

**EVALUACIÓN DE TRES CEPAS DE *Rhizobium etli*
BAJO CONDICIONES DE CAMPO Y DE OCHO
SOPORTES DE LA BACTERIA PARA LA
PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN DOS
VARIETADES DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*).
TUMBACO- PICHINCHA**

CAMPAÑA CRUZ DIEGO FABRICIO

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD
DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

QUITO

2003

VII. RESUMEN

El fréjol es originario del continente americano. Procede de Centro América y los Andes Sudamericanos, donde se empezó a cultivar y tuvo gran desarrollo en las civilizaciones Azteca, Inca y Maya. En los países citados se han encontrado restos fósiles de semillas y legumbres (53). A Europa lo llevaron los colonizadores, principalmente los españoles. De allí se distribuyó a Irán , India, Oriente Medio y a otros lugares de Asia y África (67).

El fréjol en la Región Interandina del Ecuador es sembrado por pequeños y medianos agricultores en suelos con bajo contenido de nutrientes, especialmente nitrógeno. La inoculación con *Rhizobium* es una alternativa razonable a la fertilización N, ya que aprovecha la fijación biológica de N por parte de las leguminosas al asociarse con las bacterias del género *Rhizobium* (11). Para una exitosa inoculación se necesitan cepas efectivas y de una alta competitividad con rizobios nativos. Por lo que una selección de cepas que sirvan como inoculante es crucial (8).

En la elaboración de inoculantes el soporte de la mayoría de los inoculantes es sólido y como materia prima se utiliza la turba. Sin embargo no es fácil de disponer de Turba de calidad, o los costos de importación son elevados (91). Por otro lado, hay materiales que por sus propiedades físicas, químicas y biológicas podrían ser usados como portadores así tenemos: compost, carbón mineral, vermiculita y otros (11.).

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) evaluar en el campo tres cepas de *Rhizobium etli* en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), caracterizadas fenotípicamente y genéticamente en la Universidad de Minnesota, para su posterior uso en la producción de inoculante; y, 2) evaluar ocho alternativas de sustratos que proporcionen un buen vehículo para el transporte de inóculo, verificando la sobrevivencia del *Rhizobium etli* en los distintos materiales.

En la primera parte del estudio se evaluó el comportamiento agronómico de tres cepas de *Rhizobium etli* (UMR 1468, UMR 1478, UMR 1481), en asociación con dos variedades de fréjol (INIAP Toa 412 y INIAP Canario SCC2) . Este experimento tuvo lugar en la Granja Experimental Tumbaco del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), localizado en el cantón Tumbaco, Provincia de Pichincha, con una altitud de 2280 msnm, longitud 78° 33' oeste, latitud 0° 22' sur.

Los factores en estudio fueron: dos variedades de fréjol voluble (v1= INIAP Toa 412, v2= INIAP Canario SCC2); Cepas de *Rhizobium etli* (c1=UMR 1481, c2= UMR 1468, c3= UMR 1478, c4= Sin Cepa, c5= Sin cepa + fertilizado), los tratamientos estuvieron constituidos por la interacción de los factores en estudio y sus niveles. Se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con un arreglo factorial 2x5 con 4 repeticiones. La unidad experimental neta se encontraba constituida por los dos surcos centrales, y cada uno con 2.4 m de largo.

Las variables en estudio fueron: peso fresco del follaje, peso seco de nódulos, peso seco de la planta, número de vaina, número de granos cosechados, rendimiento en kg/ha, Porcentaje de nitrógeno, Peso de 100 semillas.

Después del análisis estadístico de peso seco de la planta, peso seco de nódulos, rendimiento y porcentaje de nitrógeno, no se encontró ninguna interacción entre cultivares y cepas. Sin embargo, los resultados mostraron que la cepa UMR 1478 en asociación con el cultivar Toa 412 obtuvo los mejores registros. Los tratamientos con nitrógeno, y aquellos inoculados con la cepa UMR 1478 , rindieron 10874.13 kg/ha, y 8554.53 kg/ha respectivamente.

En la segunda parte de la tesis se evaluó el comportamiento de ocho soportes con una cepa de *Rhizobium etli*, esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Localizado en el cantón Mejía, provincia de Pichincha; con

una altitud de 3050 msnm, longitud 78° 33' oeste, latitud 0° 22' sur. El factor en estudio

fueron los sustratos (s1= capa rosa, s2= ceniza, s3= zeolita, s4= T. Chimborazo, s5= T. Lloa, s6= compost, s7= T. Alaska, s8= vaina de fréjol). El diseño empleado fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro observaciones. La unidad experimental estuvo constituida por fundas de polietileno de 155g cada una. Las fundas con el soporte previamente molido, tamizado (180um), neutralizado, esterilizado fue inoculado con 25 ml de medio de cultivo líquido, el mismo que posee una concentración bacteriana de 1×10^9 cel/ml.

La variable número de rizobios en cada soporte, determinado a través del método denominado siembra superficial en placa se registró a los 8, 15, 30, 60, 90, 120 días después de inoculado. Encontrándose que los soportes que mejor resultado obtuvieron a los 120 días de evaluación fueron: T alaska, Tchimbrazo, ceniza de madera con 3.41×10^8 , 7.50×10^8 , 1.77×10^8 ufc/g de inoculante respectivamente.

