



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 26 del mes de Julio del año 2011, el (la) que suscribe Hugo Rubili Roblero Ramírez alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091713, adscrito a CIIDIR-SINALOA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Doctor Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez y cede los derechos del trabajo intitulado "Comparación de la Fertilización Sintética con Orgánica en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Condiciones de Fertirriego", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección douglas\_coby@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Hugo Rubili Roblero Ramírez

Nombre y Firma



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Guasave, Sin. a 10 de Diciembre del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR – SIN. en su sesión ORDINARIA No. 12 celebrada el día 10 del mes de DICIEMBRE conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

ROBLERO

Apellido paterno

RAMIREZ

Apellido materno

HUGO RUBILI

Nombre (s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 9 | 1 | 7 | 1 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN SINTÉTICA CON ORGÁNICA EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN CONDICIONES DE FERTIRRIEGO

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Evaluación de cepas de *Rhizobium* spp, *Bacillus* spp y formas de nitrógeno (NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en invernadero y en campo en condiciones de fertirriego.

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:  
Dr. ADOLFO DAGOBERTO ARMENTA BOJORQUEZ

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
LAS INSTALACIONES DEL CIIDIR-SINALOA

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios. SIP20090981 (16,270.73) y  
Convenios Monsanto 2009 (75,000.00)

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dr. A. DAGOBERTO ARMENTA BOJORQUEZ



El Aspirante

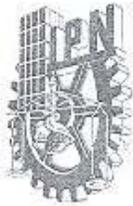
ING. HUGO RUBILI ROBLERO RAMIREZ

El Presidente del Colegio

Dr. JESUS MENDEZ LOZANO



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCIÓN



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 14:00 horas del día 26 del mes de Julio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA

para examinar la tesis titulada:  
COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN SINTÉTICA CON ORGÁNICA EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN CONDICIONES DE FERTIRRIEGO.

Presentada por el alumno:

ROBLERO  
Apellido paterno

RAMÍREZ  
Apellido materno

HUGO RUBILÍ  
Nombre(s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 9 | 1 | 7 | 1 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

MAESTRÍA EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez

Dr. Cipriano García Gutiérrez

M. en C. Jesús Ricardo Camacho Báez

Dr. Manuel Mundo Ocampo

Dr. Wenceslao Valenzuela Quiñonez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Jorge Montiel Montoya



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL**  
**DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

**“COMPARACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN  
SINTÉTICA CON ORGÁNICA EN FRIJOL  
(*Phaseolus vulgaris* L.) EN CONDICIONES DE  
FERTIRRIEGO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN  
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

**PRESENTA**

**HUGO RUBILI ROBLERO RAMÍREZ**

**Guasave, Sinaloa; México Agosto de 2011**

## **DEDICATORIA**

A mis padres: Hosbaldo Roblero Calderón y Octaví Ramírez Morales por ser los seres más maravillosos del mundo, por preocuparse por mi superación profesional y por el gran apoyo que siempre me han brindado.

A mis hermanos: Lucy Narvy, Rosario y Carlos, gracias por todo.

A mis sobrinos: Osvaldo, Víctor Ernesto, Lorna Paulina y Martín; son seres que quiero mucho.

A mi cuñado Manuel Sánchez por ser un gran amigo.

A mis tíos, primos y a todas las personas de las Delicias, Siltepec Chiapas que han creído en mi y que me han apoyado moralmente.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez**, Director de tesis, por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación de Nutrición Vegetal. Gracias por su paciencia y su gran contribución en la realización de éste proyecto; por sus sabios consejos y por compartir conocimientos e ideas.

A mis tutores **Dr. Cipriano García Gutiérrez**, **Dr. Manuel Mundo Ocampo**, **M. en C. Jesús Ricardo Camacho Báez** y **Dr. Wenceslao Valenzuela Quiñonez** por su gran aportación profesional en la realización de éste trabajo, por sus sugerencias y por los conocimientos compartidos.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, por la oportunidad que me brindó de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero durante la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, especialmente a los integrantes del departamento C. del suelo, por haber creído en mí y por el apoyo brindado.

A Julián Galavíz por su amistad y apoyo en el Laboratorio de Nutrición Vegetal, el cual fue básico para cumplir con los objetivos de éste proyecto.

A mis compañeros de generación Omar, Gerardo, Manuel, Guillermo, Abram, Carlos Miguel, Martin Alonso, Luky, Nancy, Nadia, Alejandra, Raquel, Olimpia y a todos los que no nombre; fue un gran gusto conocerlos y haber convivido con todos.

A Juan Alexi, Wiliam Escalante y Jony Torres por la amistad y convivencia.

A todos mis amigos, es muy larga la lista para nombrarlos, pero les agradezco la amistad que me han brindado.

A los administrativos del CIIDIR-Sinaloa, especialmente a Dorín, Don Roberto Urias y Celestino por su apoyo brindado durante mi estancia en éste centro de investigación.

*Hugo Rubili Roblero Ramírez*

## ÍNDICE GENERAL

|  | PAGINA |
|--|--------|
| <b>GLOSARIO</b> .....  | i      |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....   | iv     |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....   | v      |
| <b>ÍNDICE DE CUADROS EN LOS ANEXOS</b> .....   | vii    |
| <b>RESUMEN</b> .....   | viii   |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | ix     |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1      |
| <b>II. ANTECEDENTES</b> .....  | 3      |
| 2.1 Generalidades del cultivo de frijol .....  | 3      |
| 2.1.1 Importancia del cultivo .....  | 3      |
| 2.1.2 Cultivo de frijol en México .....  | 3      |
| 2.1.3 Riegos.....  | 4      |
| 2.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....  | 5      |
| 2.3 Fijación biológica de nitrógeno.....   | 6      |
| 2.4 Bacterias del género <i>Rhizobium</i> .....  | 7      |
| 2.4.1 Clasificación de especies de <i>Rhizobium</i> .....                                    | 8      |
| 2.4.2 Importancia de la selección de cepas de <i>Rhizobium</i> .....                         | 11     |
| 2.5 Bacterias del género <i>Bacillus</i> .....   | 12     |
| 2.5.1 Bacterias del género <i>Bacillus</i> como promotoras de crecimiento .....              | 13     |
| 2.6 Sinergismo de <i>Rhizobium</i> y <i>Bacillus</i> en la fijación biológica de nitrógeno.. | 14     |
| 2.7 Formas disponibles de nitrógeno para las plantas.....                                    | 15     |
| 2.7.1 Nitratos.....  | 16     |
| 2.7.2 Amonio.....  | 17     |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 2.8 Efecto de la fertilización nitrogenada en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -<br>leguminosas..... | 18        |
| 2.9 Fertirriego.....  | 19        |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>IV. OBJETIVOS.....</b>   | <b>22</b> |
| 4.1 Objetivo general.....   | 22        |
| 4.2 Objetivos específicos.....  | 22        |
| <b>V. HIPÓTESIS.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>23</b> |
| 6.1 Muestreo y aislamiento de <i>Rhizobium</i> .....  | 23        |
| 6.2 Selección de cepas nativas de <i>Rhizobium</i> en invernadero.....                            | 23        |
| 6.3 Selección de aislamientos nativos de <i>Bacillus</i> spp en invernadero.....                  | 25        |
| 6.4 Trabajo de campo.....   | 26        |
| 6.4.1 Área de estudio.....  | 26        |
| 6.5 Siembra.....  | 27        |
| 6.6 Diseño experimental.....  | 28        |
| 6.7 Aplicación de los tratamientos.....   | 29        |
| 6.7.1 Fertilizantes químicos sintéticos.....  | 29        |
| 6.7.2 Preparación y aplicación de <i>Rhizobium</i> .....  | 29        |
| 6.7.3 Preparación y aplicación de <i>Bacillus</i> spp.....  | 30        |
| 6.8 Variables evaluadas.....  | 30        |
| 6.8.1 Análisis foliar de nutrimentos.....   | 30        |
| 6.8.1.1 Nitrógeno total.....  | 31        |
| 6.8.1.1.1 Digestión húmeda de la muestra.....   | 31        |
| 6.8.1.1.2 Determinación de nitrógeno total.....   | 31        |
| 6.8.1.2 Fósforo.....  | 32        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.8.1.2.1 Digestión húmeda de la muestra.....   | 32        |
| 6.8.1.2.2 Determinación de fósforo.....   | 32        |
| 6.8.1.3 Potasio.....  | 33        |
| 6.8.1.3.1 Determinación de potasio.....   | 33        |
| 6.8.1.4 Calcio y magnesio.....  | 34        |
| 6.8.1.4.1 Determinación de calcio y magnesio.....                                     | 34        |
| 6.8.1.5 Hierro, manganeso, zinc y cobre.....  | 34        |
| 6.8.1.5.1 Determinación de hierro, manganeso, zinc y cobre.....                       | 34        |
| 6.8.2.1 Peso seco de follaje.....   | 35        |
| 6.8.2.2 Número de nódulos por planta.....   | 35        |
| 6.8.2.3 Peso seco de nódulos.....   | 36        |
| 6.8.2.4 Rendimiento de grano.....   | 36        |
| <b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>38</b> |
| 7.1 Muestreo y aislamiento de <i>Rhizobium</i> .....                                  | 38        |
| 7.2 Etapa de invernadero.....   | 38        |
| 7.2.1 Selección de cepas nativas de <i>Rhizobium</i> en invernadero.....              | 38        |
| 7.2.1.1 Altura de planta y peso seco de follaje.....                                  | 38        |
| 7.2.1.2 Volumen de raíces, número de nódulos por plata y peso<br>seco de nódulos..... | 40        |
| 7.2.2 Selección de aislamientos nativos de <i>Bacillus</i> spp. en invernadero.....   | 42        |
| 7.2.2.1 Altura de planta y peso seco de follaje.....                                  | 42        |
| 7.2.2.2 Volumen de raíces y diámetro de tallo.....                                    | 43        |
| 7.3 Trabajo de campo.....   | 45        |
| 7.3.1 Propiedades físicas y químicas del suelo.....                                   | 45        |
| 7.3.2 Análisis foliar de nutrimentos.....   | 46        |
| 7.3.2.1 Concentración de nitrógeno total.....   | 46        |

