

## MEJORAMIENTO DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO EN EL FRIJOL

Investigadores :

COSTA RICA	Alice Zamora Z. José J. Rodríguez Oscar Acuña	C.N.P. Líder C.N.P. U.C.R.
GUATEMALA	Juan José Soto Marcial Guzmán Rolando Aguilera	I.C.T.A. I.C.T.A. U. de San Carlos
EL SALVADOR	Ovidio Coto Buenaventura Arqueta	U. de El Salvador Región I - Santa Ana M.A.G.
HONDURAS	Juan Carlos Rosas Eduardo Robleto	Escuela Agrícola Panamericana Escuela Agrícola Panamericana
CUBA	German Hernández B.	Ministerio Agricultura

Duración esperada : 3 (tres) años

## INTRODUCCION

El frijol constituye una de las leguminosas comestibles más importantes debido a su amplia distribución por ser un complemento nutricional indispensable en la dieta de los pobladores de nuestra región.

Como fuente de proteína exige alta disponibilidad de Nitrógeno en la planta, sin embargo nuestros suelos son pobres en ese elemento, por lo que limita la producción de frijol y los cultivos asociados. La fertilización nitrogenada es ineficiente y además resulta costoso adquirirla, pues el cultivo del frijol está concentrado en agricultores de pequeñas y medianas extensiones; una buena opción es mejorar la capacidad simbiótica del frijol con Rhizobium phaseoli.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

En 1985 con la ayuda de P.N.U.D. se formó una red de microbiólogos y agrónomos para efectuar investigación sobre la fijación biológica de nitrógeno (F.B.N.) a nivel centroamericano.

Como producto de la creación de esta red, actualmente se cuenta con la siguiente información :

a-Aproximadamente 200 cepas de R. phaseoli han sido aisladas en la región, la mayoría de éstas se encuentran almacenadas en Costa Rica y Cuba.

b-Se han efectuado 15 ensayos donde se evaluaron grupos de cepas, tanto nativas como introducidas, en diferentes suelos. Como resultado se seleccionaron algunas cepas promisorias para ciertas zonas : San Carlos - Costa Rica, Matanzas - Cuba, Santa Ana - El Salvador.

c-A partir de las cepas promisorias que fueron seleccionadas se han conducido 16 ensayos con variedades comerciales locales para evaluar el beneficio de la inoculación. En la mitad de estos ensayos se obtuvieron respuestas significativas de hasta un 40% de incremento en la producción.

d-Paralelamente a la selección de cepas se debe evaluar la capacidad de los genotipos de la planta de frijol para fijar nitrógeno. Al respecto se han establecido 5 experimentos en los cuales se han notado diferencias, tanto en, nodulación como en rendimiento en condiciones de bajo nitrógeno mineral.

e-Se han establecido ensayos de inoculación en fincas en Santa Ana - El Salvador, San Isidro del General, San Carlos - Costa Rica, Matanzas, Ciego de Avila - Cuba. A partir de estos ensayos se permitió la comercialización en Cuba.

Los resultados hasta ahora obtenidos han demostrado que la F.B.N. es un estrategia viable para incrementar la producción, además es de bajo costo y contribuye a la sostenibilidad de la producción de los cultivos.

Hace falta, sin embargo, afinar las prácticas de manejo que optimicen la fijación de nitrógeno en este cultivo para mejorar la productividad del beneficio de la inoculación. Para lograr estos objetivos se debe dar continuidad a la investigación ya iniciada en la región, para lo cual se cuenta con personal especializado y valiosa infraestructura física.

## REVISION DE LITERATURA

Los suelos del trópico presentan una reserva limitada de nitrógeno debido a las pocas fuentes existentes y a la utilización por las plantas. Por esta situación es que se hace necesaria la aplicación de fertilizantes nitrogenados para satisfacer las demandas de los cultivos, aun así estas aplicaciones solo satisfacen una fracción del nitrógeno, por lo que el resto debe obtenerse de otras fuentes y de la Fijación Biológica de Nitrógeno, situación que se presenta con las plantas de la Familia de las Leguminosas.

Esta fijación ocurre mediante una simbiosis entre la leguminosa y Rhizobium phaseoli, en donde el efecto más importante de la asociación es la utilización del nitrógeno atmosférico.

Las bacterias del género Rhizobium se encuentran en la rizosfera de las plantas, son bacterias gram negativas, bacilos cortos, pequeños, móviles por medio de flagelos colocados en el peritricó. (Brack; Smith, 1987).

