



# **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**



Facultad de Químico Farmacobiología

## **Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) a la inoculación con *Azospirillum sp* y *Rhizobium sp* y posterior aplicación de fertilizante foliar.**

Tesis para optar al título de:

**Química Farmacobióloga**

Presenta:

***María Susana Mireles Hernández***

Asesor de Tesis:

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología**

**Juan Manuel Sánchez-Yáñez**

Morelia, Michoacán., Septiembre del 2013



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Laboratorio de Microbiología Ambiental**

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez en el laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH con el apoyo del proyecto 2.7 (2013) de la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH.



Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto 2.7 (2013) de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al consejo estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por su apoyo incondicional en la dirección de esta tesis.

De manera especial a los integrantes del Comité Tutorial: D.C. Liliana Márquez Benavides; M.C. Cintia Aire Rincón Hernández; M.C Rosa María García Martínez; D.C Eduardo Valencia Cantero; & D.C. Javier Villegas Moreno porque gracias a su valioso tiempo que me dedicaron enriquecieron esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A mi Dios, la esencia de mi vida, el motor de mi existencia, que sin su ayuda, no soy ni hubiese llegado hasta donde estoy, no hay palabras para describir este sentimiento de felicidad, que de lo más profundo de mi corazón y mi alma nace, esa pequeña que llego con un sueño y que ahora profesionalmente gracias a él, lo ha logrado.

A mi Licha, porque gracias a su apoyo y sacrificio me dio mi carrera, ese ángel que me cuido aún lejos de mí, que me levanto cuando caí, que estuvo en mis derrotas y ahora en mis triunfos, que me ha guiado a lo largo de mi vida y que espero en Dios me la conserve para regresarle un poco de todo lo que ella me ha dado. Gracias mamita por ser mi amiga, mi ejemplo y mi apoyo.

A mi papi Juan, que si no hubiera sido por ese “que se quede toda la semana” al inicio de mi carrera, no hubiera llegado hasta lo que soy ahora. Por su tiempo para acompañarme a tomar mi autobús todas las semanas a lo largo de 5 años, por ser el mejor ejemplo de padre responsable y amoroso.

A mi abuelito Juan, por apoyarme en todo lo que podía, por ese gran recibimiento semana tras semana, y por quererme tanto.

A mi hermano Juan Luis, mis hermanas Fátima, Clarita y Ale, por ser parte de esa hermosa familia que Diosito me regalo, porque a pesar de nuestras peleas, siempre estuvieron en mi mente y en mi corazón impulsándome a lograr mi meta.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez - Yáñez porque no fue casualidad coincidir en el camino, sino que era mi destino, gracias por todos los conocimientos que me enseñó, por ser mi asesor, mi amigo, mi apoyo incondicional, porque sus consejos me ayudaron a ser mejor ser humano y ahora mejor profesionalista. Gracias por la gran oportunidad de obtener mi primer empleo y por su confianza.

A mis amigas Yenivita y Gladys, porque más que eso, son mis hermanas, gracias por apoyarme y estar conmigo en los momentos difíciles, gracias por esas aventuras que pasamos juntas, las quiero.

A todos mis compañeros de carrera, por apoyarme al comprar mis dulces para poder solventar los gastos de mi carrera. A mi amigo Noé, que fue mi ángel protector.

A mi amigui Paco, a Dani y a mi maty, porque llegaron a ser más que mis amigos, mi familia no tengo palabras para agradecer a Dios por haberlos puesto en mi camino.

A Pedro, Yatziri, Mariana, Mayra, Ivan, Julissa, Martin, Martha por brindarme su amistad y apoyo incondicional, y por formar la gran familia del laboratorio de Microbiología Ambiental, todos los momentos que pasamos juntos nunca los olvidare.

A todas las personas que con sus bendiciones me acompañaron a lo largo de estos 5 años fuera de mi hogar, por contribuir a mi triunfo de lograr mi sueño de ser Químico Farmacéutico biólogo.

Gracias

# CONTENIDO

|                                                                                                                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. RESUMEN.....                                                                                                                                                                                                    | XI        |
| <b>1.1 Abstract</b> .....                                                                                                                                                                                          | XII       |
| 2. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                                                                                              | 1         |
| <b>2.1 Importancia de los fertilizantes foliares en el cultivo del frijol y otras alternativas ...</b>                                                                                                             | <b>1</b>  |
| 3. ANTECEDENTES.....                                                                                                                                                                                               | 3         |
| 4. HIPÓTESIS.....                                                                                                                                                                                                  | 7         |
| 5. OBJETIVO.....                                                                                                                                                                                                   | 7         |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                      | 8         |
| <b>6.1 Variedad del frijol y origen de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 .....</b>                                                                                                              | <b>8</b>  |
| <b>6.2 Preparación del sistema Jarra de Leonard .....</b>                                                                                                                                                          | <b>8</b>  |
| <b>6.3 Inoculación y siembra de frijol .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>9</b>  |
| <b>6.4 Nutrición del frijol.....</b>                                                                                                                                                                               | <b>10</b> |
| <b>6.5 Antibiograma de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33.....</b>                                                                                                                               | <b>11</b> |
| <b>6.6 Recuperación de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 de la<br/>    esfermosfera/rizosfera del frijol.....</b>                                                                               | <b>11</b> |
| <b>6.7 Variables respuesta consideradas para evaluar la respuesta del frijol a la<br/>    inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 y posterior aplicación de Ff y<br/>    TM. ....</b> | <b>12</b> |
| <b>6.8 Análisis estadístico de resultados. ....</b>                                                                                                                                                                | <b>12</b> |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                                                                                                                     | 16        |
| <b>7.1 Reconocimiento de las cepas de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33.....</b>                                                                                                                | <b>16</b> |
| <b>7.2 Colonización de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 en la<br/>    esfermosfera/rizosfera del frijol.....</b>                                                                               | <b>17</b> |
| <b>7.3 Germinación de la semilla .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>19</b> |
| <b>7.4 Estadio fisiológico de plántula.....</b>                                                                                                                                                                    | <b>20</b> |
| <b>7.5 Estadio fisiológico de floración.....</b>                                                                                                                                                                   | <b>22</b> |
| 8. CONCLUSIÓN .....                                                                                                                                                                                                | 25        |
| 9. VALIDACION DE HIPOTESIS .....                                                                                                                                                                                   | 26        |
| 10. LITERATURA CITADA.....                                                                                                                                                                                         | 27        |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Jarra de Leonard.....                                                                                                                                                         | 8  |
| Figura 2. Respuesta del frijol a la inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 y posterior aplicación foliar de Fertigrain foliar y Tecamin max.....         | 13 |
| Figura 3. Preparación del inóculo bacteriano con los géneros <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 para las semillas de frijol.....                                     | 15 |
| Figura 4. Existencia de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 en semillas y raíces de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) desde la siembra a 30 días posteriores..... | 18 |
| Figura 5. Porcentaje de germinación del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L), inoculado con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33. ....                                | 19 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Diseño experimental para analizar la respuesta del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) a la inoculación con <i>Azospirillum</i> leu 33 y <i>Rhizobium</i> leu 33 y posterior aplicación de Fertigrain Foliar (Ff) y Tecamin Max (TM).....                   | 10 |
| Cuadro 2. Patrón de sensibilidad utilizado para la identificación de <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 bajo condición de no esterilidad.....                                                                                                         | 17 |
| Cuadro 3. Respuesta del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) en su fenotipia; altura de la planta y longitud radical a la inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 y posterior aplicación de Fertigrain Foliar y Tecamin max. ....         | 21 |
| Cuadro 4. Respuesta del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) en su biomasa a la inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 y posteriormente tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max” a nivel de plántula. ....                           | 22 |
| Cuadro 5. Respuesta del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L), en su fenotipia; altura de la planta y longitud radical, a la inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max a nivel de floración..... | 23 |
| Cuadro 6. Respuesta del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L) en su biomasa, a la inoculación con <i>Azospirillum</i> Leu 33 y <i>Rhizobium</i> Leu 33 tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max” a nivel de floración. ....                                          | 24 |

## TABLA DE ACRONIMOS

|     | <b>Acrónimo</b> | <b>Significado</b>                          |
|-----|-----------------|---------------------------------------------|
| 1.  | AP              | Altura de la planta                         |
| 2.  | BPCV            | Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal |
| 3.  | CR              | Control relativo                            |
| 4.  | FF              | Fertilizante Foliar                         |
| 5.  | Ff              | Fertigrain foliar                           |
| 6.  | FN              | Fertilizante Nitrogenado                    |
| 7.  | LR              | Largo de raíz                               |
| 8.  | N               | Nitrógeno                                   |
| 9.  | PST             | Peso seco total                             |
| 10. | SM              | Solución mineral                            |
| 11. | TM              | Tecamin max                                 |
| 12. | UFC             | Unidades formadoras de colonias             |

## 1. RESUMEN

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) es de alto consumo en México, para abastecer esta demanda, se requiere fertilizante nitrogenado (FN) el que en dosis no reguladas en suelo, causa pérdida de su productividad. Una alternativa de solución a este problema es la inoculación de la semilla de frijol con *Azospirillum* y/o *Rhizobium*, con la posterior aplicación de un fertilizante foliar (FF), Fertigrain foliar (Ff) y/o Tecamin max (TM). La hipótesis de esta investigación fue que la aplicación de Fertilizante foliar puede ser optimizada por la inoculación de *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33 en frijol. El objetivo de esta investigación fue analizar la respuesta del frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 con la posterior aplicación de Fertigrain foliar<sup>MR</sup> y Tecamin max<sup>MR</sup>.