---

|  |    |
|--|----|
| 7.3.2.2 Fósforo.....   | 47 |
| 7.3.2.3 Potasio.....   | 48 |
| 7.3.2.4 Calcio, magnesio y microelementos (Hierro, Zinc, Manganeso y Cobre)..... | 49 |
| 7.3.3.1 Peso seco de follaje.....  | 50 |
| 7.3.3.2 Número de nódulos por planta y peso seco de nódulos.....                 | 51 |
| 7.3.3.3 Rendimiento de grano.....  | 53 |
| VIII. <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 55 |
| IX. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | 56 |
| X. <b>ANEXOS</b> .....   | 78 |

## GLOSARIO

**Amonio.** Cation que se encuentra adherido a las partículas del suelo y es fuente de fertilizantes nitrogenados.

**Bacillus.** Bacterias Gram positivas que se encuentran en el suelo y agua, y presentan capacidad de formar endosporas ante condiciones ambientales desfavorables.

**Cepa.** Conjunto de microorganismos de la misma especie descendientes de una única célula, que comparten características genéticas y fenotípicas entre ellas.

**Fertirriego.** Actividad que consiste en aplicar fertilizantes (químicos u orgánicos) disueltos en el agua, generalmente a través de un sistema de riego presurizado, el cual consta de tuberías de PVC y cintillas de riego con emisores (goteros) colocados a diferentes distancias.

**Fertilización sintética.** Actividad que consiste en utilizar materiales o sustancias químicas inorgánicas con el propósito de satisfacer las demandas nutrimentales de las plantas.

**Fertilización orgánica.** Actividad que consiste en utilizar materiales orgánicos muertos (vegetal o animal) y/o vivos (microorganismos) con capacidad de sintetizar elementos nutrimentales para las plantas.

**Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN).** Asociación de dos organismos (bacteria-planta) en la cual el nitrógeno ( $N_2$ ) es tomado del aire presente en el suelo y cambiado a formas utilizables por las plantas.

**Fijación biológica de nitrógeno (FBN).** Capacidad que posee un grupo especializado de microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa de convertir el  $N_2$  en amonio ( $NH_4$ ), incluye a la fijación simbiótica de nitrógeno.

**Inoculación.** Microorganismos aplicados a la semilla o colocados cerca del sistema radical de las plantas para su infección.

**Leguminosa.** Familia de plantas que se caracterizan en dar su fruto o semilla en el interior de una vaina, comúnmente son conocidas como legumbres.

**Leghemoglobina.** Proteína de alta afinidad con el oxígeno y se encuentra dentro de los nódulos simbióticos.

**Nodulación.** Formación de nódulos en raíces de plantas leguminosas.

**Nódulos.** Estructuras ampliamente especializadas formadas en las raíces de las plantas leguminosas en donde vive una colonia de bacterias del género *Rhizobium* y se da la FSN.

**Nitrogenasa.** Enzima responsable de la fijación de nitrógeno, cataliza la conversión de  $N_2$  a formas reducidas (amonio) las cuales son utilizadas para el crecimiento y desarrollo de organismos superiores.

**Nitratos.** Anión que se mantiene libre en la solución del suelo y es fuente de fertilizantes nitrogenados.

**Nitrógeno atmosférico.** Composición de dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace, muy difícil de separar; el  $N_2$  es una fase del ciclo del nitrógeno en la naturaleza, en la cual éste elemento forma parte del aire.

***Rhizobium.*** Bacterias bacilares que miden de 0.5 a 3 micrómetros; son portadoras de la enzima nitrogenasa y tienen la capacidad de asociarse con plantas de la familia de las leguminosas para convertir el  $N_2$  en amoníaco ( $NH_3$ ).

**Rizosfera.** Zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas, el suelo y microorganismos. Ésta región especializada, está caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad.

**Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.** Bacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal, mediante diversos mecanismos.

**Simbiosis.** Proceso asociativo entre dos organismos en el cual cada uno obtiene ventajas para su desarrollo.

**Sideróforos.** Compuestos que son sintetizados por algunas bacterias muy particulares y que actúan como quelatantes de hierro.

## ÍNDICE DE CUADROS

|  | PAGINA |
|--|--------|
| <b>Cuadro 1.</b> Descripción de tratamientos aplicados al cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) (variedad azufrado higuera) en el experimento de campo.....  | 28     |
| <b>Cuadro 2.</b> Efecto de la aplicación de cepas de <i>Rhizobium</i> en el volumen de raíces (VR), número de nódulos por planta (NN) y peso seco de nódulos (PSN) en el cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....  | 41     |
| <b>Cuadro 3.</b> Efecto de la aplicación de aislamientos de <i>Bacillus</i> spp en el volumen de raíces (VR) y diámetro de tallos en plántas de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en invernadero.....   | 44     |
| <b>Cuadro 4.</b> Características físicas y químicas del suelo del área experimental del CIIDIR Sinaloa, ubicado en el municipio de Guasave, Sinaloa, México.....   | 45     |
| <b>Cuadro 5.</b> Efecto de los tratamientos (fertilización química sintética, biofertilizantes y combinación de ambos) en la concentración foliar de calcio (%), magnesio (%), hierro (ppm), zinc (ppm), manganeso (ppm) y cobre (ppm) en las plantas de frijol variedad azufrado higuera en condiciones de campo..... | 50     |
| <b>Cuadro 6.</b> Medias de las variables número de nódulos por planta y peso seco de nódulos de plantas de frijol variedad azufrado higuera en condiciones de campo, bajo riego por goteo.....   | 52     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | PAGINA |
|---|--------|
| <b>Figura 1.</b> Semillas de frijol variedad azufrado higuera germinadas en agua agar .....   | 24     |
| <b>Figura 2.</b> Plantas de frijol en invernadero y distribución de tratamientos para la selección del mejor aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.....  | 25     |
| <b>Figura 3.</b> Medición de la altura de planta del cultivo de frijol.....   | 26     |
| <b>Figura 4.</b> Medición del volumen de raíces de plantas de frijol.....   | 26     |
| <b>Figura 5.</b> Ubicación del municipio de Guasave, Sinaloa, México.....   | 27     |
| <b>Figura 6.</b> Distribución de tratamientos aplicados al cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en campo con riego por goteo en un diseño de bloques completos al azar (BCA).....    | 29     |
| <b>Figura 7.</b> Nódulos formados en raíces de plantas de frijol variedad azufrado higuera.....   | 35     |
| <b>Figura 8.</b> Cosecha del cultivo de frijol variedad azufrado higuera bajo riego por goteo.....  | 36     |
| <b>Figura 9.</b> Medias de la variable altura de planta de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) inoculadas con diferentes cepas de <i>Rhizobium</i> en invernadero.....                           | 38     |
| <b>Figura 10.</b> Comparación entre una planta inoculada con la cepa de <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 y testigo.....   | 39     |
| <b>Figura 11.</b> Medias de la variable peso seco de follaje de plantas de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) inoculadas con diferentes cepas de <i>Rhizobium</i> en invernadero.....           | 39     |
| <b>Figura 12.</b> Medias de la variable altura de planta en el cultivo de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) inoculadas con diferentes aislamientos de <i>Bacillus</i> spp en invernadero.....  | 42     |
| <b>Figura 13.</b> Medias de la variable peso seco de follaje de plantas de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) inoculadas con diferentes aislamientos de <i>Bacillus</i> spp en invernadero..... | 43     |
| <b>Figura 14.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de nitrógeno total en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo.....           | 46     |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 15.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de fósforo en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo..... | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de potasio en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo..... | 48 |
| <b>Figura 17.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre materia seca de follaje en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo.....            | 51 |
| <b>Figura 18.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre el rendimiento del cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo.....                       | 54 |

## ÍNDICE DE CUADROS EN LOS ANEXOS

|   | <b>PAGINA</b> |
|---|---------------|
| <b>Cuadro 1A.</b> Solución nutritiva Jensen, deficiente en nitrógeno..... | 78            |

