esta investigación podemos concluir:

- Se identificó cuatro cepas a nivel del genero *Rhizobium* aislados de igual número de plantas de frijol.
- El aislamiento de *Rhizobium* de planta de frijol flor de mayo genera nódulos en frijol matero y pinto saltillo incrementando el peso fresco de la planta.
- La inoculación de *Rhizobium* F.M en plantas de frijol es una alternativa variable para la biofertilización del cultivo de frijol.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M.O., Riva, O. y Pelzer, E. 2004. "Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports co evolution in centers of host diversification", PNAS, 101(37):13548-14553.
- Anderson and Gustafson, Hypocholesterolemic effect of oat and bean products, Michigan Dry Bean Digest, 1989, 13, pp. 2-5.
- Andrade, D. S., Murphy, P. J. y Giller, K. E. 2002. The diversity of Phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with Phaseolus vulgaris L. in Brazil Appl Environ Microbiol 68, 4025-4034.
- Anyango, B., Wilson, K. J., Beynon, J. L. y Giller, K. E. 1995. Diversity of rhizobia nodulating Phaseolus vulgaris L. in two Kenyan soils of contrasting pHs. Appl Environ Microbiol 61, 4016-4021.
- Anon, 2017. online Available at: <http://www.icta.gob.gt/frijol/RHIZO%20FRIJOL.pdf>
- Bitocchi, e. *et al.*, Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes, New Phytol, 2013, 197, pp. 300-313.
- Barreiro. 1995. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Avances de la Producción Agrícola
- Brown C. H., 2006, Prehistoric Chronology of the common Bean and the New World: The Linguistic Evidence, American Anthropologist, 108(3), pp. 507-516.
- Bhuvaneshwari, T. V., Bhagwat, A. A. y Bauer, W. D. (1981). Transient susceptibility of root Cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. Plant Physiol 68, 1144-1149.
- Booger, F. C. y van Rossum, D. 1997. Nodulation of groundnut by Bradyrhizobium: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiology Reviews 21, 5-27.

- Bauer, W. D. y Mathesius, U. 2004. Plant response to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant. Biol*; 7; 429- 433.
- Burgos, P. A., Castellanos, J., Mora, Y., & J. Mora. 1999. Field inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) with high efficiency Rhizobium strains. pp. 255-257.
- Bernal, G. y Graham, P. H. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris L.* in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can J Microbiol.* 47; 526-534.
- Beyene, D., Kassa, S., Ampy, F., Asseffa, A., Gebremedhin, T. y van Berkum P. 2004. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Arch. Microb.* 181; 129-136.
- Becker, A., and A. Pühler. 1998. Production of exopolysaccharides H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; p, 97-118
- Caballero M, J. & E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26:111-121.
- De Felipe, M. R. 2006. Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*; 9-16.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. y Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int.J Syst. Bacteriol*; 44, 715-733.
- Eardly, B. D., Young, J. P. y Selander, R. K. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Appl Environ Microbiol.* 58, 1809-1815..

Etesami H., Alikhani H.A., Akbari A.A. 2009 Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. World Applied Sciences Journal. pp. 2-6

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization), 2009 © FAO Statistics Division.

García F, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F. y Velázquez, E. 2010. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in Northern Spain by Rhizobium leguminosarum strains harboring two nodC alleles present in American Rhizobium etli strains: biogeography and evolutionary implications. Can J Microbiol

Geurts, R., Fedorova, E. y Bisseling, T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. Curr. Opin. Plant. Biol; 8, 346-352.

Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. 2008. Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. Ann. Rev. Gen;42, 413-441.

Gottfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R. y Hennecke, H. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the Bradyrhizobium japonicum chromosome. J. Bacteriol; 183, 1405-1412.

Hana, S. Z., Wang, E. T. y Chen, W. X. 2005. Diverse bacteria isolated from root nodules of Phaseolus vulgaris and species within the genera Campylobacter and Cassia grown in China. Syst Appl Microb 28, 265–276.

Herrera C, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amager, N., MartínezRomero, E., Olivares, J. y Sanjuán, J. 1999. At least five rhizobial species nodulate Phaseolus vulgaris in a Spanish soil. Fems Microbiol Ecol; 30, 87-97.

- Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D. S. y Campo, R. J. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 32, 210–220.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7; 331338.
- Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A., Sawada, H. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US.
- Long, S. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*; 56:203-214.
- Lloret, L. y Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47, 43 - 60.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. y Denarie, J. 1990. Symbiotic hostspecificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
- Lodwig, E. y Poole, P. 2003. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* 22, 37-38.
- Martínez, E. & G. Hernández. 1999. Highlights of Nitrogen Fixation Research. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E.U.A.