Para ello semillas de frijol se inocularon a la siembra con *Azospirillum* clave Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 individual y mezclada en relación 1:1, posteriormente a nivel de plántula y floración se les aplicó Ff y TM, comparada con el frijol sin inocular (control relativo) alimentado con solución mineral aplicada al suelo, equivalente a la dosis de FN recomendada para esta leguminosa.

Las variables para analizar la respuesta del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33 con la posterior aplicación de los fertilizantes foliares fueron: el porcentaje (%) de germinación de semilla, la fenotipia: altura de planta, longitud de la raíz, número y color de las hojas; y la biomasa de parte aérea y radical: peso fresco total (PFT) y peso seco total (PST) a nivel de plántula y floración. Se empleó diseño experimental con bloques al azar con 11 tratamientos y cinco repeticiones. Los datos experimentales se validaron por la prueba de Tukey.

Además se determinó la existencia de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 en el sistema radical del frijol como evidencia de que ambos géneros fueron en parte los responsables del efecto positivo observado en la planta.

Los resultados señalan que el % de emergencia de las semillas de frijol coinoculadas con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33, y las inoculadas con *Azospirillum* Leu 33 fue de 80%, estadísticamente superior al de las semillas alimentadas con la solución mineral sin inocular que fueron usadas como control relativo con un 40%. El frijol a nivel de plántula inoculado con *Azospirillum* Leu 33 y luego tratado con TM alcanzó valores de PFT de 11.3g y PST de 1.1g estadísticamente superior a los del frijol empleado como control relativo con un PFT de 9.9g y un PST de 1.0g. A nivel de floración el frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33-Ff alcanzó un PST de 2.9g, valor

estadístico superior al PST de 1.6g de la leguminosa usada como control relativo. La existencia de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 en la espermosfera/rizosfera del frijol demostró que la respuesta positiva de la leguminosa, fue debido en parte a su actividad benéfica.

Se pudo comprobar que la respuesta positiva del frijol, se debió a la inoculación tanto con *Azospirillum* como *Rhizobium* resultados que se expresaron en la fenotipia y biomasa en los estadios de plántula y floración de la leguminosa.

Por tanto la combinación de la inoculación y fertilización foliar en el frijol es una forma de mejorar la absorción del fertilizante nitrogenado y conservar la productividad del suelo.

**Palabras clave:** hoja, agricultura, sinergismo.

## 1.1 Abstract

The cultivation of beans ( *Phaseolus vulgaris* L ) is high consumption in Mexico , to supply this demand , nitrogen fertilizer is required ( FN ) that unregulated doses soil causes loss of productivity. An alternative solution to this problem is the inoculation of bean seed with *Azospirillum* and / or *Rhizobium* , with subsequent application of foliar fertilizer ( FF ) , Fertigrain leaf ( Ff ) and / or Tecamin max (tm). The hypothesis of this research was that the application of foliar fertilizer can be optimized by the inoculation of *Azospirillum* Leu 33 and / or 33 Leu *Rhizobium* in beans. The objective of this research was to analyze the response of bean inoculated with *Azospirillum* and *Rhizobium* Leu 33 Leu 33 with the subsequent application of Fertigrain foliarMR and Tecamin maxMR

To do bean seeds were inoculated with *Azospirillum* sowing key and *Rhizobium* Leu Leu 33 33 individually and mixed in 1:1 ratio , then at flowering seedling and Ff are applied and TM , compared with uninoculated bean (control relative) powered mineral solution applied to the soil equivalent to the recommended dose for this legume FN .

The variables to analyze the response of bean to inoculation with *Azospirillum* Leu 33 and / or *Rhizobium* Leu 33 with the subsequent application of foliar fertilizers were: the percentage ( % ) of seed germination , the phenotyping : plant height , length the root, number and color of the leaves , and the biomass of shoot and root : total fresh weight ( PFT ) and total dry weight ( PST ) at seedling and flowering. Experimental design was

used with random blocks with 11 treatments and five replications. The experimental data were validated by the Tukey test.

Also determined the existence of *Azospirillum* and *Rhizobium* Leu 33 Leu 33 in the bean root system as evidence that both genders were partly responsible for the observed positive effect on the ground.

The results show that emergency % bean seeds with *Azospirillum* coinoculated Leu 33 and / or *Rhizobium* Leu 33, and Leu 33 inoculated with *Azospirillum* was 80 %, statistically superior to seed the solution mineral fed uninoculated were used as controls with 40% relative. The level bean seedling inoculated with *Azospirillum* Leu 33 and then treated with TM reached 11.3gy PFT values 1.1g PST statistically superior to the bean used as control on a PFT 9.9gy one o'clock PT of 1.0g. At flowering beans inoculated with *Azospirillum* Leu 33 - Ff reached a 2.9g PST, PST statistical value than 1.6g of legume used as a relative control. The existence of *Azospirillum* and *Rhizobium* Leu 33 Leu 33 in the spermosphere / bean rhizosphere showed that the positive response of the legume, was due in part to its charitable work. It was found that the positive response of beans, was due to inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium* both results that were expressed in the phenotyping and biomass in seedling and flowering stages of the legume. Thus the combination of inoculation and foliar fertilization in beans is one way to improve the absorption of nitrogen fertilizer and conserve soil productivity.

**Keywords:** leaf, agriculture, synergism.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Importancia de los fertilizantes foliares en el cultivo del frijol y otras alternativas

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es originario de América y debido a su importancia alimenticia es fuente de carbohidratos, proteína fibra, calcio, hierro, vitaminas y calorías que son elementos importantes para la alimentación de la población rural y urbana (Muñoz, 2011).

El nitrógeno (N) es indispensable para asegurar un crecimiento sano del frijol, su déficit no permite su reproducción. Convencionalmente la manera de nutrir al frijol es aplicar el N como fertilizante al suelo, en forma de compuestos minerales, ahí sus raíces lo absorben, pero realmente no todo el N que se aplica es aprovechado por el sistema radical de la planta, ya que una parte interactúa con la fracción mineral, orgánica y biológica; en consecuencia se volatiliza, lixivia o desnitrifica (Cárdenas-Navarro *et al.*, 2004) así el suelo pierde fertilidad, y contamina el agua y el aire; en contraste la fertilización foliar -FF- aprovecha que la hoja tiene una amplia superficie de absorción, ya que por sus características anatómicas, facilita la incorporación de minerales que sirven de apoyo a la fotosíntesis (Trinidad *et al.*, 2000), lo que estimula su crecimiento, sin pérdida de productividad del suelo, con un ahorro para el agricultor en el costo de producción (Reyes *et al.*, 2008).

Rengel, 2004 explica que la FF tiene la ventaja de incorporar directamente a la hoja del frijol los macro-nutrientes: N, fósforo (P), potasio (K) y micro-nutrientes como zinc (Zn), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), boro (B) y molibdeno (Mo) y también señala la capacidad de absorber elementos nutritivos de forma rápida y directamente sobre la hoja evitándose la contaminación del ambiente e incluso es más barata que la convencional por vía edáfica al requerir una menor cantidad de producto.

Al respecto: Fertigrain foliar<sup>MR</sup> y Tecamin max<sup>MR</sup> son FF comerciales cuyo propósito complementario es mejorar el crecimiento vegetal, al proveer al cultivo de los requerimientos nutricionales necesarios.

A la par con la FF, existen otras alternativas para disminuir u optimizar la aplicación del fertilizante nitrogenado -FN- al suelo para mantener su fertilidad, como la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) del tipo *Azospirillum* y *Rhizobium*, que sintetizan fitohormonas para estimular la germinación, la síntesis de raíces laterales y pelos radicales que favorecen una mejor absorción mineral (Bashan y Holguin, 1994). Mientras *Rhizobium* se aplica con éxito en

leguminosas como la soya (*Glycine max* L), así como *Azospirillum* se aplica en gramíneas en ambos casos para reducir la dosis de la fertilización nitrogenada –FN- sin riesgo para su crecimiento sano y rendimiento rentable.

Se ha evaluado la coinoculación en la semilla de frijol con *Rhizobium* y *Azospirillum* que tiene una acción positiva en el desarrollo radical y el vástago de la leguminosa (Aguirre-Medina *et al.*, 2005 citados por Aguirre *et al.*, 2009), por tanto la inoculación a la siembra del frijol con *Azospirillum* y *Rhizobium*, facilita la germinación y mejora su crecimiento (Dardanelli, 2008) cuando ambos géneros transforman los exudados de semilla germinada y las raíces de la leguminosa en fitohormonas, lo cual podría asegurar una productividad agrícola, económica y ecológica sin causar contaminación ambiental.