## RESUMEN

En México, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más importante por su superficie cultivada y su papel en la alimentación. En Sinaloa, la superficie cultivada es superada solamente por el cultivo de maíz; en el ciclo agrícola 2009-2010 se sembraron 139,751 hectáreas, principalmente bajo régimen de riego, con una producción de 216,254 toneladas, la cual fue superada únicamente por el Estado de Zacatecas. El frijol es una leguminosa poco eficiente en la fijación biológica de nitrógeno; debido a ello los productores de la región recurren al uso de fertilizantes químicos sintéticos, principalmente nitrogenados, los cuales elevan los costos de producción y afectan negativamente el ambiente. En éste trabajo se comparó la fertilización sintética con orgánica y su interacción en el cultivo de frijol en condiciones de riego por goteo. Los experimentos se realizaron en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), en Guasave, Sinaloa. En invernadero se evaluaron 15 cepas nativas de *Rhizobium* y 15 aislamientos nativos de *Bacillus* en base a sus efectos de promoción de crecimiento en plantas de frijol; posteriormente, para el experimento de campo se realizó un arreglo factorial con tres factores (*Rhizobium*, *Bacillus* y nitrógeno) con 2x2x3 niveles de cada uno, resultando 12 tratamientos, los cuales fueron distribuidos mediante un diseño de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones. Las variables evaluadas en campo fueron peso seco de follaje, número de nódulos por planta, peso seco de nódulos, concentración foliar de nutrimentos y rendimiento de grano. De los resultados de invernadero se seleccionó la cepa de *Rhizobium* CIIDIR 13 y el aislamiento de *Bacillus* Bs 14. En campo, el tratamiento con *Rhizobium* y *Bacillus* (*Rz+Bs*) presentó el valor más alto de concentración foliar de nitrógeno, superando solamente al testigo (sin inoculación y sin fertilización); además, (*Rz+Bs*) obtuvo la mayor producción de biomasa foliar, número de nódulos por planta, peso seco de nódulos y rendimiento de grano; para rendimiento de grano, éste tratamiento superó estadísticamente ( $p < 0.05$ ) al testigo y a la fertilización nitrogenada a base de amonio 80N(0:1).

## ABSTRACT

Because the significant cultivated acreage and its role as a food source, Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are one of the most important legumes in Mexico. Only In the state of Sinaloa bean production occupies the second place after Corn regarding to the cultivated area. During the 2009-2010 growing season the total planted acreage under watering conditions, reached 345.332 acres, producing 216,254 tons of grain. Among the legumes, bean plants are quite inefficient in the biological process of fixing Nitrogen; as a consequence farmers have to use large quantities of artificial synthetic fertilizers containing Nitrogen (N). This practice increases the cost of production and negatively affects the environment. As a result the cost of production is highly affected. The objective of this research was to compare the interaction among organic and inorganic fertilization under dripping irrigation conditions. The experimental work was conducted at the Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), in Guasave, Sinaloa. A first test was carried out under greenhouse conditions to determine the effect of 15 native isolates of *Rhizobium* and 15 native isolates of *Bacillus* on plant development. In a second experiment, the same isolates were tested under field conditions. The experimental plot included three factors (*Rhizobium*, *Bacillus* and Nitrogen) under a factorial experimental design of 2x2x3 making a total of 12 treatments, distributed in a Randomized Complete Block Design. Data on dry weight, number of nodules per plant and foliar nutrient concentration as well as final yield were recorded. Under greenhouse conditions the best treatments were the isolate *Rhizobium* CIIDIR 13 and the *Bacillus* Bs 14. Under field conditions the best treatment was the combination of *Rhizobium* and *Bacillus* (*Rz+Bs*). This treatment showed the highest dry weight, number of nodules per plant, foliar nutrient concentration as well as final yield. In addition, this treatment obtained the highest value of foliar nitrogen concentration. Statistically, this treatment was better ( $p < 0.05$ ) than the check and the treatment fertilized with Nitrogen (Ammonium 80N, 0:1).

## I. INTRODUCCIÓN

En México el frijol es la leguminosa más importante por su papel en la alimentación humana; nuestro país ocupa el quinto lugar en la producción mundial de éste grano con 1.12 millones de toneladas (FAO, 2008).

De los principales Estados productores de frijol, Sinaloa ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada y volumen de producción (SIAP, 2009).

El frijol pertenece a la familia de las leguminosas, las cuales demandan altas cantidades de nitrógeno, ya que este elemento interviene en procesos metabólicos, principalmente en la formación de proteínas que contiene sus semillas (20 al 22%) (Flor y Thung, 1994). Las aplicaciones de fertilizantes sintéticos nitrogenados (FSN) en estos cultivos son reducidas y en algunas leguminosas no son necesarias, debido a que tienen la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*, las cuales inducen en las raíces de éstas plantas la formación de órganos especializados llamados nódulos, en donde el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) es reducido a amonio ( $NH_4$ ) por actividad de la enzima nitrogenasa, mediante un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Dobereiner *et al.*, 1995; Delgadillo-Martínez *et al.*, 2005; De Felipe, 2006). En esta simbiosis, las plantas huésped obtienen nutrientes nitrogenados de las bacterias y ofrecen a éstas compuestos de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno (Olivares, 2004; Velázquez, 2006).

Algunos autores mencionan que la FBN puede reducir o sustituir el uso de FSN, siempre y cuando las condiciones como temperatura, pH, humedad, y contenido nutrimental en el suelo sean favorables tanto para las leguminosas, como para sus microsimbiontes (Ofosu-Budu *et al.*, 1992; Dear y Virgona, 1996). Sin embargo, en el cultivo de frijol la tasa de fijación de nitrógeno es pobre en comparación con otras leguminosas de grano (Buttery *et al.*, 1986; Hardarson, 1993).

En el Estado de Sinaloa, se siembran genotipos de frijol de altos rendimientos y se aplican dosis que van de 80 a 120 kg de nitrógeno ha<sup>-1</sup>, principalmente en forma de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (INIFAP, 2000). El uso inadecuado y excesivo de éstos insumos provoca aumento en los costos de producción, impacto negativo en el ambiente y en ocasiones causa daños directos a la salud humana por el consumo de agua con altos contenidos de nitratos (OMS, 1995).

Lo anterior se intensifica debido a las bajas eficiencias en las aplicaciones de éstos fertilizantes con los métodos tradicionales (Cadahia, 2000). Una manera eficiente para la aplicación de fertilizantes es mediante el agua de riego, a través del riego por goteo, con lo cual se tiene la posibilidad de dosificar la fertilización en base a los requerimientos en las etapas de desarrollo de los cultivos; además de que se pueden obtener ahorros de agua hasta del 80% con respecto a otros sistemas de riego (Peña, 1997).

Por otra parte, la aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal y *Rhizobium* ha incrementado la nodulación y fijación de nitrógeno en cultivos de leguminosas tanto en experimentos de invernadero, como en condiciones de campo (Burdman *et al.*, 1997; Hamaoui *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003); lo cual se debe a efectos sinérgicos entre éstos organismos (Bashan *et al.*, 1996b).

Por lo antes mencionado, este trabajo planteó como objetivo general, comparar la fertilización sintética con la biofertilización que incluye bacterias del género *Rhizobium* y *Bacillus* en el rendimiento del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de riego por goteo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del Cultivo de Frijol

#### 2.1.1 Importancia del cultivo

El frijol es la leguminosa más importante por su papel en la alimentación humana en México y en otros países en desarrollo (Broughton *et al.*, 2003). América Latina es la zona de mayor producción y consumo, con más del 45 % del total de la producción mundial (Coelho, 1991; Voysest, 2000).

En el país, el cultivo de frijol ocupa el segundo en superficie sembrada entre los cultivos de grano y representa además la segunda actividad agrícola más importante por el número de productores, lo cual hace que sea el segundo cultivo más importante en México (SAGAR, 1998).

Alrededor de un 3% de la producción nacional de frijol es utilizada como semilla, 2.4% se pierde en mermas y el resto se destina para el consumo humano, considerando un consumo aparente promedio anual de 1, 129,085 t. Su composición nutritiva es rica en varios elementos esenciales para el hombre. Se estima que 250 g de frijol cocinado pueden proporcionar hasta el 16% de la proteína requerida por día (Morales, 2000).

#### 2.1.2 Cultivo de frijol en México

El frijol pertenece a la familia de las leguminosas, clase *Dicotyledoneae*, género *Phaseolus* y especie *vulgaris*. En México, se siembran diferentes variedades de éste cultivo, lo cual depende de las necesidades del mercado y de las condiciones climáticas de cada región. En Sinaloa, se siembran principalmente los cultivares Azufrado Noroeste, Azufrado Higuera, Azufrado Regional 87, Azufrado Peruano 87, Azufrado Pimono 78, Peruano P 80, y del tipo de grano de color negro: Sataya 425, Negro Sinaloa, Jamapa, Negro Pacífico, Negro Tacaná y Negro Sahuatoba. De éste

grupo de frijoles, los Azufrados son sembrados en mayor superficie y actualmente el Azufrado Higuera presenta mayor demanda por el mercado regional (INIFAP, 2008).

El frijol se siembra en las diversas condiciones agroecológicas de casi todo el territorio nacional. Existen dos periodos de siembra bien identificados, el ciclo primavera-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I); además, para cada región en particular se han desarrollado prácticas específicas de manejo del cultivo (INIFAP, 2002).