Este es un grupo de microorganismos genéticamente diversos, están clasificados dentro de la Familia Rhizobiacea por su habilidad para formar nódulos en las leguminosas. Las especies de Rhizobium están colocadas en dos grandes grupos basados en sus características de crecimiento :

-las de crecimiento rápido y productoras de ácido que nodulan al frijol, trébol, alfalfa, etc.

-las de crecimiento lento productoras de "alcali" que nodulan a la soya, caupí, etc.

Son bacterias gram negativas que presentan colonias blancas a lechosas y gomosas. Crecen en un medio agarlevadura, monitol solo o con indicadores como el rojo congo o azul de bromotimol (Graham; Parker, 1964)

Ciertas cepas de Rhizobium nodulan solamente leguminosas de género o especies particulares y entre las cepas que nodulan una especie o género se encuentran unas potencialmente más efectivas para fijar nitrógeno. (Singleton; Stochinger, 1983).

Aquellas cepas que son altamente efectivas fijan nitrógeno en condiciones óptimas; sin embargo algunas expresan su potencial de fijación bajo condiciones ambientales particulares, mientras que otras no lo hacen. (Vincent; Waters, 1953).

Por lo tanto, una cepa que se utilice como inoculante de una leguminosa en particular deberá ser seleccionado de una amplia variedad de cepas probadas con la leguminosa bajo las condiciones de suelo y clima en que se desarrollará ésta (Chamber; M, 1980).

Las cepas pueden obtenerse de colecciones internacionales o aisladas de nódulos extraídos de plantaciones en el país.

Mediante algunas técnicas se puede aislar y reproducir la bacteria que está dentro del nódulo; esto permite realizar estudios de la capacidad de fijación y de la ecología de Rhizobium, que permitirán obtener cepas de Rhizobium muy eficientes que pueden ser usadas en la fabricación de inoculantes. La selección en el campo se realiza mediante pruebas con las cepas más efectivas y las leguminosas recomendadas. (Sylvester-Bradley; Kipe-Nolt; Harris, 1987)

La inoculación consiste en poner cepas seleccionadas de Rhizobium, que son altamente infectivas para leguminosas específicas y altamente efectivas en la fijación de nitrógeno, en el suelo o sobre la superficie de las semillas de la planta huésped. Hecha de buena manera, la inoculación asegura un buen rendimiento bajo condiciones limitantes de nitrógeno sin la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados. (Hubbell, 1986).

Los programas de mejoramiento ofrecen una alternativa para mejorar el rendimiento del frijol, el cual requiere de la incorporación de resistencia a enfermedades e insectos más importantes, así como el mejoramiento para tolerancia a factores de suelo y ambientales que causan estrés y limitan los rendimientos en cultivos comerciales y de subsistencia. La fijación simbiótica de nitrógeno (N) provee una fuente importante de N. para mejorar los rendimientos en áreas con suelos pobres en N., o donde el fertilizante N. es costoso o difícil de obtener. (Rosas; Bliss, 1986)

La necesidad de aumentar la capacidad de fijación de N<sub>2</sub> en la planta hospedera (P. vulgaris) se basa en :

- 1)-los rendimientos son bastantes bajos comparados con otros cultivos,
- 2)-el frijol y otras leguminosas de grano usan bastante N.,
- 3)-el fertilizante N. es costoso y frecuentemente difícil de obtener;
- 4)-la inoculación/inoculantes superiores por sí solos no aumentan la fijación de N<sub>2</sub> en gran proporción y,
- 5)-la planta hospedera constituye un organismo limitante en la simbiosis (Rosas; Bliss, 1986).

El frijol común ha sido considerado como inferior a otras leguminosas de grano en su habilidad para sostener una simbiosis eficiente en la proporción del N. total derivado de la atmósfera y N<sub>2</sub> total fijado por planta. Sin embargo, esta inferioridad fue atribuida en parte al hecho de que las evaluaciones iniciales fueron hechas con material varietal, cepas de Rhizobium y condiciones inadecuadas. Las diferencias genotípicas de la cantidad de N<sub>2</sub> fijado y los caracteres específicos de la fijación de N<sub>2</sub> son usualmente enmascarados por características de la planta que pueden afectarlos directa o indirectamente. Usualmente, las plantas que muestran la más alta fijación de N<sub>2</sub> son aquellas con floración y madurez tardías, gran follaje, y poseen un hábito de crecimiento indeterminado. (Graham y Halliday, 1977; Mc Ferson, 1983; Rosas, 1983).