### 3. ANTECEDENTES

En la agricultura la regulación de la aplicación del FN al suelo es motivo de controversia por los problemas de pérdida de fertilidad que causa además del elevado costo de los insumos involucrados, contaminación; en oposición existe la opción de la FF y/o el uso de BPCV que asegure el cultivo sano de frijol.

La literatura no reporta comúnmente la inoculación del frijol con *Azospirillum* dada su relación con las gramíneas, mientras que esta leguminosa tiene una respuesta irregular a la inoculación con *Rhizobium* en términos de biomasa y/o rendimiento, en combinación con el uso de FN en suelo, por lo que las investigaciones que se reportan a continuación son sobre la inoculación del frijol con *Azospirillum* y *Rhizobium* y la aplicación de FF, de manera independiente.

López *et al.*, 1998, con el objeto de analizar nuevas tecnologías para el cultivo como la aplicación de la FF de urea en frijol. Evaluaron la concentración de urea 1.75% en tres variedades de frijol: Negro Cotaxtla-91, Negro INIFAP y Negro Tacaná a nivel de plántula, prefloración y llenado de vainas. Los resultados destacan que la FF de urea en dosis de 1.75% en frijol en prefloración y llenado de vainas incremento su rendimiento en un 17%, en comparación con la leguminosa usada como control relativo sin fertilizar foliarmente.

Zepeda, 2002 con el objeto de evaluar el efecto de la fertilización foliar en maíz (*Zea mays* L). Bajo un diseño de bloques al azar, aplicaron los diferentes FF: macro y micronutrientes, macronutrientes, micronutrientes y miel de abeja a nivel de floración y madurez fisiológica. Los resultados indican que los FF tuvieron efecto significativo sobre los porcentajes de germinación, peso seco de parte aérea, de raíz y de plántula, pero no en floración media, ni en rendimiento. La solución con macro más micronutrientes y la de micronutrientes incrementaron en 5 y 4% la germinación y el peso seco de su parte aérea.

Graterol *et al.*, en 2006 llevaron a cabo un estudio con el objeto de evaluar la aplicación del FF de marca registrada Nitrofosca. Estudiaron siete variedades de frijol con y sin

FF. Con las variables respuesta de biomasa y rendimiento. Los resultados señalan que la aplicación de Nitrofosca<sup>MR</sup> incremento en 13% el rendimiento promedio de las variedades de frijol en comparación con el homologo sin fertilizar. El mayor incremento de 38% se produjo en el frijol “Pico negro” grano grande. El aumento de rendimiento se debió al incremento en el peso de los granos por vaina.

Mejía-Bermúdez *et al.*, en el 2008, con el propósito de evaluar la efectividad de diferentes dosis de un FF sobre el rendimiento del cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) emplearon un diseño de bloques al azar con 4 tratamientos y dos repeticiones: T1 (frijol testigo) sin FF; T2 frijol a dosis 0.25kg de FF; T3 a dosis 0.37 kg, y T4 a dosis de 0.5kg de FF, todos disueltos en 10.0 L de agua. Se realizaron mediciones a los 21, 36 y 51 días, después de la siembra de la leguminosa con las variables respuesta biomasa y rendimiento. Los resultados indican que el frijol a dosis de FF de 0.5kg alcanzo la mayor producción en el número de vainas por planta (18.67), de granos por vaina y peso total de los granos de frijol, en cambio el frijol empleado como testigo (sin FF) fue el que registro el menor rendimiento con respecto a todas estas variables. El uso del FF aumento el rendimiento del cultivo de frijol en todas las dosis alcanzándose porcentajes de 36% a dosis de 0.5kg -en comparación con el frijol empleado como testigo- de 15%, por lo que se considera que la aplicación de FF fue efectivo en función del rendimiento (vainas/planta, granos/vaina y peso) para todos los tratamientos, en comparación con el frijol testigo, por tal razón se considera que es una alternativa para maximizar los rendimientos del cultivo de frijol.

Borowski *et al.*, en 2011 realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar la respuesta del frijol a diferentes concentraciones de urea vía foliar. Para lo cual diseñaron un experimento con 6 tratamientos y 4 repeticiones: el frijol con las dosis 0,40, 60, 80, 100 y 120g de fertilizante aplicado en diferentes momentos del día 08h, 16h y 20h. El FF se aplicó a nivel de plántula, prefloración, floración y madurez fisiológica. Las variables respuesta de estudio fueron: número de flores, biomasa: contenido total de N en hojas, numero de vainas/planta, numero de granos/vaina, peso de 100 granos. Los resultados obtenidos están por encima del nivel crítico de N para el frijol que es de 30g donde la dosis de 40g alcanzó valores superiores en biomasa en comparación con el frijol fertilizado al suelo.

Burdman *et al.* 1996, plantearon que la coinoculación del frijol con *Rhizobium etli* y *R. tropici* incrementa su rendimiento al igual que el análogo coinoculado con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y *Azospirillum brasilense*. Los resultados indican que el mayor rendimiento se alcanzó en el frijol inoculado con *Azospirillum* de manera individual en comparación con el frijol usado como control sin inocular.

Molla *et al.* 2001 con el objeto de evaluar el potencial de crecimiento de las raíces en soya evaluaron la aplicación de *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* coinoculados con dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Los resultados muestran estimulación del crecimiento de la raíz de la soya coinoculada con *Bradyrhizobium* al igual que el número total de raíces, su longitud, y la masa seca de la raíz. El desarrollo de pelos radicales aumentó en el frijol donde se hizo la coinoculación, resaltando la leguminosa inoculada con *Azospirillum brasilense*–*Bradyrhizobium japonicum*.

En el 2003 Roldan-Torres *et al.*, analizaron el efecto de la inoculación de *Azospirillum brasiliense*, *Azotobacter chroococcum* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en la germinación, plántula y floración del frijol bajo un diseño experimental de cuatro tratamientos: 1. Frijol inoculado con *Azospirillum*, 2. *Rhizobium* + *Azotobacter*, 3. *Rhizobium* + *Azospirillum*, 4. Frijol testigo sin inocular. Los resultados mostraron un incremento en la germinación de la leguminosa donde se coinoculó con *Azospirillum/Rhizobium*, al igual que en estadios posteriores se estimuló significativamente el número de raíces laterales formadas en comparación con el frijol testigo sin inocular.

Aguirre *et al.*, 2005 con el objetivo de evaluar la respuesta del frijol a la inoculación con *Azospirillum brasiliense* y *Rhizobium etli*. Usaron *P. vulgaris* variedad Pinto Villa y Bayo Madero inoculado -individual y mezclado. La variable respuesta medida fue la biomasa, en condiciones de riego y estrés hídrico. Los resultados mostraron que hubo mayor biomasa aérea y radical en las dos variedades de frijol inoculadas con *Azospirillum* y *Rhizobium* individual o en mezcla, en comparación con la leguminosa testigo sin inocular.

En estas dos últimas investigaciones, los resultados obtenidos, señalan que la coinoculación del frijol con *Rhizobium* y *Azospirillum* es posible, sin embargo, la

información sobre la inoculación a la siembra del frijol y el posterior empleo de FF es escasa.

Con base a lo anterior se establece la conveniencia de la inoculación y/o coinoculación con el empleo de FF para asegurar un crecimiento sano del frijol, preservar la fertilidad del suelo sin ninguna forma de contaminación.

#### **4. HIPÓTESIS**

La respuesta positiva del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33 puede ser mejorada por la composición química de los fertilizantes foliares Fertigrain foliar<sup>MR</sup> y Tecamin max<sup>MR</sup>.

#### **5. OBJETIVO**

Analizar la respuesta del frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y la posterior aplicación de los fertilizantes foliares Fertigrain foliar<sup>MR</sup> y Tecamin max<sup>MR</sup>.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

### 6.1 Variedad del frijol y origen de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33

Se utilizó frijol var. Junio, ambos géneros se aislaron de *Leucena* sp y se identificaron con las claves *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 (Sánchez-Yáñez 2006).

*Azospirillum* Leu 33 se cultivó en el medio Day y Dobereiner (g/L): ácido málico 10, (esterilizado por filtración con una membrana micropore de 2µ) K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 2.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub> 3.0; solución de oligoelementos 1.0; agua destilada; medio pH 6.5–6.7; Agar 18.0 y *Rhizobium* Leu 33 se cultivó en agar extracto de levadura manitol rojo congo (AELMRC) con la formula (g/L): manitol 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub> 0.2; sln Rojo Congo 1:400 10ml; NaCl 0.1; extracto de levadura 10; agua destilada; medio pH = 6.7 – 7; Agar 18. Se incubó a 30°C por 24 h, se realizó una tinción Gram para ver su pureza y viabilidad se observó al microscopio (Sánchez-Yáñez 2006).

### 6.2 Preparación del sistema Jarra de Leonard

El experimento se llevó a cabo en invernadero en un sistema semihidropónico de jarras de Leonard (Figura 1) constituido por una base en la parte inferior que contenía solución mineral y/o agua y otro recipiente en la parte superior donde se colocó 1.5kg de suelo, conectado con algodón para la alimentación por capilaridad del suelo desde la base (Luna y Sánchez-Yáñez, 1991).