Son cinco las entidades (Zacatecas, Sinaloa, Durango, Nayarit y Chihuahua) que concentran 63.5% de la superficie sembrada y sostienen el 65.3% del total de la producción del país. Sinaloa es el principal Estado productor en el ciclo O-I y se lleva a cabo principalmente bajo el régimen de riego, logrando altos rendimientos y mayores posibilidades de mercado (FIRA, 2001). En el ciclo agrícola otoño-invierno 2009-2010 en el Estado se sembraron 139,751 ha, con una producción de 216,254 t (SIAP-SAGARPA, 2010).

Los rendimientos promedios de frijol a nivel nacional en cultivos de temporal son de 0.52 a 0.61 t ha<sup>-1</sup>, mientras que en la modalidad de riego éstos se incrementan (0.85 a 1.7 t ha<sup>-1</sup>) (SIAP-SAGARPA, 2008).

### **2.1.3 Riegos**

El contenido de humedad en el suelo al momento de la siembra, debe de ser adecuado para permitir el paso de maquinaria y favorecer de manera positiva la germinación de las semillas, por lo que se recomienda dar un riego de presembrado y posteriormente los riegos de auxilio, los cuales están en función de las condiciones ambientales de cada región y de las etapas fenológicas del cultivo (INIFAP, 2008).

En etapa de floración, es importante que el cultivo disponga de suficiente humedad para asegurar una buena formación de vainas y llenado de frutos, lo cual definirá la calidad del grano y el rendimiento del cultivo (Rios *et al.*, 2003).

Los riegos, también afectan al contenido de humedad en el suelo y a la vida de los microorganismos; en éste sentido, el número de rizobios disminuye a medida que el suelo se seca. Por lo tanto, la fijación biológica de nitrógeno se ve afectada por el estrés hídrico, en mayor medida que por otros factores (Herman *et al.*, 1993; Canigia, 2003).

## **2.2 Bacterias Promotoras del Crecimiento de Vegetal (BPCV)**

El término BPCV fue usado por primera vez por Kloepper y Schroth en 1978, quienes se refirieron al conjunto de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas cultivadas en una región de Francia (Kloepper y Schroth, 1978).

Las BPCV son un grupo heterogéneo de bacterias capaces de colonizar la zona de la rizosfera y estimular de manera directa e indirecta el crecimiento de las plantas, mediante mecanismos como la producción de sustancias reguladoras de crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1991; Verma *et al.*, 2010), solubilización y mineralización de fosfatos (Crowley *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992; Rodríguez y Fraga, 1999), incremento del volumen de raíces (Bowen y Rovira, 1999; López-Bucio *et al.*, 2009), fijación biológica de nitrógeno (Boonjawat *et al.*, 1991; Döbereiner *et al.*, 1995) y producción de sideróforos y antibióticos que afectan negativamente el crecimiento de hongos fitopatógenos (Vessey, 2003).

Los efectos de las BPCV son derivados de cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces de las plantas colonizadas, así como de la mejora en la toma de agua y nutrimentos (Sarig *et al.*, 1988).

El establecimiento de éstos microorganismos en la zona de la rizosfera depende de muchos factores, entre ellos la liberación de exudados radicales por parte de las plantas hospederas y la capacidad de respuesta genética y atrayente del microorganismo hacia la rizosfera (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003).

Algunos géneros bacterias reportadas como BPCV son *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Klebsiella* y *Serratia* (Dobereiner, 1992).

### 2.3 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Es la capacidad que posee un pequeño grupo de microorganismos; incluyendo algas, bacterias y actinomicetes de convertir el nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) en amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), el cual es una forma nitrogenada utilizable por las plantas. La FBN consiste en una reacción que es catalizada por el complejo enzimático, nitrogenasa e involucra pérdidas de energía en forma de ATP (Silvester *et al.*, 1987; Echegaray, 1995; Leigh, 2002).

Reacción de la fijación biológica de nitrógeno:



Los sistemas biológicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico han sido clasificados como no simbióticos y simbióticos, dependiendo del requerimiento de uno o más organismos para llevar a cabo el proceso. Del total del nitrógeno fijado biológicamente en la Tierra, el 75% se lleva a cabo por los sistemas simbióticos entre bacterias del género *Rhizobium* y leguminosas (De Felipe, 2006). Alrededor del 75% del nitrógeno requerido por las plantas de frijol, proviene de la fijación simbiótica (Piha y Munns, 1987).

La eficiencia de fijación de nitrógeno en las asociaciones *Rhizobium*-Leguminosas, depende de la capacidad infectiva y efectiva de las cepas (Thies *et al.*, 1991), de las condiciones del ambiente (Herman *et al.*, 1993; Sessitsch *et al.*, 2002) y de la especie vegetal involucrada (Dobereiner y Day, 1975).

La presencia de leghemoglobina, la cual es una proteína de alta afinidad con el oxígeno, permite un adecuado funcionamiento de la enzima nitrogenasa e incrementa la actividad de fijación de nitrógeno. Existe una marcada relación entre el contenido de leghemoglobina, el color de los nódulos y el peso seco de éstos, por lo que éste último es uno de los parámetros que se relaciona con la eficiencia de la FBN en leguminosas (Bergersen *et al.*, 1973; Bergersen y Appleby, 1981).

Algunos factores como temperaturas altas (Ferrari *et al.*, 1967; Ofosu-Budu *et al.*, 1992), problemas de salinidad (Saadallah *et al.*, 2001), baja disponibilidad de agua lo cual provoca cambios en la actividad de la nitrogenasa y biomasa de nódulos (González *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2003), estrés osmótico que disminuye el número de nódulos por planta y peso seco de nódulos (Sassi *et al.*, 2008), deficiencias de fósforo (Remans *et al.*, 2007) y la formación de nódulos por cepas de *Rhizobium* poco eficientes para fijar nitrógeno (Silva *et al.*, 2003), afectan negativamente la fijación de nitrógeno en el cultivo de frijol, lo cual hace que sea considerada la leguminosa de menor eficiencia en la FBN.

#### **2.4 Bacterias del Género *Rhizobium***

Las bacterias del género *Rhizobium* son aerobias, de forma bacilar, Gram negativas y con disposición de 2 a 6 flagelos peritricos (a los que se atribuye su movilidad). Las condiciones óptimas para su crecimiento se alcanzan a temperaturas de 25-30°C, en un rango de pH de 6-7; las colonias son claras, circular, semi translucidas u opacas y alcanzan un diámetro de 2-4 mm en un tiempo de 3-5 días en su medio adecuado. Para su crecimiento, estas bacterias pueden aprovechar

varias fuentes de carbohidratos; generalmente se usa glucosa, manitol o sacarosa en el medio de cultivo (Somasegaran y Hoben, 1985).

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de éstas bacterias, es su habilidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con plantas leguminosas, lo cual ha sido ampliamente estudiado (Brencic y Winans 2005); además, se ha demostrado que algunas cepas de *Rhizobium* tienen la capacidad de sintetizar sustancias promotoras de crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas y citocininas) (Santillana *et al.*, 2005; Etesami *et al.*, 2009), enzimas (Mayak *et al.*, 2004), sideróforos (Carson *et al.*, 2000) y metabolitos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos (Essalmani y Lahlou, 2003). En éste sentido, cepas de *Rhizobium leguminosarum* con habilidad de solubilizar fosfatos, aumentaron el rendimiento en maíz y lechuga (Chabot *et al.*, 1996; Sridevi y Mallaiah, 2007).

De la misma manera, cepas de *Mesorhizobium* obtenidas de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), fueron capaces de solubilizar fosfato inorgánico, presentando diferencias estadísticas significativas entre ellas, en cuanto a distancia del halo de solubilización (Rivas *et al.*, 2006).

En el cultivo de Maíz (*Zea mays* L.) la inoculación con *Rhizobium* en condiciones normales de campo, incrementó significativamente el peso seco de follaje y raíces; asimismo, al combinar *Rhizobium* y *Pseudomonas* bajo condiciones de salinidad en el suelo, el cultivo respondió favorablemente en absorción de potasio, fósforo y calcio, comparado con el testigo sin inocular (Bano y Fatima, 2009).

#### **2.4.1 Clasificación de especies de *Rhizobium***

La primera clasificación de especies del género *Rhizobium* fue en base a la leguminosa que nodulaba, lo que condujo a la definición de grupos de nodulación cruzada; en donde cada especie de *Rhizobium* está constituida por un grupo de

cepas que nodulan a un conjunto particular de leguminosas huésped; por ejemplo, el cultivo de frijol es nodulado por *Rhizobium phaseoli*, soya por *Rhizobium japonicum*, trébol por *Rhizobium trifolii*, chicharo por *Rhizobium leguminosarum* y alfalfa por *Rhizobium meliloti* (Somasegaran y Hoben, 1985). La descripción de estas especies se registró en el Manual de Bergey, el cual ha jugado un papel fundamental en la taxonomía de los rizobios (Kuykendall, 2005).

Dentro de éste sistema de clasificación, se han definido dos grupos de bacterias en base a su hábito de crecimiento, por ejemplo *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium tropici* y *Sinorhizobium fredii* son bacterias de crecimiento rápido; mientras que, únicamente las especies del género *Bradyrhizobium* son consideradas de crecimiento lento (Canigia, 2003).