Las recomendaciones son:

- Inocular las semillas de fréjol en general, y preferentemente la variedad INIAP Toa 412, con la cepa UMR 1478, en una concentración de por lo menos 10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de inoculante.
- Adicionar al momento de la siembra una dosis baja (20 kg/ha) de fertilización nitrogenada química, para que la planta tenga la facilidad de crecer rápidamente y desarrollar un sistema radicular apropiado para una excelente nodulación
- Utilizar la Turba de la Provincia de Chimborazo como material acarreador de la bacteria *Rhizobium etli*, con la precaución de controlar el tiempo de expiración (120 días) ya que se corre el riesgo de que el material quede inservible.

- Continuar evaluando a nivel de laboratorio e invernadero los diferentes materiales alternativos a la turba que pueden tener potencial como acarreador de Rhizobium, a través de experimentos relacionados con crecimiento y sobrevivencia.

SUMMARY

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) has centers of origin in both Mesoamerica and Andean South America with a third gene pool possibly in Ecuador and Northern Peru. This crop was well known by Incas in South America and Aztecas and Mayas in Mesoamerica. Archeological discoveries of beans have been found in these regions (53).

Beans are thought to have spread to Europe by Spaniard settlers, and from Spain the crop was spread to African and Asian countries (67).

Beans are cultivated in Ecuador mainly by small farmers. In general, soils have low fertility especially in nitrogen content. Seed inoculation with the soil bacteria *Rhizobium* is a reasonable biological fertilization alternative, since *Rhizobium* fix atmospheric nitrogen in association with the legume (11). For a successful inoculation it is necessary effective and competitive strains. For this reason a strains selection program to be used as inoculants is crucial (8).

In the inoculants elaboration the main carrier of *Rhizobium* is the peat, a soil rich in organic matter. Unfortunately it is difficult to obtain a high quality peat or the importation costs of the carrier are high (91). Therefore, it is necessary to find carriers alternatives that meet physical, chemical and biological requirements for *Rhizobium*.

Among these alternatives are vermiculita, compost, and mineral charcoal, including other peats (11).

The objectives of this research were: 1) to evaluate under field conditions three bean-*Rhizobium etli* strains associated with this crop, characterized phenotype and

genetically in the University of Minnesota, for their use in the inoculant production, and b) to evaluate eight substrates as *Rhizobium* carriers to be used as inoculants.

The first study evaluated the agronomic behavior of three *Rhizobium etli* strains (UMR 1481, UMR1468, and UMR1478) in association with two bean cultivars (INIAP TOA 412, and INIAP Canario SCC2). The strains were phenotypic (carbon and nitrogen sources; antibiotics; heavy metals resistance; acidity, etc.) and genetically (BOX-PCR analysis) characterized at the University of Minnesota (8). The present study was conducted in the Experimental Farm Tumbaco from INIAP (National Institute of Agricultural Research) located in the Province Pichincha (2280 meters, 78 33 W, 0 22 S). Water irrigation and crop management practices were applied as needed.

The study treatments were the combination of bean cultivars versus strains. Controls with (80 kg N/ha, four applications) and without nitrogen were also included. A random complete blocks design was used with a factorial arrangement 2 x 5 and four reps. The experimental unit included two central rows of 2.4 m length each.

The evaluation variables were: a) nodule dry weight, b) plant fresh and dry weight, c) pods number, d) seed number, e) weight of 100 seeds, f) yield in kg/ha, and g) nitrogen percentage (Soil Department of INIAP). A parameters were subject of analysis the MSTAT program.

After the statistical analysis of nodules dry weight, plant fresh and dry weight, nitrogen percentage, and yield, no interaction was found among cultivars versus strains. However the results showed that the strain UMR1478 in association with the cultivars TOA 412 gave the best results. The treatment plus nitrogen, and the treatment TOA 412 inoculated with the strain UMR1478, yielded 10874.13 kg/ha, and 8554.53 kg/ha, respectively.

The second study evaluated eight substrates as *Rhizobium* carriers: “capa rosa”, ash, zeolita, peat from the Province of Chimborazo, peat from Lloa, compost, peat from Alaska, and a substrate prepared on base of grinded bean pods. The experiment was conducted in the lab of the Plant Protection Department (Santa Catalina, INIAP) located in the Province Pichincha (3050 meters, 78 24 W, 0 13 S). A random complete design was used with four observations. The experimental unit included 150 grams polyethylene pouches. Pouches with the carrier previously grinded, sieved (180 μm), neutralized (pH 7), and autoclaved were inoculated with 25 ml of liquid culture broth with a concentration of 1×10^9 cells/ml.

Number of *Rhizobium* cells (strain UMR 1478) in each carrier was determined using the superficial growing method in Petri dishes at 8, 15, 30, 60, 90 and 120 days after inoculation.

The best carriers at 120 days were the peat from Chimborazo, and peat from Alaska with populations of 7.50×10^8 and 3.41×10^8 ufc/g of inoculant, respectively.

Recommendations:

- To inoculate the TOA 412 bean cultivars preferably with the strain UMR1478, with a concentration of 10^8 ufc/g of inoculants.
- Add at the planting date a low doses of nitrogen chemical fertilizer (20 kgN/ha) in order to stimulate seed germination and root development suitable for an efficient nodulation.
- Use peat from Chimborazo as carrier for *Rhizobium* strains taking in consideration the expiration time of 120 days.

- Continue the evaluation (growth and survival) of other substrates as carriers for the bacteria *Rhizobium*.