Mediante este proyecto esperamos identificar genotipos de frijol con incrementos en el potencial de fijación de N<sub>2</sub> y a la vez del rendimiento total. Además mejorar el uso de inoculantes, las prácticas de inoculación y producir cepas superiores de Rhizobium adaptadas a nuestra región.

## OBJETIVOS

### General :

Optimizar el beneficio de la F.B.N. en la productividad del cultivo de frijol.

### Específicos :

- 1.-Aislar, purificar y autenticar cepas locales.
- 2.-Seleccionar cepas por su capacidad de estimular el crecimiento de la planta en condiciones de suelo.
- 3.-Evaluar viveros regionales por su capacidad de nodulación y rendimiento de grano en suelos con bajo nitrógeno mineral.
- 4.-Identificar posibles padres para programas de mejoramiento.
- 5.-Evaluar a nivel de finca las mejores combinaciones cepa-cultivar.
- 6.-Validar con los agricultores.
- 7.-Mejorar la comunicación en la red.

### Materiales y Métodos :

- 1.-Aislar, purificar y autenticar cepas locales.

Costa Rica va hacer el encargado de aislar, purificar y autenticar las cepas regionales, aprovechando su capacidad instalada : infraestructura y personal.

Cada país enviará de 5-10 muestras de nódulos deshidratados en tubos con sílica gel. El procedimiento a seguir será el recomendado por el Manual de métodos : Simbiosis - Leguminosas - Rizobio. Ciat - 1988.

## 2.-Selección de cepas.

a)-Preselección : se efectuará en Costa Rica con base en las cepas anteriormente aisladas y cepas testigo internacionales. Para esto se establecerán por año 2 ensayos en diferentes localidades con 30-40 cepas y la variedad que mejor capacidad de fijación presente según los datos de 1989.

Se utilizará un diseño experimental de bloques completos al azar con 5 repeticiones. La parcela útil la constituirá un surco de 4 metros de largo.

En 1 metro de la parcela se evaluará el peso seco de la parte aérea de las plantas en las etapas R6 y R8. Además de ser posible en R8 se evaluará el N. total.

La inoculación se realizará con inoculante granulado, aproximadamente 1 gramo/metro.

Al momento de la siembra se fertilizará con 50 Kgr. de P2O5 y dependiendo del análisis de suelo, con boro y magnesio.

Se incluirán dos testigos: 1-sin nitrógeno (-N). 2-con nitrógeno (+N ; 50 Kgr. urea a la siembra, 20 Kgr. en V4 y R5).

Las mejores cepas serán enviadas a todos los países de la región para ser evaluadas en suelos locales.

b)-Selección Local : se realizará en todos los países, con la variedad que mejor comportamiento presente en cuanto a nodulación y fijación se refiere.

Se utilizará la metodología descrita en preselección, con aproximadamente 10 cepas y 2 testigos (+N, -N).

Localidades :

GUATEMALA	:	CHIMALTENANGO, JUTIAPA
EL SALVADOR	:	SANTA ANA
COSTA RICA	:	SAN CARLOS
HONDURAS	:	ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
CUBA	:	PINAR DEL RIO, MATANZA, HOLGUIN

### 3.-Evaluación de viveros regionales.

Los germoplasmas presentes en el Vicar serán evaluados. Se establecerán 2 Vicar negro en Guatemala (Chimaltenango, Jutiapa), 1 Vicar rojo en Honduras (E.A.P.) y otro en Cuba (Habana).

Al momento de la siembra se fertilizará con elementos necesarios, excepto N. Con una mezcla de 3 cepas seleccionadas de los ensayos realizados en 1989 se procederá a inocular.

El diseño experimental a utilizar será en parcelas divididas con 3-4 repeticiones. La parcela principal la constituirá los tratamientos de nitrógeno :

a)-bajo nitrógeno + inoculante

b)-fertilización con urea (50 kgr. N. a la siembra, 20 kgr. en V4 y R5). Las sub-parcelas serán los genotipos.

En V4 y R5 se evaluará el número de nódulos rojos y el tamaño de estos. El rendimiento total en 6-8 plantas por parcela inoculada.

Se espera estar trabajando con el Vidac en el segundo y tercer año del proyecto.