El sistema de clasificación de nodulación cruzada ha presentado limitaciones debido a que los mecanismos moleculares involucrados en el proceso simbiótico son muy complejos y es difícil establecer rangos de leguminosas hospederas (Pueppke y Broughton, 1999). Aunque probablemente subestimado, está bien establecido que muchos rizobios son capaces de nodular diferentes grupos de leguminosas, y por lo tanto, muchas leguminosas pueden ser noduladas por varias especies de *Rhizobium*; como es el caso de *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* y *Rhizobium tropici*, los cuales ambos son microsimbiontes fijadores de nitrógeno en frijol (Poupot *et al.*, 1993; Poupot *et al.*, 1995).

Actualmente, han surgido nuevas propuestas de clasificación de los rizobios basadas en técnicas modernas de biología molecular, como la amplificación del DNA por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del gene 16S rRNA (Laguerre *et al.*, 1997); asimismo se ha establecido el uso de *primers* adecuados para amplificar fragmentos de alrededor de 930 pares de bases para genes *nodC* y 780 pares de bases para genes *nifH*, ambos se encuentran en

plásmidos simbióticos y están relacionados con la nodulación y fijación de nitrógeno, respectivamente; además de la hibridación DNA-DNA, entre otras (Laguerre *et al.*, 2001; Palma, 2009).

Mediante la clasificación de las bacterias en base al gen ribosómico 16S se ha logrado separar los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* (Amarger *et al.*, 1997). El género *Mesorhizobium* se ha asociado como microsimbionte de algunas especies de trébol (Iribarne *et al.*, 1998), garbanzo y *Caragana* spp (Yan *et al.*, 2007); *Rhizobium* de frijol, trébol, alfalfa, *Caragana* spp., entre otros (Cleyet-Marel *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 2007), *Bradyrhizobium* de soya (*Glycine max*) y algunas especies del género *Lotus*, *Vigna*, *Cicer* y *Lupinus* (Leyet-Marel *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1992) y *Sinorhizobium* de soya, alfalfa (*Medicago sativa*) y frijol (Jones *et al.*, 2007).

Los microsimbiontes de frijol forman un grupo taxonómicamente heterogéneo, los cuales han sido clasificados en dos géneros, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*; algunas especies de *Rhizobium* se han dividido en biovariedades debido a que existe un extenso rango de hospederos y gran variabilidad genética (Amarger *et al.*, 1997).

En los centros de origen del frijol, las especies predominantes de *Rhizobium* en nódulos de éstas leguminosas corresponden a *Rhizobium etli*. Adicionalmente, se han encontrado muchas otras especies tales como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium gallicum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium giardinii* bv. *phaseoli* y *Rhizobium tropici* en nódulos de frijol en regiones donde éste cultivo ha sido introducido y se cree que esas especies de *Rhizobium* pudieron haber surgido mediante la adquisición de plásmidos simbióticos de *Rhizobium etli*. Debido al extenso número de especies de *Rhizobium* capaces de nodular plantas de frijol, se ha señalado a ésta leguminosa como un hospedero promiscuo (Segovia *et al.*, 1993; Martínez-Romero, 2003; Janczarek *et al.*, 2009).

Lo anterior indica que a pesar de los avances que se han logrado en biología molecular, las técnicas moleculares modernas para la clasificación de especies de *Rhizobium* no han satisfecho las expectativas de muchos investigadores; lo cual se debe a que el comportamiento de las poblaciones de *Rhizobium* en nódulos de leguminosas son determinadas por condiciones ambientales y prácticas agrícolas (Palmer y Young, 2000). En el cultivo de frijol, para la definición de especies de *Rhizobium* se siguen tomando en cuenta algunos criterios originales de la propuesta de nodulación cruzada.

#### **2.4.2 Importancia de la selección de cepas de *Rhizobium***

Existe limitación en cuanto a la distribución geográfica de algunas especies de rizobios, por ejemplo especies de *Sinorhizobium fredii* que son capaces de inducir nodulación en soya fueron aislados únicamente de suelos de China (Camacho *et al.*, 2002).

Muchas leguminosas al crecer en diferentes regiones, adquieren capacidad de ser noduladas por diferentes especies de *Rhizobium*, como resultado de la co-evolución planta-bacteria (Han *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que no todas las cepas de *Rhizobium* presentan la misma efectividad para fijar nitrógeno, lo cual depende de su información genética (Paffetti *et al.*, 1996; Michels *et al.*, 1998) y de las condiciones ambientales a las que están adaptadas (Mora, 1995).

La eficiencia de cepas de *Rhizobium* para nodular y fijar nitrógeno en leguminosas hospederas, es influenciada por sus genotipos individuales, los cuales son muy heterogéneos y presentan elevada diversidad genética (Paffetti *et al.*, 1996; Michiels *et al.*, 1998).

En el cultivo de *Lotus glaber* (Miller), se logró incrementar la nodulación y fijación de nitrógeno con la inoculación de cepas nativas de *Mesorhizobium* spp en

comparación con la inoculación de una cepa control USDA3471; en base a ello se sugiere realizar selección de cepas nativas para la formulación de inoculantes comerciales en cada región (Iribarne *et al.*, 1998).

En el caso del cultivo de frijol, uno de los aspectos que contribuye a que sea la leguminosa de menor eficiencia en fijación simbiótica de nitrógeno, es la presencia de cepas nativas poco eficientes y muy competitivas en el proceso de infección, presentando ventajas ante las cepas inoculadas (Castro *et al.*, 2000). Esto se ha hecho evidente en campos agrícolas de América Latina, en donde la gran diversidad de poblaciones de *Rhizobium* bien adaptadas a esas regiones son ineficientes en fijación de nitrógeno; por lo tanto, es importante seleccionar cepas nativas, pero además efectivas y competitivas para cada región (Graham, 1981; Quadrelli *et al.*, 1997).

## **2.5 Bacterias del Género *Bacillus***

El género *Bacillus* comprende en un grupo heterogéneo de bacilos Gram positivos, oxidasa y catalasa positiva (con algunas especies excepcionales), generalmente se encuentran en el suelo y agua e incluyen un amplio número de especies, algunas de las cuales son: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus lincheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. El crecimiento de las colonias de éstas bacterias es de forma irregular, de color crema, apariencia ondulada, digitiforme, lobulada o aserrada en los bordes y de consistencia cremosa (Calvo y Zúñiga, 2010).

Algunas características particulares de *Bacillus* como la formación de endosporas ante condiciones ambientales desfavorables, la producción de hormonas vegetales, de antibióticos y metabolitos termoestables les confieren la capacidad de colonizar la zona de la rizosfera en determinados ecosistemas

agrícolas, impidiendo el establecimiento de microorganismos fitopatógenos (Petersohn *et al.*, 2001; Todar, 2003).

Mazotto *et al.* (2010) mencionan que algunas especies de *Bacillus* producen elevados niveles de peptinasas y queratinasas, las cuales se involucran en la degradación de sustratos orgánicos tales como queratina y hemoglobina.

### **2.5.1 Bacterias del género *Bacillus* como promotoras de crecimiento**

Las bacterias del género *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas por sus efectos directos e indirectos en la promoción de crecimiento vegetal (Arkhipova *et al.*, 2005; Kaymak *et al.*, 2008). Dentro de los mecanismos directos, se pueden mencionar a la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos mediante la producción de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999; Vazquez *et al.*, 2000) y la síntesis de fitohormonas reguladoras crecimiento (citocininas, ácido abscisico y ácido indolacético) (Arkhipova *et al.*, 2005), lo cual aumenta el volumen de raíces e incrementa la absorción de nutrientes por las plantas, favoreciendo la fisiología de éstas (Cassman *et al.*, 1981).

En el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*), la inoculación con la cepa *Bacillus* spp OSU-142 incrementó el rendimiento de grano y otras variables agronómicas en tres dosis de fertilización nitrogenada (0, 40 y 80 kg ha<sup>-1</sup>), en comparación con el control sin inocular (Ozturk *et al.*, 2003).

Arkhipova *et al.* (2005) reportaron acumulación de citocininas en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas con *Bacillus subtilis*, tanto al inicio como al final del experimento; lo cual se relacionó con un incremento en peso de materia seca del follaje y peso de raíces de hasta aproximadamente 30%.

La inoculación con *Bacillus megatorium* en el cultivo de menta (*Mentha piperita*) incrementó significativamente el porcentaje de elongación radicular y la producción de materia seca, en comparación con un tratamiento control (Kaymak *et al.*, 2008). Como efectos indirectos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal, algunas especies de *Bacillus* producen sustancias con capacidades antagónicas contra hongos fitopatógenos, lo cual permite prevenir o disminuir los efectos adversos de las enfermedades sobre el desarrollo de los cultivos (Swain *et al.*, 2008; Velmurugan *et al.*, 2009).

La cepa EF 617317 de *Bacillus subtilis* y EF 617325 de *Bacillus licheniformis* inhibieron fuertemente el crecimiento micelial de *Ophiostoma flexuosum*, *polonicum*, *O. tetropii* y *O. ips* en condiciones de laboratorio (Velmurugan *et al.*, 2009). De igual manera, en experimentos *In vitro*, cepas de *B. subtilis* inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Botryodiplodia theobromae*, tanto en medio líquido como en medio sólido, lo cual se atribuye a la producción de quitinasa por ésta bacteria (Swain *et al.*, 2008).