**Figura 1 Jarra de Leonard**

Las jarras se identificaron con etiquetas que mostraban: la fecha de inicio, la semilla que se utilizó, la dosis de Ff y TM aplicada, la BPCV que se inoculó, el número de repetición y el nombre del responsable del experimento

### **6.3 Inoculación y siembra de frijol**

Semillas de frijol var. Junio se desinfectaron en Cloro por 10 min, se enjuagaron con agua potable estéril 5 veces, se dejaron en Etanol por 5 min y se lavaron con agua potable estéril 5 veces (Sánchez-Yáñez, 2007).

Por cada 10 semillas de frijol se usó 1.0ml de inóculo de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y se depositaron en una bolsa de 250g. Las semillas se mezclaron vigorosamente durante 20min; el frijol se sembró de acuerdo al diseño experimental mostrado en el cuadro 1, con 4 semillas por jarra, se cubrieron con aluminio en la parte superior y se dejaron en el Solárium para su germinación por 6 días, al emerger las primeras dos hojas se trasladaron al invernadero, ahí se mantuvieron por tres meses (Galindo & Sánchez-Yáñez 1992).

**Cuadro 1. Diseño experimental para analizar la respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posterior aplicación de Fertigrain Foliar (Ff) y Tecamin Max (TM)**

| Cultivo frijol var Junio | <i>Azospirillum</i> | <i>Rhizobium</i> | Agua | Solución |
|--------------------------|---------------------|------------------|------|----------|
| Tratamientos             | Leu 33              | Leu 33           |      | mineral  |
| T1 Control relativo      | -                   | -                | -    | 100 %    |
| T2                       | -                   | +                | -    | 50%      |
| T3                       | +                   | -                | -    | 50%      |
| T4 Relación 1:1          | +                   | +                | -    | 50%      |
| T5 Ff 0.2%               | -                   | +                | -    | -        |
| T6 Ff 0.2%               | +                   | -                | +    | -        |
| T7 TM 0.2%               | -                   | +                | +    | -        |
| T8 TM 0.2%               | -                   | -                | +    | -        |
| T9 Ff 0.2%               | -                   | -                | +    | -        |
| T10 TM 0.2%              | -                   | -                | +    | -        |

**Simbología:** 50%= solución mineral a dosis reducida de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 100%= solución mineral a dosis completa de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; + = con; - = sin; 0.2%= 2ml de FF por litro de agua.

#### 6.4 Nutrición del frijol

El suelo se regó con agua potable donde se realizó la siembra del frijol, la solución mineral (SM) para la nutrición del frijol empleado como control relativo, fue preparada (g/L) como sigue:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  12.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.5;  $\text{MgSO}_4$  1.5;  $\text{CaCl}_2$  0.1;  $\text{FeSO}_4$  1.0ml al 0.5%; pH 6.5-6.8; una solución de oligoelementos (g/L): ácido bórico 2.86;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.22;  $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.81;  $\text{K}_2\text{MnO}_4$  0.09; pH 6.8-7.0 que se agregó en una proporción de 3.0 ml/L (De luna *et al.*, 2006).

La aplicación de los FF se realizó a los 15 días posteriores a la siembra del frijol, a nivel de plántula y floración, cada tercer día, la aspersión se realizó durante las mañanas entre 8 y 9am

La composición química de Ff es (% p/p): aminoácidos totales 10.0; aminoácidos libres 8.0; N total 5.0; materia orgánica total 40.0; Zn soluble en agua 0.75; Mn soluble en agua 0.50; B soluble en agua 0.10; Fe soluble en agua 0.10; Cu soluble en agua 0.10; Mo soluble en agua 0.02; Co soluble en agua 0.01.

La composición química de TM es (% p/p): aminoácidos totales 14.4; aminoácidos libres “L” 12.0; N total 7.0; materia orgánica total 60.0

### **6.5 Antibiograma de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33**

La existencia de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33, en el ciclo vegetativo del frijol es evidencia de que ambos en parte son responsables del efecto positivo en su crecimiento, para ello ambos se activaron en tubos con caldo D y D y ELMRC respectivamente. Se incubaron a 37°C por 24h (Coronado *et al.*, 2006). *Azospirillum* Leu 33 se sembró en agar nutritivo (AN) y *Rhizobium* Leu 33 en ELM con hisopo estéril, se colocó un antibiograma sobre la superficie de cada uno y se incubaron 24h a 37° C. El patrón de sensibilidad de ambos géneros se basó en el método Kirby Baur (Pedrique, 2002).

### **6. 6 Recuperación de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 de la esfermosfera/rizosfera del frijol**

A la siembra de la semilla de frijol en las jarras de Leonard, se efectuó la primera cuenta viable se tomó 1.0g de semilla inoculada con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 diluida en NaCl 0.85% (p/v) para sembrarlas en agar DyD y AELMRC. Las cuentas subsecuentes se efectuaron al sacar con cuidado las raíces del frijol de la jarra de las que se pesó 1.0g, se enjugaron con agua corriente hasta quitar los residuos del suelo, la raíz se desinfecto con hipoclorito de sodio por 5min, se lavaron 5 veces con agua de la llave estéril, luego con Etanol al 90% (v/v) por 3 min y se lavaron 5 veces con agua de la llave estéril, luego la raíz se trituro en mortero estéril con 5.0ml de NaCl 0.85%(p/v) en una solución de detergente comercial 10%(p/v) estéril, del triturado de raíz se tomó 1.0ml y se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  para sembrar 0.1ml en agar DyD para *Azospirillum* y AELMRC para *Rhizobium*. Los conteos se hicieron a los 0, 6, 12, 18 y 24 días posteriores a la siembra y las cajas se mantuvieron en incubación por 48h a 37°C (García-González *et al.*, 2004).

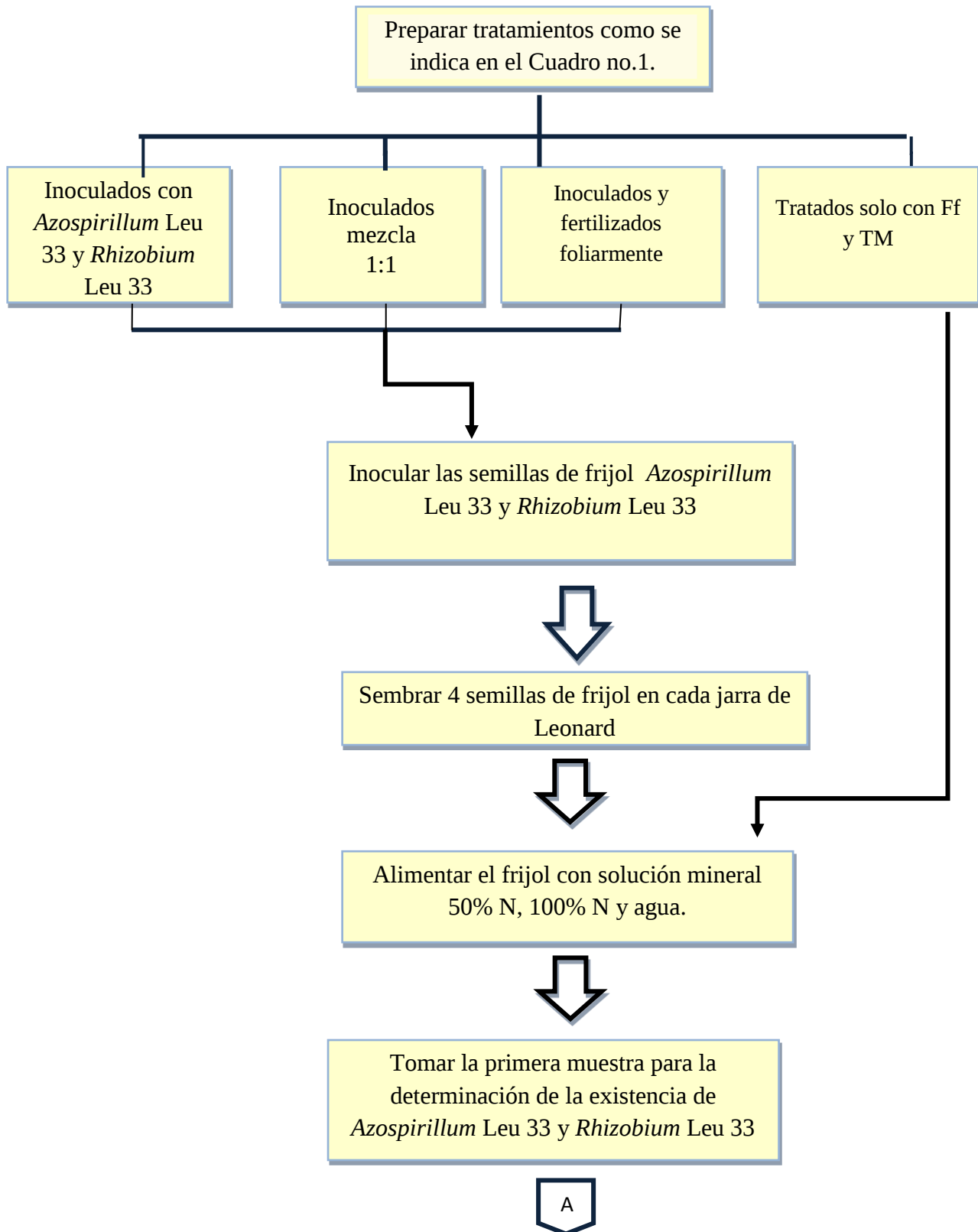
### **6.7 Variables respuesta consideradas para evaluar la respuesta del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posterior aplicación de Ff y TM.**