### 4.-Identificar posibles padres.

Los resultados obtenidos en los viveros regionales serán enviados a los programas de mejoramiento con el objetivo de que se tome en cuenta las líneas promisorias de Fijación en la programación de cruzas.

### 5.-Evaluación a nivel finca.

A partir del primer semestre de 1991 se iniciarán los ensayos en Fincas. Se realizarán 2 experimentos por zona en cada país.

Localidades :

Guatemala : Chimaltemango, Jutiapa.

El Salvador : Santa Ana.

Cuba : Pinar del Río, Holguín.

Costa Rica : Región Brunca, San Carlos.

El diseño experimental a utilizar es un bloques completos al azar, con 3-4 repeticiones, dos genotipos. La parcela útil será formada por 4 surcos de 4 metros de largo.

Los tratamientos serán :

- a)-inoculado
- b)-bajo nitrógeno
- c)-solamente nitrógeno (siembra, V4 y R5).

Las variables a evaluar serán : número y tamaño de nódulos rojos. En R6 peso seco de la parte aérea de 8 plantas y rendimiento de grano en los 2 surcos centrales.

#### 6.-Validar con los agricultores.

En 1991 se procederá a validar en Cuba : Holguín y Pinar del Río.

Se empleará alrededor de 1 ha/tratamiento. Los tratamientos serían :

- a)-tecnología tradicional
- b)-nueva tecnología (cepa io variedad)

En V4 y R6 se evaluará el número de nódulos rojos y su tamaño. Además el rendimiento en grano.

#### 7.-Mejorar comunicación.

Se mantendrá un registro de personas involucradas en la investigación de F.B.N. en frijol a nivel de cada país.

Las personas relacionadas con F.B.N. en frijol se encargarán de realizar un informe anual del proyecto y lo darán a conocer al Programa Nacional de Frijol de su país.

En los siguientes P.C.C.M.C.A. se presentarán los trabajos realizados el año anterior en F.B.N. en frijol, y los representantes de cada país discutirán y analizarán los avances y necesidades del proyecto, esto en un día adicional.

## RESULTADOS ESPERADOS:

Año 1990.

### 1- Aislamiento, purificación y autenticación de cepas locales.

En este paso se espera obtener unas 50 cepas provenientes de toda la región debidamente purificadas y autenticadas; se conservarán en Costa Rica.

### 2- Selección de cepas.

#### a- Preselección:

Con los trabajos de preselección se espera obtener al menos 5 cepas que muestren una mayor nodulación y desarrollo de las plantas; estas serán enviadas a los diferentes países para realizar las pruebas de selección local.

#### b- Selección local:

Se realizará esperando obtener una o dos cepas que muestren una mayor eficiencia bajo las condiciones propias de cada país donde se evalúen.

### 3- Evaluación de viveros regionales.

La finalidad es observar la respuesta de los inoculantes producidos con las cepas anteriormente seleccionadas sobre el gémoplasma que conforman los VICARES, tanto negro como rojo.

### 4- Identificación de posibles padres.

Las líneas de los viveros que muestren una mejor respuesta a la fijación deben ser incluidas en los programas de mejoramiento.

Año 1991.

En el transcurso de este período se esperan obtener los resultados descritos para el año 1990, pero además se incluirán las siguientes evaluaciones:

### 3- Evaluación a nivel de finca.

Al tener respuesta de las mejores cepas sobre las variedades comerciales existentes en cada país, se harán pruebas de finca para observar la respuesta de esta metodología bajo diferentes condiciones.

### 6- Validar con los agricultores.

Se espera corroborar la eficiencia de las cepas evaluadas en los pasos anteriores sembrando parcelas de una hectárea en fincas de los agricultores, esto con la finalidad de comparar la técnica del agricultor con la nueva metodología, la cual producirá mayores rendimientos.

### 7- Mejorar comunicación.

Al mejorar la comunicación se espera que entre los países de la red toda información sea transmitida de un país a otro sin ninguna dificultad.

Año 1992.

Durante este año se realizarán los puntos comprendidos entre el 3 al 7, esperando obtener resultados similares a los descritos para los años anteriores.