- Martínez R, E. & M. Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified Rhizobium strains. Appl. Environ. Microbiol. 56:2384-2388.
- Martínez R, E. & J. Caballero-Mellado. 1996. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. Crit. Rev. Plant Sci.; 15:113-140.
- Martínez R, E., Caballero-Mellado, J., Gándara, B., Rogel, M. A., LópezMerino, A., Wang, E. T., Fuentes-Ramírez, L. E., Toledo, I., Martínez, L., Hernández-Lucas, I. & J. Martínez-Romero. 1999. Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. In: F. O.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Molina, E., Squartini, A., Orgambige, G., Hubbell, D. H. y Dazzo, F. B. 2001. Erosion of root epidermal cell walls by Rhizobium polysaccharidedegrading encimes as related to primary host infection in the Rhizobium-legume symbiosis. Can J Microbiol 47, 475-487.
- Mena, C. J. y R. V. Valle. 2010. Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, (INIFAP).
- Moawad, H., Abd El-Rahim, W. M. y Abd El-Haleem, D. 2004. Performance of Phaseolus bean rhizobia in soils from the major production sites in the Nile Delta. Comptes Rendus. Biologies.327, 445-453.
- Mullis, K. B. y Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol; 155, 335-350.
- Olivares, J. 2004. Fijación Biológica de Nitrógeno. Granada España: Estación Esperimental del Zaidín.
- Ormeño O, E., Vinuesa, P., Zúñiga-Dávila, D. y Martínez-Romero, E. 2006. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. Syst. Appl. Microb. 29, 253-262.

- Paerl, H. W. 1998. Microbially mediated nitrogen cycling. En *Techniques in Microbial Ecology*, pp. 3-30.
- Pérez R, N. O., Rogel, M. A., Wang, 1998 E. Castellanos, J. Z. & E. MartínezRomero. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:289-296.
- Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yales & W. E. Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publisher 1999, Dordrecht, Holanda.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *PNAS*. 105: 7064-7069.
- Rubio G. A. y. Santos W. R, 2006 “Selección de cepas rizobianas aisladas de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) con potencial uso como biofertilizantes”, Tesis de Grado, Química Farmacéutica, Universidad de Cartagena. pp. 4-7
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22, 1086-1089.
- SAGARPA, 2015, servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Avances de la Producción Agrícola. ciclo agrícola otoño-invierno 2005-2015, Valle del fuerte, Sinaloa.
- Santillana N., Arellano C., Zúñiga D. 2005 Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). pp. 2-4
- Sassi A.S., Aydi S., Gonzalez E., Abdelly Ch. 2008 Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Acta Physiol Plant*. pp. 3-6

- Sessitch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H. y Martínez-Romero, E. 2002. Advances in Rhizobium research. Crit Rev Plant Sci 21, 323-378.
- SINGH, S. P., H Teran, C.G. Munoz and J.C.Takegami,1999, Twocycles of recurrent selection for seed yield in common bean, Crop Science,39,pp. 391-397.
- Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J., & D. Piñero. 1994. Genetic structure of Rhizobium etli biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (Phaseolus vulgaris and Phaseolus coccineus) in Morelos, México. Appl. Environ. Microbiol. 60:1260-1268.
- Soriano Bernilla Bertha y González Varas Adalberto, 2012. Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre el crecimiento vegetal de paprika, *Capsicum annuum* var. *Longum*, y lechuga, *Lactuca sativa*. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Peru. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas pp. 5
- Ulloa y Ramírez, 2007; citados por, Gálvez y Salinas. 2015. Cultura, patrimonio y futuro del frijol en México. Revista UNAM. <http://www.revista.unam.mx>. 03 de noviembre del 2014.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. y Velázquez, E. 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates Phaseolus vulgaris. Int. J. Syst. Evol- Microbiol.56; 2631-2637.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. y Eardly, B. D. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bacteriol. 48; 13-22.
- Velázquez, E., Martínez-Romero, E., Rodríguez-Navarro, D. N., Trujillo, M. E., Daza, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y van Berkum, P. 2001. Characterization

of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1008-1010.

Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. pp. 4386.

Zehr, J. P., Wyman, M., Miller, V., Duguay, L. y Capone, D. G. 1993. Modification of the Fe Protein of Nitrogenase in Natural Populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbio*; 59, 669-676

ANEXOS

ANOVA: Diametro de Tallo (mm) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	14.54	4.845	1.54	0.221
Error	36	113.22	3.145		
Total	39				

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
2	10	5.458	A
4	10	4.634	A
1	10	4.306	A
3	10	3.800	A

ANOVA: Peso Fresco vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	0.005636	0.001879	4.68	0.007
Error	36	0.014447	0.000401		
Total	39	0.020082			

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
2	10	0.0567	A
1	10	0.0511	A B
3	10	0.0309	B
4	10	0.0301	B

o