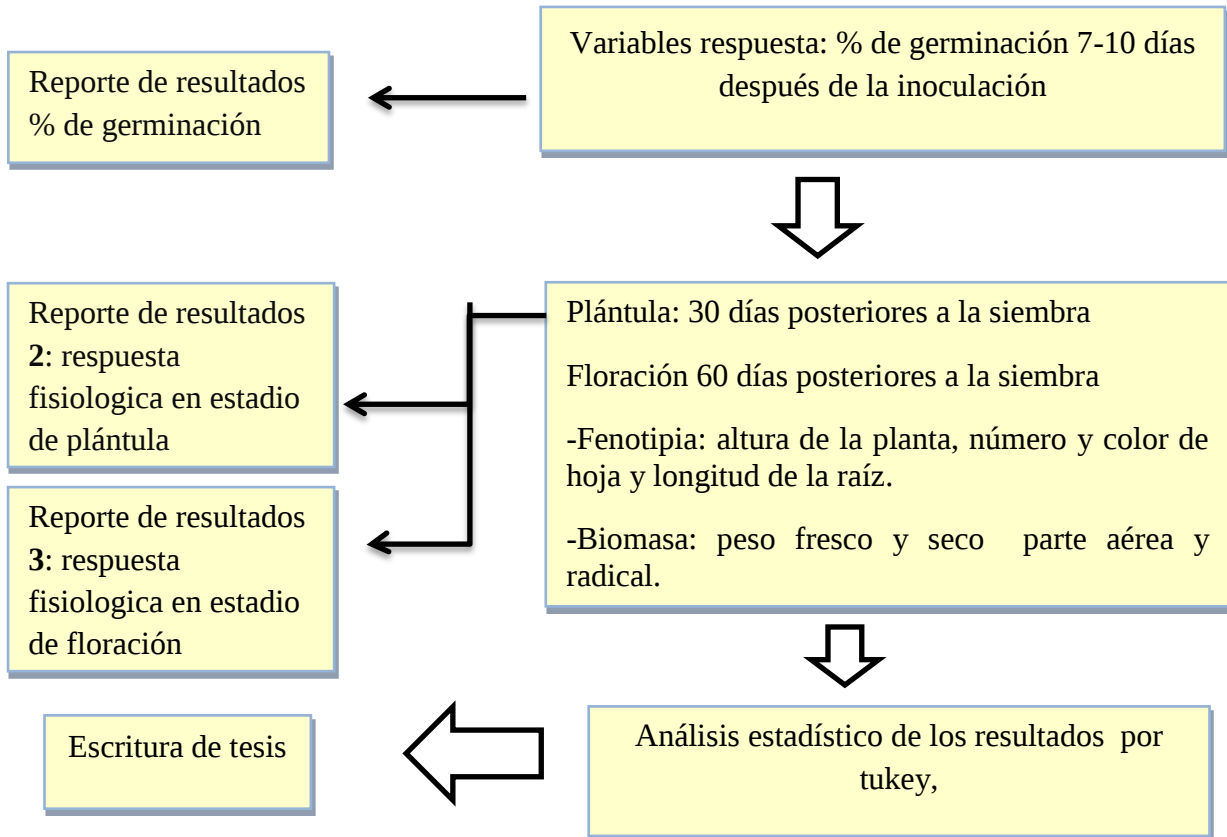
Las variables objeto de estudio fueron: el porcentaje de germinación del frijol, fenotípica: altura de la planta y longitud radical, número y color de las hojas de manera subjetiva y la biomasa: peso fresco y seco de la parte aérea y radical a nivel de plántula y floración (García-González, 2004).

### **6.8 Análisis estadístico de resultados.**

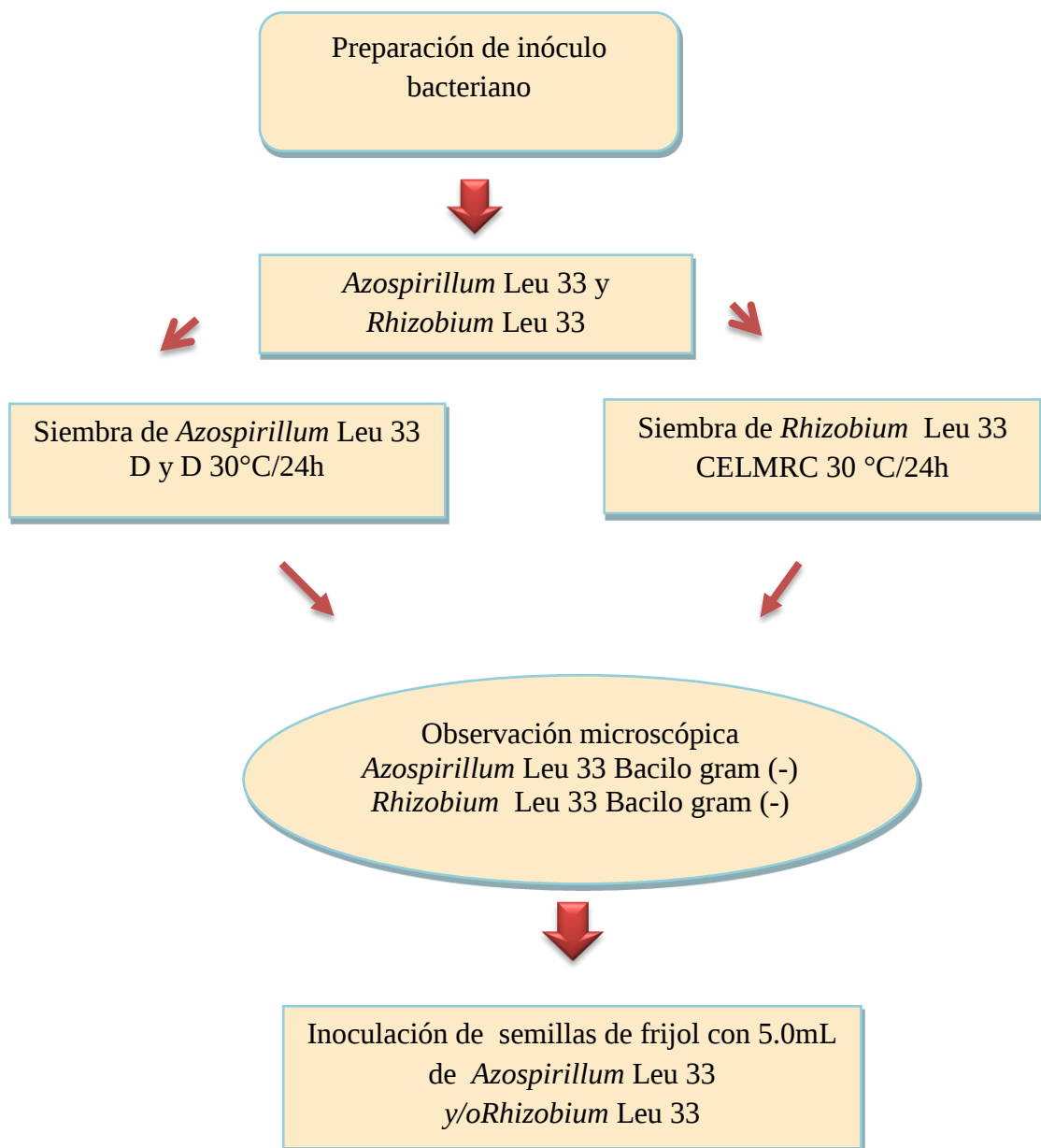
Los datos de la respuesta del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posterior aplicación de Ff y TM se analizaron por el método de Tukey 0.05 (Walpole et al., 2007).

**Figura 2. Respuesta del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posterior aplicación foliar de Fertigrain foliar y Tecamin max.**





**Figura 3. Preparación del inóculo bacteriano con los géneros *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 para las semillas de frijol.**



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7. 1 Reconocimiento de las cepas de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33

Como se observa en el cuadro 2, el patrón de sensibilidad que identifica tanto a *Azospirillum* Leu 33 como *Rhizobium* Leu 33 en el frijol estuvo basado en el método Kirby Baur (Pedrique, 2002), que está en función de si los géneros son Gram positivos/Gram negativos. Cuando estos patrones son estables permiten reconocer la bacteria de forma precisa.

Los resultados muestran la sensibilidad de *Azospirillum* Leu 33 a levofloxacina igual que *Rhizobium* Leu 33. La sensibilidad intermedia para *Azospirillum* Leu 33 fue agentamicina y para *Rhizobium* Leu 33. La resistencia de *Azospirillum* Leu 33 fue a los antibióticos: ampicilina, cefalotina, cefotaxacina, cefuroxima, cefepine, dicloxacilina, eritomicina, penicilina, tetraciclina, y trimetropim-sulfametoxasol. Mientras que *Rhizobium* Leu 33 mostró resistencia a ampicilina, cefalotina, cefuroxima, cefotaxacina, dicloxacilina, eritomicina, penicilina y trimetropim-sulfametoxasol.