## **2.6 Sinergismo de *Rhizobium* y *Bacillus* en la Fijación Biológica de Nitrógeno**

En leguminosas, la co-inoculación con BPCV y *Rhizobium* es preferida para mejorar el rendimiento de las plantas (García *et al.*, 2004). Se han observado efectos positivos al realizar inoculaciones combinadas de BPCV y *Rhizobium* sobre la nodulación, fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) y crecimiento de plantas tanto en condiciones controladas en invernadero, como en experimentos de campo (Burdman *et al.*, 1997; Hamaoui *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003).

Las BPCV estimulan el desarrollo radicular de las plantas colonizadas, aumentando la absorción de nutrientes y agua, lo cual puede influir indirectamente de manera positiva en la FSN (Vessey y Buss, 2002).

En el cultivo de lenteja (*Lens esculenta* M.) la inoculación con la cepa NRRL B-30408 de *B. subtilis* influyó de manera positiva sobre el crecimiento de plantas, biomasa foliar, concentración de leghemoglobina en nódulos y otros parámetros de rendimiento de cultivo en dos años consecutivos (Rinu y Pandey, 2009).

En plantas de frijol común y soya se mejoró la FBN en ambos cultivos, al co-inocular *Bacillus* con *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* spp, respectivamente (Srinivasan *et al.*, 1997; Camacho *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003).

En experimentos a nivel de invernadero, la co-inoculación de *Rhizobium phaseoli* con *Bacillus* spp incrementó significativamente el peso seco de raíces, contenido de nitrógeno y fósforo foliar, nodulación y eficiencia de FBN en plantas de frijol, en comparación con la aplicación individual de *Rhizobium* (Figueiredo *et al.*, 2008; Stajković *et al.*, 2011).

## 2.7 Formas Disponibles de Nitrógeno para las Plantas

El suministro de nitrógeno (N) a las plantas se puede hacer por medio de la fertilización orgánica o inorgánica. La primera se basa en el uso de organismos que liberan sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de materiales como estiércoles, residuos vegetales o compostas que al mineralizarse por acción de microorganismos dan lugar a la liberación de pequeñas moléculas de N orgánico (aminoácidos) y que posteriormente se convertirá en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En el suelo, el amonio puede sufrir un proceso de nitrificación (formación de nitratos  $\text{NO}_3^-$ ) o ser absorbido directamente por las plantas (Lea y Morot-Gaudry, 2001).

Las formas inorgánicas de N están representadas por los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La concentración de ambos iones promueve el balance catión/anión en las células vegetales (Raven y Smith, 1976; Bloom, 1994). Se ha demostrado que bajo ciertas circunstancias y con variaciones entre cultivos, un adecuado balance

entre los iones (nitrato y amonio) beneficia el crecimiento de las plantas (Mengel y Kirkby, 1987; Lips *et al.*, 1990).

En plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), al estudiar el efecto de diferentes relaciones  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ , se encontró que una mayor proporción de éstas favoreció la altura de planta, diámetro de tallo, rendimiento y vida de anaquel de frutos. Además, la acumulación excesiva de amonio causó disminución de la concentración de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en los tejidos (Jingquan y Dewei, 1988; Espejel, 2009).

De la misma manera, la respuesta fisiológica de las plantas leguminosas a la fertilización nitrogenada depende de la fuente de nitrógeno que se use (Feil, 1994; Guo *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2007).

Sin embargo, la forma preferente de absorber nitrógeno por las plantas en general dependerá de la especie vegetal y de sus características fisiológicas, alterando la calidad y cantidad de las cosechas (Heeb *et al.*, 2005; García *et al.*, 2009).

### 2.7.1 Nitratos

En cuanto al efecto de los nitratos en la nutrición vegetal, se ha observado que plantas de trigo (*Triticum aestivum*, L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) desarrolladas en un medio fertilizado con amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por separado, absorbieron más agua del medio que contenía nitrógeno en forma de nitratos, lo que se tradujo a una mayor producción de materia seca foliar (Feil, 1994; Guo *et al.*, 2002).

En un experimento en hidroponía, el cultivo de nopal (*Opuntia ficus-indica*) presentó mayor absorción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) como fuente de nitrógeno en la solución

nutritiva, lo cual se asoció a una mayor producción de materia seca, en comparación con el tratamiento a base de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Vázquez *et al.*, 2000).

Por otra parte, la fuente de nitrógeno influye en el contenido de nitratos que se puede acumular en el follaje de las plantas; por ejemplo, en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) la fertilización con nitrato de calcio incrementó la concentración de ( $\text{NO}_3^-$ ) en las hojas, lo cual puede causar problemas de salud al consumir estas hortalizas (Escalona *et al.*, 2009).

### 2.7.2 Amonio

Cuando las plantas absorben nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), las células vegetales evitan la toxicidad de éste, transformándolo rápidamente en aminoácidos, para ello se requieren acciones secuenciales de algunas enzimas como glutamina sintetasa y la glutamato sintetasa (Heldt, 1997).

La fertilización nitrogenada a base de  $\text{NH}_4^+$  incrementó aproximadamente un 30% en el peso seco de raíz en plantas de Remolacha; en consecuencia, la concentración interna de potasio (K) disminuyó en las plantas tratadas con éste catión (Causin y Arnozis, 1988).

Guo *et al.* (2007) reportaron efectos negativos sobre parámetros de crecimiento y área foliar en plantas de frijol cultivadas en un medio con nitrógeno en forma de amonio; mientras que esos efectos no fueron observados al combinar amonio y nitrato como fuente de nitrógeno. Asimismo, la forma de nitrógeno afectó la tasa de absorción de agua, presentando valores más altos en medios con nitrato.

Por otro lado, la fertilización nitrogenada a base de amonio (relación 0/100) incrementó significativamente el área foliar y la producción de biomasa total en

cebollín; mientras que en el cultivo de albahaca se obtuvieron esos efectos con la relación 20/80 ( $\text{NO}_3/\text{NH}_4$ ) (García *et al.*, 2009).

## **2.8 Efecto de la Fertilización Nitrogenada en la Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosas**

Algunos experimentos han mostrado que la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados en cultivos de leguminosas reduce la infección de pelos radicales, número de nódulos, masa de nódulos y Fijación de nitrógeno (Dazzo y Brill, 1978). El costo energético que invierten las plantas para formar estructuras simbióticas y fijar nitrógeno atmosférico supera al gasto de energía de éstas en la asimilación de nitrógeno mineral disponible (Kretovich, 1994).

Se cree que bajo suministro suficiente de nitrógeno mineral en el suelo, las plantas hospederas activan sus sistemas de defensa, al reconocer a las bacterias noduladoras como patógenos, lo cual previene las fases iniciales de la simbiosis (Kirichenko, 2001).

Sin embargo, es importante considerar que en etapas iniciales de cultivo, la fertilización nitrogenada a bajas concentraciones beneficia al desarrollo de relaciones simbióticas entre *Rhizobium* y leguminosas, lo cual se sustenta en el hecho de que las plantas requieren de nitrógeno para realizar procesos bioquímicos tales como fotosíntesis (Shumnyi *et al.*, 1991).

En el cultivo de frijol, aplicaciones tempranas de dosis bajas de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), etapa en la que la planta no puede beneficiarse del  $\text{N}_2$  procedente de la FBN, favorecieron el desarrollo de nódulos, la fijación de nitrógeno y la actividad de la enzima nitrato reductasa, la cual está involucrada en la asimilación de nitrógeno en el metabolismo vegetal (Pliego *et al.*, 2002).

En general, la sensibilidad de afectación a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa por la fertilización nitrogenada, depende de la fuente de nitrógeno (nitrato y amonio) (Ying *et al.*, 1988). Se ha encontrado que ésta es mayor cuando se aplica nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3$ ), que en forma de amonio ( $\text{NH}_4$ ) (Vessey y Bollman, 2006) y se puede explicar debido a que el óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), que es un subproducto de la reducción de nitratos ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) dentro de las plantas, es un metabolito tóxico que modifica el metabolismo vegetal (Dmitriev, 2004; Neill *et al.*, 2008).

## 2.9 Fertirriego

Se conoce como fertirrigación a la técnica de aplicar fertilizantes en los sistemas de riego presurizado (como el riego por goteo), lo cual permite una dosificación racional en función de la demanda del cultivo, características de suelo y condiciones ambientales específicas. También permite hacer frente a los problemas de contaminación que se pueden originar por un exceso transitorio de fertilizantes en el suelo (Cadahia, 1998).

El fertirriego es una alternativa para elevar los rendimientos y calidad de las cosechas. La utilización de esta técnica permite obtener alta eficiencia en el uso del agua de riego y los nutrientes, debido a su aplicación localizada de acuerdo a las necesidades del cultivo (Cadahia, 2000).

Feigin *et al.* (1982) reportaron que la fertirrigación (irrigación y fertilización) es uno de los métodos más eficientes para la aplicación de fertilizantes.

El riego por goteo ha ganado popularidad debido a su eficiencia en el uso del agua y a la aplicación de nutrientes requeridos por los cultivos en cada etapa fisiológica (Bar-Yosef y Sheikholeslami, 1976; Mmolawa y Or 2000). El nivel de manejo de la fertirrigación para obtener altos rendimientos y mejor calidad del cultivo, es superior al de cualquier otro método de riego (Granelli *et al.*, 1994).