1-Aislar, purificar y autenticar cepas locales

2a-Preselección de cepas

2b-Selección local de cepas

3-Evaluación de viveros regionales

5-Evaluación a nivel de Fincas

6-Validar con los agricultores

7-Mejorar comunicación

## BIBLIOGRAFIA

- ACUNA, O. 1989. Manejo y tecnología de la asociación simbiótica Rhizobium - Leguminosa. In Curso Manejo Agronómico de Frijol. San Isidro del General. Costa Rica. Centro Internacional de Agricultura Tropical. 16 p. (mimeógrafo)
- BRACK, D; SMITH, D; MADIGON, M. 1987. Microbiología. Prentice - Hall Hispanoamericana S.A. México. 906p.
- CHAMBER, M. 1980. Especificidad en la simbiosis entre tres variedades de soya (Glycine max) y cuatro razas de Rhizobium japonicum. An I N I A. Ser. Producción vegetal #12 : 269-277.
- ELKAN, G. 1987. Symbiotic nitrogen fixation technology. Marcel Dekker, inc. New York. 371-387p.
- ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA. 1988 Reporte anual de investigación - R A I - 88. Vol. 1. Honduras. 75p.
- GRAHAM, P; PARKER, C. 1964. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria y legumes. Plant and Soil 20 (3) : 383-396.
- GRAHAM, P.H. y J. MALLIDAY, 1977. En : J.M. Vincent (editor), Exploiting the legume - Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. Univ. Hawaii Coll. Trop. Agric. Misc. Publ. 145 : 313 - 334.
- HERNANDEZ - BARRUETA, G.; GUZMAN, J. and HERNANDEZ, S. 1987. Experimental selection and use of native Rhizobium phaseoli strains under production conditions in Cuba. Proc. of the 9th Int. Symp. on Soil Biol. and Conserv. of the Biosphere. 345 - 349 p.
- HUBBELL, D. 1986. Producción y uso de inoculantes. Ceiba. 27 (1) : 17 - 22.
- Mc FERTSON, J.R. 1983. Genetic and Breeding Studies of nitrogen fixation in common bean, Phaseolus vulgaris (Ph D Thesis, Univ. of Wisconsin, Madison, 147 p.)

POCORRAKY, R; BAYNE, H. 1984. Symbiotic interactions between strains of Rhizobium phaseoli and cultivars of Phaseolis vulgaris. Crop Science 24 : 101 - 105.

ROSAS, J.R.; BLISS, F. 1986. Mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno en frijol común. Ceiba 27 (1) : 105 - 116.

-----;-----, 1986. Improvement of the nitrogen fixation potencial of common bean in Latin America. Ceiba 27 (1) : 245 - 259.

ROSKOSKI, J. 1986. Ensayos de selección de cepas y respuesta a la inoculación. Ceiba 27 (1) : 245 - 259.

SINGLETON, P.; STOCKINGER, K. 1983. Compensation against ineffective nodulations in soybean, Crop Science 23 : 69 - 72.

SYLVESTER - BRADLEY, R.; KIPE - NOLT, J.; HARRIS, D. 1987. Simbiosis - Leguminosas - Rizobio : evaluación, selección y manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical (C.I.A.T.). Cali, Colombia, 71p.

VINCENT, J.; WATERS, L. 1953. The influence of the host on competition amongst clover root - nodule bacteria. J. Gen. Microbiology 9 : 357 - 370.

OBJETIVOS	ACTIVIDADES	PAIS	AÑO
AISLAR, PURIFICAR, Y AUTENTIFICAR CEPAS LOCALES.	MUESTRAS DE NODULOS	C.R.	1990,91
SELEC. DE CEPAS	ENSAYO EN CAMPO CON	C.R.	1990,91
SELEC. LOCAL	ENSAYO EN CAMPO CON CEPAS RESULTANTES DE PRESENTACION.	RED	1990,91
EVALUACION DE VIVEROS REGIONALES	EVALUAR EFECTO DE CAPACIDAD DE FIJAR DEL GERMOPLASMA, E IDENTIFICAR PADRES.	GAUTE. HONDU. CUBA	1990,91,92
EVALUAR A NIVEL DE FINCAS	LLEVAR A FINCAS LA MEJOR COMBINACION GENOTIPO, CEPA.	RED	
VALIDAR CON AGRICULTORES	PROPORCIONAR LA TECNOLOGIA A LOS AGRICULTORES JUNTO CON EL ASESORAMIENTO RESPECTIVO.	CUBA	

GIRA: Julio 1990 ó 91. Líder, 1 tec.  
 1 tec. Guatemala <sup>Lugar</sup> Cuba Evaluar y Rev. Trab.  
 1 tec. Honduras El Salvador