Este patrón de sensibilidad (Figura 2.) hizo posible demostrar que *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 estuvieron en la raíz del frijol como se reporta para *Rhizobium* en la literatura, mientras que *Azospirillum* leu 33 invadió tejido en la esferosfera de la leguminosa (Shishido Chanway, 2000; Singet *et al.*, 2003) que no es común pero si se explica su efecto positivo en el crecimiento del frijol.

Los antibióticos son un recurso metodológico para seguir un género en un ambiente natural, con los resultados anteriores, se determinó que la resistencia que mostró *Azospirillum* Leu 33 como *Rhizobium* Leu 33, fue probablemente cromosómica y no plasmídica, debido a la estabilidad de la resistencia a los antibióticos, resultado similar reportado Marquina *et al.*, 2011, donde caracterizaron cepas de *Rhizobium* con un patrón de sensibilidad semejante al obtenido en esta investigación (cuadro 2).

**Cuadro 2. Patrón de sensibilidad utilizado para la identificación de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33.**

| Antibiótico                | Concentración<br>en µg |     | <i>Azospirillum</i>              | <i>Rhizobium</i> Leu 33                     |
|----------------------------|------------------------|-----|----------------------------------|---------------------------------------------|
|                            |                        |     | Leu 33<br>Agar Nutritivo<br>(AN) | Agar Extracto Levadura<br>Manitol<br>(AELM) |
| Ampicilina                 | AM                     | 10  | R                                | R                                           |
| Cefalotina                 | CF                     | 30  | R                                | R                                           |
| Cefotaxima                 | CTX                    | 30  | R                                | R                                           |
| Cefepime                   | FEP                    | 30  | R                                | I                                           |
| Cefuroxima                 | CXM                    | 30  | R                                | R                                           |
| Dicloxacilina              | DC                     | 1   | R                                | R                                           |
| Eritomicina                | E                      | 15  | R                                | R                                           |
| Gentamicina                | GE                     | 10  | I                                | I                                           |
| Levofloxacina              | LEV                    | 5   | S                                | S                                           |
| Penicilina                 | PE                     | 10U | R                                | R                                           |
| Tetraciclina               | TE                     | 30  | R                                | I                                           |
| Trimetropim-sulfametoxasol | TXT                    | 25  | R                                | R                                           |

Resistentes= (R); Intermedias = (I); Sensibles =(S).

## 7.2 Colonización de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 en la espermosfera/rizosfera del frijol

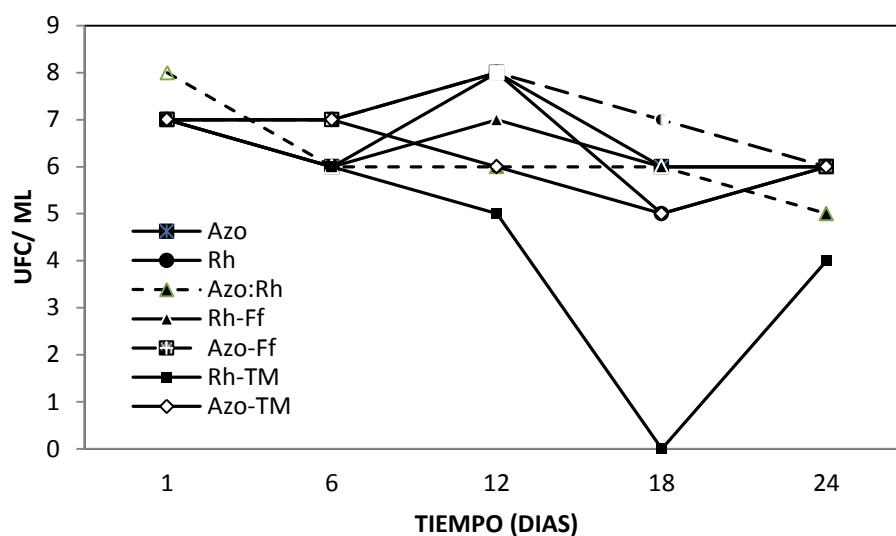
Figura 2. Este resultado muestra la existencia de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 durante la germinación y formación de las raíces del frijol. Se observa que la densidad de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 inicial que se inoculo en la semilla de frijol fue de 6 UFC ml<sup>-1</sup>, que en comparación con lo reportado por García *et al.*, 2005 donde inocularon con 3x10<sup>3</sup> UFC ml<sup>-1</sup> semillas de trigo y se encontró que a mayores concentración de inóculo, la densidad de población microbiana que se adapta en la rizosfera de la planta tiende a disminuir en los primeros 3 a 5 días posteriores a su siembra, lo anterior podría explicar la respuesta de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium*

Leu 33 en los primeros días, donde se observa una disminución de esa población en la semilla de la leguminosa. A partir del séptimo día se inició el periodo de adaptación y posteriormente la fase de crecimiento de ambos géneros en el frijol independientemente de cómo se trató, lo que sugiere que tanto *Azospirillum* Leu 33 como *Rhizobium* Leu 33 utilizaron los exudados de la semilla del frijol al germinar, y luego en la raíz hubo su conversión en fitohormonas lo que acelera la germinación y el rápido crecimiento de la raíz (Roldan *et al.*, 2003).

En la misma figura se muestra que no hubo diferencia en la manera en que cada género colonizo el sistema radical, ya que después del doceavo día, la densidad bacteriana comenzó a disminuir, para finalmente mantenerse estable.

Se observó que en el frijol inoculado con *Rhizobium* Leu 33 y luego tratado con TM en el día 18 su población aparentemente desapareció, pero al día 20 aumentó, la literatura reporta que la colonización de *Rhizobium* en la leguminosa se da en el interior y exterior de la raíz al respecto, lo que probablemente indica que el *Rhizobium* colonizó la rizosfera de la raíz del frijol (Benizriet *al.*, 2001) de la misma manera Wang *et al.*, 2001 explican que los rizobios pueden vivir como endófito en raíces de diferentes especies vegetales, donde ejercen efectos promotores del crecimiento.

**Figura 4. Existencia de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 en semillas y raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) desde la siembra a 30 días posteriores.**



Rh= *Rhizobium*; Azo=*Azospirillum*; Azo:Rh= *Azospirillum*:*Rhizobium*; Rh+Ff=*Rhizobium* y *Fertigrain foliar*; Azo+Ff=*Azospirillum* y *Fertigrain foliar*; Rh+TM=*Rhizobium* y *Tecamin Max*; Azo+TM=*Azospirillum* y *Tecamin Max*. Los datos están expresados en Log de UFC/g de semilla y/o raíz de frijol

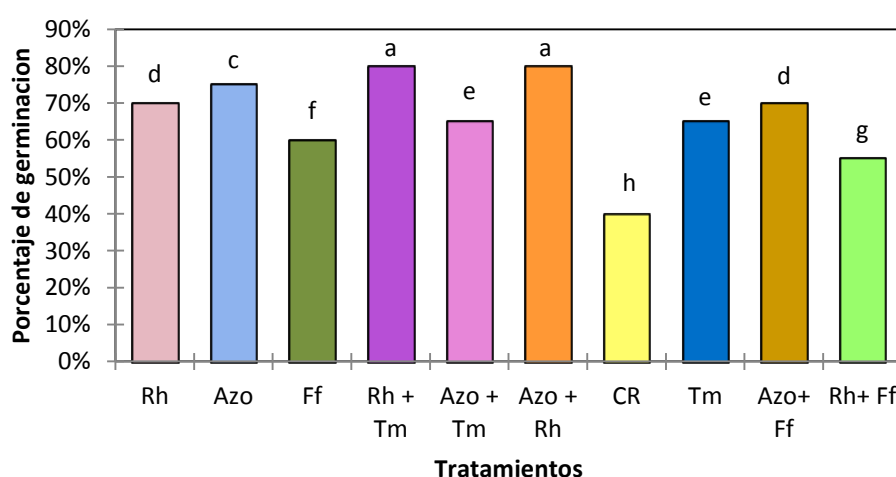
### 7.3 Germinación de la semilla

En la figura 3 se muestra el % de emergencia del frijol coinoculado con *Azospirillum* Leu 33-*Rhizobium* Leu 33 que fue de 80% igual al de la misma inoculada con *Rhizobium* Leu 33 valores estadísticamente superior al 40% del homólogo alimentado solo con solución mineral usado como control relativo, lo que se explica, debido a que las semillas durante su germinación excretan compuestos orgánicos que son transformados en fitohormonas por *Azospirillum* y/o *Rhizobium* y como consecuencia al establecimiento temprano de la asociación microorganismo-planta. (Velázquez *et al.*,1999).

Para el % de germinación únicamente se discute el efecto de la inoculación de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 en la semilla, ya que la influencia de los FF se evalúa en los estadios posteriores que fue en los cuales se aplicó.