El fertirriego en frijol aumentó considerablemente el rendimiento de grano con respecto al riego por aspersión y al riego rodado. Además, las altas eficiencias permitieron registrar ahorros de agua de hasta 95 y 89% comparado con el riego rodado y por aspersión, respectivamente. Con esto se justifica que muchos productores optan por usar esta tecnología, a pesar de la alta inversión inicial que requiere (Ugalde *et al.*, 2001).

Éste sistema de riego, permite mejorar las condiciones de humedad para los microorganismos en la zona de la rizosfera, lo cual puede influir de manera positiva en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, ya que ésta es afectada negativamente en condiciones de estrés hídrico (Herman *et al.*, 1993).

### III. JUSTIFICACIÓN

El frijol es uno de los alimentos básicos más importantes en la dieta de los Mexicanos, siendo para muchos la fuente de proteínas más accesible. Por lo que se justifica la búsqueda de alternativas que aumenten su productividad y rentabilidad para los productores.

De las leguminosas de grano, el frijol es el cultivo menos eficiente en la fijación biológica de nitrógeno, razón por la cual algunos productores recurren al uso de fertilizantes químicos sintéticos, principalmente nitrogenados, los cuales tienen efectos adversos en el ambiente y elevan los costos de producción. Por lo que es necesario buscar alternativas amigables con el ambiente y económicamente factibles, como son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV); además, con el riego por goteo se favorece las condiciones de adaptación y eficiencia de los microorganismos en la zona de la rizosfera de las plantas inoculadas.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la fertilización sintética con la fertilización orgánica y su interacción en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de fertirriego.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener aislamientos nativos de *Rhizobium* a partir de nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).
2. Seleccionar cepas nativas de *Rhizobium* en el cultivo de frijol a nivel de invernadero.
3. Seleccionar el mejor aislamiento nativo de *Bacillus* spp como promotor de crecimiento en frijol en condiciones de invernadero.
4. Comparar la fertilización sintética con orgánica y la interacción de éstas en el cultivo de frijol con riego por goteo en condiciones de campo.

## V. HIPÓTESIS

La inoculación con *Rhizobium* y *Bacillus* spp en el cultivo de frijol sustituye la fertilización sintética e incrementa el rendimiento de grano en condiciones de fertirriego.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Muestreo y Aislamiento de *Rhizobium*.

Los muestreos de nódulos se realizaron durante los meses de diciembre de 2009, enero y febrero de 2010 en cultivos de frijol que se encontraban en etapa de floración en áreas agrícolas del norte de Sinaloa (municipios de Guasave y el Fuerte). Las muestras, previamente etiquetadas, fueron transportadas al laboratorio de Nutrición vegetal del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) unidad Sinaloa. De cada planta se seleccionaron los nódulos de mayor tamaño y de color rosa. Posteriormente, en una campana de flujo laminar (TELSTAR Bio-II-A), los nódulos fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% por 5 minutos, se lavaron con agua destilada estéril, se maceraron y se realizó la siembra en estrías en cajas petri con medio de cultivo Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMARC), el cual es específico para *Rhizobium* (Vincent, 1970). Los aislamientos se purificaron de acuerdo al crecimiento colonial de las bacterias, se pasaron a tubos de ensaye con medio extracto de levadura manitol y se conservaron a temperatura de 4°C.

### 6.2 Selección de Cepas Nativas de *Rhizobium* en Invernadero

Los experimentos fueron conducidos durante el mes de junio hasta el 15 de julio del año 2010, en el invernadero del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) unidad Sinaloa. Se usaron semillas de frijol variedad Azufrado higuera, las cuales fueron desinfectadas de manera superficial con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% durante 20 minutos y pregerminaron en agua agar (Figura 1), para ser posteriormente plantadas en macetas de plástico de 500 g. Como sustrato se utilizó una mezcla de peat moss más suelo aluvión (relación 2:1) con previo tratamiento de solarización.

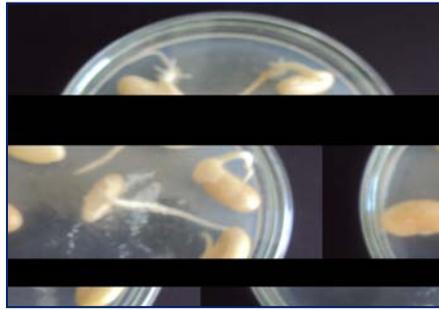


Figura 1. Semillas de frijol variedad azufrado higuera germinadas en agua agar.

Una semana después, se inoculó 1.5 mL de cada aislamiento de *Rhizobium* por seleccionar a una concentración aproximada de  $10^6$  ufc mL<sup>-1</sup>, lo cual fue preparado mediante el siguiente procedimiento; cada aislamiento se hizo crecer en medio líquido de extracto de levadura manitol (ELMA) con agitación mecánica a 90 oscilaciones por minuto a temperatura de 25°C durante 48 horas.

En éste experimento se evaluaron 16 tratamientos; 15 de los cuales fueron representados por cada aislamiento de *Rhizobium* aplicado, nombrados como CIIDIR 1, hasta CIIDIR 15. El tratamiento número 16 consistió en un testigo (sin inocular y sin fertilizar). Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones.

A los 15 días después de la siembra (dds) se aplicó una solución deficiente de nitrógeno (solución Jensen) a todos los tratamientos, incluyendo al testigo (Cuadro 1A del Anexo).

Al inicio de floración (40 dds) se evaluaron las variables: altura de planta (AP), peso seco de follaje (PSF), volumen de raíces (VR), número de nódulos por planta (NN), y peso seco de nódulos (PSN). Para cada variable evaluada se realizó un ANOVA y una prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), mediante el paquete SAS; la mejor cepa se usó para el experimento de campo.

### 6.3 Selección de Aislamientos Nativos de *Bacillus* spp en Invernadero

En éste experimento se evaluaron 15 aislamientos de *Bacillus* spp, que fueron tomados de una colección de microorganismos adaptados a éstas regiones; los aislamientos se hicieron crecer en medio líquido de infusión de papa dextrosa (IPD) con agitación mecánica a temperatura de 25°C durante 48 horas, donde se obtuvo una concentración bacteriana aproximada de  $10^7$  ufc mL<sup>-1</sup>. Se inoculó 1.5 mL de cada aislamiento en plántulas de frijol (variedad Azufrado higuera), las cuales habían sido plantadas en macetas de plástico de 500 g que contenían como sustrato peat moss:suelo (relación 2:1), con previo tratamiento de solarización.

Cada aislamiento de *Bacillus* evaluado fue nombrado con el código "Bs", con su respectivo número de identificación; asimismo, se incluyó un tratamiento testigo (sin inoculación). Lo cual generó un total de 16 tratamientos, que se distribuyeron en un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones (Figura 2).



Figura 2. Plantas de frijol en invernadero y distribución de tratamientos para la selección del mejor aislamiento de *Bacillus* spp.

En la etapa de floración (40 dds) se evaluaron las variables altura de planta (AP) (Figura 3), peso seco de follaje (PSF), diámetro de tallo (DT) y volumen de raíces (VR), éste ultimo mediante el desplazamiento del volumen de agua (Figura 4).



Figura 3. Medición de la altura de planta del cultivo de frijol



Figura 4. Medición del volumen de raíces de plantas de frijol.

Para cada variable se realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el paquete SAS; el mejor aislamiento de *Bacillus* spp se utilizó posteriormente en el experimento de campo.

## 6.4 Trabajo de Campo

### 6.4.1 Área de estudio

El experimento de campo se llevó a cabo en las instalaciones del área experimental del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) unidad Sinaloa, en la ciudad de Guasave, Sinaloa México; la cual se encuentra ubicada a 25° 25' de Latitud Norte y 108° 28' de Longitud Oeste, y pertenece al municipio de Guasave que se localiza al NE del Estado de Sinaloa

(Figura 5). El clima es BW(h') seco muy cálido y cálido, con una precipitación pluvial anual media de 392.8 milímetros (máxima de 760.03 y mínima de 231.1 mm) (INEGI, 2005).



Figura 5. Ubicación del municipio de Guasave, Sinaloa, México

## 6.5 Siembra

Previo a la siembra se realizó un muestreo y análisis de las características físicas y químicas del suelo, en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-SINALOA, en base a los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000). Asimismo, al terreno se le realizó un barbecho y rastreo como lo hacen normalmente los productores de la región.

La siembra se llevó a cabo el día 1° de noviembre en el ciclo agrícola otoño-invierno 2010; para ello se empleó la variedad de frijol azufrado higuera. Ésta actividad se realizó con una sembradora de precisión y consistió en depositar 18 semillas por metro lineal, bien distribuidas, en hilera sencilla, con una distancia de 80 cm entre surcos.

Después de la siembra se instaló un sistema de riego por goteo, que consistió en una tubería principal de 4 pulgadas para conducir el agua desde el depósito hasta el lugar del experimento y cintas de riego con goteros cada 20 cm que fueron

colocadas entre cada hilera. Los riegos se aplicaron cada tercer día con una duración de tres horas.