Es por ello que en el frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33 con un 75% y *Rhizobium* Leu 33 con 70%, estadísticamente fueron superiores al % de emergencia de las semillas sin inocular, y que posteriormente se les aplicaría el FF, resultado que podría explicarse como menciona Okon y Vanderleyden 1997, donde mencionan que entre las acciones principales que ejercen las BPCV destacan el mejoramiento de la germinación.

**Figura 5. Porcentaje de germinación del frijol (*Phaseolus vulgaris* L), inoculado con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33.**



CR=Control relativo; Rh=*Rhizobium*; Azo=*Azospirillum*; Azo:Rh 1:1=*Azospirillum*:*Rhizobium* 1:1 ; Rh +Ff=*Rhizobium* +*Fertigrain foliar*; Azo+Ff, =*Azospirillum**Fertigrain Foliar*; Ff=*Fertigrain foliares*. Letras distintas con diferencia estadística significativa al 0.05 por Tukey.

#### 7.4 Estadío fisiológico de plántula

Cuadro 3. En general el frijol inoculado/coinoculado a nivel de plántula respondió positivamente a la aplicación del FF, debido a que el frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33-Ff que alcanzó un valor de longitud radical (LR) de 30.5cm y una altura de la planta (AP) de 35.2cm, estadísticamente diferente y superior al frijol usado como CR con una AP de 13.1cm y un LR de 19.5cm.

Estos resultados son explicables como lo reporta Herrera, 1998 que menciona que la aplicación de FF incrementa la fenotipía de la planta como la altura, el número y color de las hojas al igual que su dimensión y la longitud de la raíz. En el mismo cuadro se observa que el frijol coinoculado con *Azospirillum* Leu 33-*Rhizobium* Leu 33 alcanzo una LR de 18.075cm estadísticamente igual a la leguminosa inoculada con *Azospirillum* Leu 33-Ff con un LR de 18.2cm, el mismo frijol inoculado con *Rhizobium* alcanzo una LR de 24.0cm y la leguminosa inoculada con *Rhizobium* Leu 33-Ff una LR de 23.2cm, estadísticamente no diferentes. Lo que prueba que la inoculación a la siembra de la semilla con *Azospirillum* Leu 33 y /o *Rhizobium* Leu 33 y posteriormente la aplicación de FF mejora el crecimiento de la planta, como lo mostraron los resultados obtenidos.

**Cuadro 3. Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en su fenotipia; altura de la planta y longitud radical a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posterior aplicación de Fertigrain Foliar y Tecamin max.**

| TRATAMIENTO                             | ALTURA DE LA PLANTA<br>(cm) | LONGITUD RADICAL<br>(cm) |
|-----------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Control relativo                        | 13,10 <sup>f</sup>          | 19,50 <sup>f</sup>       |
| <i>Rhizobium</i>                        | 24,25 <sup>d</sup>          | 24,07 <sup>d</sup>       |
| <i>Azospirillum</i>                     | 29,96 <sup>b</sup>          | 17,96 <sup>h</sup>       |
| <i>Azospirillum-Rhizobium</i>           | 1,83 <sup>g</sup>           | 18,07 <sup>g</sup>       |
| <i>Rhizobium</i> + Fertigrain foliar    | 18,70 <sup>e</sup>          | 23,23 <sup>d</sup>       |
| <i>Azospirillum</i> + Fertigrain foliar | 25,17 <sup>d</sup>          | 18,25 <sup>g</sup>       |
| <i>Rhizobium</i> + Tecamin max          | 23,77 <sup>d</sup>          | 26,17 <sup>c</sup>       |
| <i>Azospirillum</i> + Tecamin max       | 35,25 <sup>a</sup>          | 30,50 <sup>a</sup>       |
| Fertigrain foliar                       | 26,82 <sup>c</sup>          | 20,12 <sup>e</sup>       |
| Tecamin max                             | 23,75 <sup>d</sup>          | 26,6 <sup>b</sup>        |

Valores con letras distintas con diferencia significativa por Tukey 0.05

El cuadro 4. Mostró que el frijol inoculado con *Azospirillum* Leu 33-TM alcanzo un PST de 1.1g valor estadísticamente superior a la leguminosa alimentada con solución mineral usada como CR de 1.0g, lo que sugiere que esta bacteria estimulo por fitohormonas el crecimiento de la raíz del frijol y mejoro la fisiología de su parte aérea (Figura 3). El frijol inoculado con *Rhizobium* Leu 33 mostro un PST de 0.9g, y la leguminosa inoculada con *Rhizobium* Leu 33-TM un PST de 0.85g, se reporta que el efecto positivo de *Rhizobium* Leu 33 en la leguminosa, se inhibe con ciertas dosis del FN aplicado al suelo; en esta investigación este hecho no fue problema, pues, el frijol se inoculo a la siembra de la semilla y posteriormente se le alimento con el FF en sus hojas, en consecuencia el pobre nivel de Nitrógeno en el suelo de este experimento no cambio, lo que facilito la acción benéfica de *Rhizobium* Leu 33 en el frijol.

**Cuadro 4. Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en su biomasa a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 y posteriormente tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max” a nivel de plántula.**

| TRATAMIENTO                            | PESO FRESCO        | PESO SECO TOTAL   |
|----------------------------------------|--------------------|-------------------|
|                                        | TOTAL (g)          | (g)               |
| Control relativo                       | 9,90 <sup>c</sup>  | 1,02 <sup>b</sup> |
| <i>Rhizobium</i>                       | 10,25 <sup>b</sup> | 0,92 <sup>c</sup> |
| <i>Azospirillum</i>                    | 7,43 <sup>f</sup>  | 0,80 <sup>e</sup> |
| <i>Azospirillum: Rhizobium</i>         | 7,15 <sup>g</sup>  | 0,83 <sup>d</sup> |
| <i>Rhizobium</i> +Fertigrain foliar    | 8,20 <sup>e</sup>  | 0,52 <sup>h</sup> |
| <i>Azospirillum</i> +Fertigrain foliar | 5,60 <sup>i</sup>  | 0,57 <sup>f</sup> |
| <i>Rhizobium</i> +Tecamin max          | 5,82 <sup>h</sup>  | 0,85 <sup>d</sup> |
| <i>Azospirillum</i> +Tecamin max       | 11,37 <sup>a</sup> | 1,15 <sup>a</sup> |
| Fertigrain foliar                      | 5,22 <sup>j</sup>  | 0,54 <sup>g</sup> |
| Tecamin max                            | 9,15 <sup>d</sup>  | 0,08 <sup>i</sup> |

Valores con letras distintas con diferencia estadística significativa. Tukey 0.05

Respecto al frijol coinoculado con *Azospirillum* Leu 33 *Rhizobium* Leu 33, alcanzó un PST de 0.83g valor estadísticamente inferior al registrado en el frijol usado CR, lo anterior sugiere que no se efectuó una acción sinérgica de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 sobre el frijol, y además porque probablemente existió competencia entre ambas cepas. Mientras que el frijol solo tratado con el Ff y TM mostraron un PST inferior y estadísticamente diferente al registrado cuando esta leguminosa se inoculo solo con *Azospirillum* Leu 33, con *Rhizobium* Leu 33 o con la combinación de ambas y luego se trató con el FF, lo cual sugiere que la acción bacteriana en la raíz mejora la efectividad del fertilizante aplicado al follaje.

## 7.5 Estadio fisiológico de floración

El cuadro 6 mostró que la leguminosa inoculada solo con *Rhizobium* Leu 33 alcanzó un PST de 2.3g igual a lo observado en la semilla de frijol tratada con *Rhizobium* y posteriormente con Ff un PST de 2.34g, efecto llevado a cabo por las fitohormonas las

cuales estimularon el crecimiento de la raíz del frijol y mejoro la fisiología de su parte aérea (figura 5).

**Cuadro 5. Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L), en su fenotipia; altura de la planta y longitud radical, a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max a nivel de floración.**

| TRATAMIENTO                            | ALTURA DE<br>LA PLANTA<br>(cm) | LONGITUD<br>RADICAL<br>(cm) |
|----------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Control relativo                       | 29,16 <sup>j</sup>             | 18,33 <sup>h</sup>          |
| <i>Rhizobium</i>                       | 68,50 <sup>e</sup>             | 18,33 <sup>h</sup>          |
| <i>Azospirillum</i>                    | 60,50 <sup>f</sup>             | 15,0 <sup>j</sup>           |
| <i>Azospirillum:Rhizobium</i>          | 88,00 <sup>b</sup>             | 19,03 <sup>g</sup>          |
| <i>Rhizobium</i> +Fertigrain foliar    | 131,12 <sup>a</sup>            | 27,50 <sup>c</sup>          |
| <i>Azospirillum</i> +Fertigrain foliar | 42,12 <sup>h</sup>             | 37,12 <sup>a</sup>          |
| <i>Rhizobium</i> +Tecamin max          | 34,83 <sup>i</sup>             | 22,63 <sup>f</sup>          |
| <i>Azospirillum</i> +Tecamin max       | 54,66 <sup>g</sup>             | 25,50 <sup>d</sup>          |
| Fertigrain foliar                      | 74,62 <sup>d</sup>             | 23,22 <sup>e</sup>          |
| Tecamin max                            | 79,25 <sup>c</sup>             | 34,12 <sup>b</sup>          |

Valores con letras distintas con diferencia estadística significativa.Tukey 0.05

Respecto al frijol coinoculado con *Azospirillum* Leu 33-*Rhizobium* Leu 33, alcanzó un PST de 2.2g valor estadísticamente superior al registrado en el frijol usado como CR, lo anterior sugiere una acción sinérgica de *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 sobre esta leguminosa ya que es probable que transformaron los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Santillana *et al.*, 2005). Mientras que el frijol solo tratado con Ff mostró un PST inferior y estadísticamente diferente al registrado cuando esta leguminosa se inoculo solo con *Azospirillum* Leu 33, únicamente con *Rhizobium* Leu 33 o con la combinación de ambas y luego se trató con Ff, de la misma manera que se registró a nivel de plántula. Con los resultados anteriores, se pronostica un buen rendimiento en el estadio de madurez fisiológica en el frijol que se inoculo a la siembra con las BPCV y posteriormente se aplicaron los FF,

debido a que son una alternativa para incrementar el rendimiento del cultivo del frijol mediante la aportación y rápida asimilación de nutrientes durante su crecimiento (Zepeda *et al.*, 2002).

**Cuadro 6. Respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en su biomasa, a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y *Rhizobium* Leu 33 tratado con Fertigrain Foliar y Tecamin Max” a nivel de floración.**

| TRATAMIENTO                            | PESO FRESCO        | PESO SECO         |
|----------------------------------------|--------------------|-------------------|
|                                        | TOTAL<br>(g)       | TOTAL<br>(g)      |
| Control relativo                       | 13,13 <sup>h</sup> | 1,64 <sup>d</sup> |
| <i>Rhizobium</i>                       | 20,90 <sup>b</sup> | 2,36 <sup>b</sup> |
| <i>Azospirillum</i>                    | 14,23 <sup>g</sup> | 1,63 <sup>d</sup> |
| <i>Azospirillum:Rhizobium</i>          | 16,10 <sup>e</sup> | 2,21 <sup>c</sup> |
| <i>Rhizobium</i> +Fertigrain foliar    | 18,40 <sup>c</sup> | 2,34 <sup>b</sup> |
| <i>Azospirillum</i> +Fertigrain foliar | 22,22 <sup>a</sup> | 2,96 <sup>a</sup> |
| <i>Rhizobium</i> +Tecamin max          | 14,63 <sup>f</sup> | 1,61 <sup>d</sup> |
| <i>Azospirillum</i> +Tecamin max       | 10,13 <sup>k</sup> | 1,45 <sup>f</sup> |
| Fertigrain foliar                      | 11,50 <sup>j</sup> | 1,39 <sup>g</sup> |
| Tecamin max                            | 12,62 <sup>i</sup> | 1,51 <sup>e</sup> |

Valores con letras distintas con diferencia estadística significativa.Tukey 0.05.

## 8. CONCLUSIÓN

La respuesta positiva del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33 y ulterior uso de fertilizante foliar fue clave para su sano crecimiento a dosis regulada de fertilizante nitrogenado.

Se pudo comprobar que la respuesta positiva del frijol, se debió a la inoculación tanto con *Azospirillum* como *Rhizobium* resultados que se expresaron en la fenotipia y biomasa en los estadios de plántula y floración de la leguminosa.

La supervivencia de *Azospirillum* como *Rhizobium* en la espermosfera/rizosfera se evaluó en la curva de colonización, y al comprobarse su existencia en el frijol, el efecto positivo que se reflejó en su biomasa se mejoró con la ulterior aplicación de los fertilizantes foliares.

Por tanto la combinación inoculación y fertilizante foliar en el frijol es una forma mejorar la absorción del fertilizante nitrogenado y conservar la productividad del suelo.

## 9. VALIDACION DE HIPOTESIS

“La respuesta positiva del frijol a la inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33 puede ser mejorada por la composición química de los fertilizantes foliares Fertigrain foliar<sup>MR</sup> y Tecamin max<sup>MR</sup>.”

La hipótesis de esta investigación es válida, en base a los resultados obtenidos, se demostró que la composición química de un FF, mejoró la respuesta del frijol, previa inoculación con *Azospirillum* Leu 33 y/o *Rhizobium* Leu 33, respuesta expresada en fenotipia y biomasa en estadios de plántula y floración del frijol.

## 10. LITERATURA CITADA

Acuña O., Rodríguez E., Llano A., Calderon R., Flores G., Viana A., Lepiz R. (2001) “validación de inoculantes para frijol con cepas de *Rhizobium* eficientes en fijación de nitrógeno en Centroamérica” *Agronomía mesoamericana* 12:25-32.

Aguirre Medina J.F., Irizar Garza M.B., Grajeda Cabrera O.A., Peña del Río M.A., Loredó Osti C., Gutiérrez Baeza A. (2009) Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Folleto Técnico Num 5:19.

Bashan Y, Holguin G, Ferrera-Cerrato R, (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrizicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. *Terra* 14:1-17 <http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/beneficaliii.pdf>

Borowski E, Sławomir M., (2011).,The effect of foliar fertilization of french bean with iron salts and urea on some physiological processes in plants relative to iron uptake and translocation in leaves.*HortorumCultus* 10:183-193

Coronado R.E., Peña J.J., Sanchez-Yañez, J.M, 2006. Colonización de las raíces de frijol (*Phaseolusvulgaris L*) por *Rhizobiumetli*. <http://www.monografias.com>

Dardanelli, M., Rodríguez, D., Megías, M., Okon, Y. (2008). Influencia de la coinoculación*Azospirillum*-rizobios sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno de leguminosas de interés agronómico. In: Cassán, F., GarcíaSalamone, I. (Eds.),66*Azospirillum* sp.: Cell Physiology, *Plant Interactions and Agronomic Research* in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, pp. 141–151.

De Luna E.G., Peña C, J.J., Sánchez-Yañez, J.M. 2006. Selección de aislados nativos de *Rhizobiumetli* resistentes a Diazinon. <http://www.monografias.com>

García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriaes, J.J., Sánchez-Yáñez, J.M. (2005)., Inoculación del *trigo var. Pavón* con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. TERRA, 23: 65-72

Graterol Y, González R, Avila J, De La Cruz R, López A, Velásquez L, Almeida N, Pieruzzini N, 2006, “Abono foliar en variedades de frijol y épocas de aplicación del glifosato en siembra directa del frijol ‘Pico negro’ en el estado Portuguesa”. Agronomía de la producción. pp30-33

[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/inia\\_divulga/numero%209/09graterol\\_y.pdf](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/inia_divulga/numero%209/09graterol_y.pdf)

Lindström, K., Martínez-Romero, E. (2007). International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meeting. Int J of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 1365-1366.

López E, Becerra E, Duran A, Cano Octavio, Fraire G, Esqueda V, Ortega D. 1998 Logros obtenidos en la investigación sobre el cultivo de frijol del proyecto CONACYT-TIIP-frijol en el Sureste de México. Agronomía Mesoamericana 9:131.138.

Marquina E., González N.E & Castro Y., (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Biol. Trop. 59: 1017-1036.

Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v59n3/a05v59n3.pdf>

Mejía Y, Álvarez Arroyo M., Luna Bello G., 2011, Efectividad de un biofertilizante foliar sobre el cultivo de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), ciencia e interculturalidad, 8:1-13

Muñoz R. (2010). Frijol rica fuente de proteínas. CONABIO. Biodiversitas, 89:7-11

Disponible en:

<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv89art2.pdf>

Rengel, M. L. (2004). Crecimiento y dinámica de acumulación de nutrientes en maíz (*Zea mays L.*) en Venezuela. Instituto de la Potasa y el Fósforo. Informaciones Agronómicas 53: 5 – 8.

Sanchez-Yañez (2005); *Rhizobiumetli*, una bacteria benéfica de frijol (*Phaseolusvulgaris L.*); Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos35/rhizobium-etli-frijol/rhizobium-etli-frijol.shtml>

Sánchez-Yañez J.M., (2007). Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. UMSNH, UDEM, pp. 155. ISBN: 978-970-95424-1-7.

Torres R, Pérez C, Suárez N. (2003).Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frijol común (*PhaseolusvulgarisL.*). Centro Agrícola. 30:56-60

Trinidad Santos A, Aguilar Manjarrez D, Junio 2000 “Fertilización foliar, un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos” Área de fertilidad de suelos. IRENAT.

Vázquez E y Torres S. (1995). Fisiología vegetal. Ed. Pueblo y educación; pp.275-445.

Villar, J., Viñals, Mabel., Álvarez, Xiomara., Dorta, M. (2005) Tecnología de producción de inoculantes de *Azospirillum* y factibilidad económica de su aplicación agrícola en cultivos seleccionados. Cultivos tropicales. 26:23-26

Walpole E.R., Myers R., Myers LS., (2007). Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias. Ed. Pearson, 8ª, ISBN: 13:978-970-26-0936-0

Zepeda R, Carballo A, Alcántar G, Hernández A and Hernández J.A, 2002. Effect of foliar fertilization on yield and seed quality of cornsingle crosses.Fitotec.Mex. 25: 419 – 426.