## 6.6 Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en un arreglo factorial 2x2x3, en donde los factores fueron *Rhizobium* con dos niveles (con y sin *Rhizobium*), *Bacillus* con dos niveles (con y sin *Bacillus*) y un tercer factor que fue la fertilización nitrogenada con tres niveles (sin nitrógeno, 80 kg de N ha<sup>-1</sup> (1:0) nitrato y 80 kg de N ha<sup>-1</sup> (0:1) amonio). De estas combinaciones surgieron 12 tratamientos (Cuadro 1), los cuales fueron distribuidos en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones.

Cuadro 1. Descripción de tratamientos aplicados al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (variedad azufrado higuera) en el experimento de campo.

| Número de tratamiento | Tratamiento          | Descripción  |
|-----------------------|----------------------|--|
| 1                     | Rz + Bs              | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 + <i>Bacillus</i> Bs14                                  |
| 2                     | Rz + Bs + 80 N (1:0) | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 + <i>Bacillus</i> Bs14 + Nitrógeno en forma de nitratos |
| 3                     | Rz + Bs + 80 N (0:1) | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 + <i>Bacillus</i> Bs14 + Nitrógeno en forma de amonio   |
| 4                     | Rz                   | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13   |
| 5                     | Rz + 80 N (1:0)      | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 + Nitrógeno en forma de nitratos                        |
| 6                     | Rz + 80 N (0:1)      | <i>Rhizobium</i> CIIDIR 13 + Nitrógeno en forma de amonio                          |
| 7                     | Bs                   | <i>Bacillus</i> Bs14   |
| 8                     | Bs + 80 N (1:0)      | <i>Bacillus</i> Bs14 + Nitrógeno en forma de nitratos                              |
| 9                     | Bs + 80 N (0:1)      | <i>Bacillus</i> Bs14 + Nitrógeno en forma de amonio                                |
| 10                    | Testigo              | Sin fertilización sintética y orgánica   |
| 11                    | 80 N (1:0)           | Nitrógeno en forma de nitratos   |
| 12                    | 80 N (0:1)           | Nitrógeno en forma de amonio   |

Rz= Cepa de *Rhizobium* CIIDIR 13; Bs= Aislamiento de *Bacillus* Bs 14; 80N= Dosis de Nitrógeno; Testigo= Sin inoculación y sin fertilización sintética.

Cada unidad experimental comprendió cuatro surcos de 10 metros de largo, dejando un espacio de dos metros para la separación entre bloques. La distribución de los tratamientos se hizo en base a un sorteo, quedando una repetición en cada bloque (Figura 6).

|         |     |    |    |   |   |   |   |   |    |    |   |    |    |
|---------|-----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|---|----|----|
| BLOQUES | III | 12 | 9  | 8 | 5 | 4 | 7 | 3 | 11 | 10 | 1 | 6  | 2  |
|         | II  | 10 | 5  | 9 | 4 | 2 | 7 | 6 | 8  | 11 | 1 | 3  | 12 |
|         | I   | 4  | 11 | 1 | 8 | 3 | 9 | 5 | 2  | 10 | 7 | 12 | 6  |

Figura 6. Distribución de tratamientos aplicados al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en campo con riego por goteo en un diseño de bloques completos al azar (BCA).

## 6.7 Aplicación de los Tratamientos

### 6.7.1 Fertilizantes químicos sintéticos

El fertilizante utilizado como fuente de nitratos, fue nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) y como fuente de amonio, sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Éstos se aplicaron de manera manual, a una profundidad de entre 15-20 cm y a una distancia de 15 cm de las plantas por el lado de la cinta de riego. Todo se hizo en base a la distribución de los tratamientos.

### 6.7.2 Preparación y aplicación de *Rhizobium*

Para el experimento de campo se usó la cepa CIIDIR 13, la cual fue previamente seleccionada en invernadero.

En un matraz de 1 L de capacidad se preparó medio de cultivo líquido ELMA, al cual se le inoculó la cepa CIIDIR 13 de *Rhizobium* y se sometió a agitación

mecánica (90 oscilaciones por minuto) durante 48 horas, para obtener una concentración aproximada de  $10^6$  ufc mL<sup>-1</sup>.

La aplicación del preparado microbiano se realizó de manera manual, con una bomba de mochila de 18 litros de capacidad y sin boquilla, a una profundidad de 15-20 cm y a una distancia de 15 cm de las plantas por el lado de la cinta de riego. Para los cálculos del volumen a aplicar se tomó en cuenta una dosis de 3 L ha<sup>-1</sup> y las dimensiones de cada unidad experimental.

### **6.7.3 Preparación y aplicación de *Bacillus* spp.**

En un matraz de 1 L de capacidad se preparó medio de cultivo Infusión Papa Dextrosa (IPD) líquido, y se inoculó el aislamiento Bs 14 de *Bacillus*, el cual fue el que resultó con mayor producción de biomasa plántulas de frijol en invernadero. El matraz se sometió a agitación mecánica (90 oscilaciones por minuto) durante 48 horas hasta obtener una concentración bacteriana aproximada de  $10^7$  ufc mL<sup>-1</sup>.

La aplicación se realizó de manera manual con una bomba de mochila de 18 litros de capacidad y sin boquilla, a una profundidad de 15-20 cm y a una distancia de 15 cm de las plantas, por el lado de la cinta de riego; Para los cálculos del volumen a aplicar se consideró una dosis de 6 L ha<sup>-1</sup> y las dimensiones de cada unidad experimental.

## **6.8 Variables Evaluadas**

### **6.8.1 Análisis foliar de nutrimentos**

Éste se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. El material vegetal se colectó en la etapa de floración, a los 50 dds y consistió en realizar un muestreo foliar, tomando 30 hojas trifoliadas de cada unidad experimental, las cuales se secaron en un horno de secado marca Felisa® a temperatura de 65 a 70°C por 72 horas. Las muestras secas se procesaron en un

molino eléctrico marca Thomas Scientific, con una malla de 40 cavidades, obteniendo un polvo fino, el cual se uso posteriormente para las digestiones.

Los elementos analizados fueron: nitrógeno total, fósforo, potasio, calcio, magnesio y microelementos (Fe, Zn, Mn y Cu)

### **6.8.1.1 Nitrógeno total (NT)**

#### **6.8.1.1.1 Digestión húmeda de la muestra**

La determinación de éste elemento se realizó por el **método Kjeldahl**. La digestión húmeda consistió en colocar 0.1 g de muestra en un matraz Kjeldahl, al cual se le adicionó 1.5 mL de una mezcla de ácidos (sulfúrico-salicílico). Se agitó para homogenizar el material con los ácidos y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente se adicionaron 0.2 g de una mezcla de sulfatos ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , selenio metálico y  $\text{CuSO}_4$ ).

Se colocó la mezcla total en un digestor marca Labconco® con capacidad para 6 matraces; se calentó ligeramente a una temperatura controlada por 5 minutos; posteriormente se aumentó la temperatura hasta observar el vire de color de la muestra de negro a verde oscuro (temperatura no mayor de 360°C).

Una vez que la solución presentó una coloración verde clara (aspecto acuoso), se continuó calentando por 1 hora más hasta obtener un volumen aproximado de 3 mL. Finalmente se dejaron enfriar las muestras digeridas y se agregó 10 mL de agua destilada. Por último las digestiones fueron transferidas a tubos Falcon de 25 mL.

#### **6.8.1.1.2 Determinación de nitrógeno total**

La solución digerida se transfirió al equipo de destilación, se adicionaron 10 mL de NaOH al 50% y se inicio el calentamiento. El destilado se recibió en 20 mL de solución de ácido bórico al 4% más 0.2 mL del indicador verde de bromocresol-rojo

de metilo, hasta alcanzar un volumen aproximado de 50 mL a la salida del refrigerante. Posteriormente, se llevo a cabo la titulación de cada muestra con la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 Normal (N), hasta alcanzar un color rosa. Al mismo tiempo se realizó la titulación a una muestra blanco, anotando los mililitros gastados en cada muestra para realizar los cálculos correspondientes, mediante la siguiente fórmula:

$$\%NT = (\text{mL H}_2\text{SO}_4 \times N \text{ del H}_2\text{SO}_4 \times 1.4) / \text{g. de la muestra}$$

### 6.8.1.2 Fósforo (P)

#### 6.8.1.2.1 Digestión húmeda de la muestra

Se llevo a cabo mediante el método Kjeldahl y consistió en el siguiente procedimiento: se colocaron 0.5 g de muestra en un matraz Kjeldahl de 50 mL, a éste se adicionaron 10 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado y se dejó reposar por 30 minutos. Seguido de esto, se agregaron 1.5 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) más 2.0 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ambos concentrados, y se pusieron a la plancha de digestión a baja temperatura para lograr una oxidación completa por la acción del HNO<sub>3</sub>. Después se aumentó la temperatura, sin exceder los 360°C, teniendo cuidado de que las muestras no se evaporaran totalmente. La digestión se considero completa cuando la solución presentó un color totalmente cristalino, con un volumen final entre 1.5 y 3.0 mL.

Los digestados fueron transferidos a matraces volumétricos de 25 mL, los cuales se aforaron con agua des ionizada; después de esto, se mezcló el contenido de cada matraz y se filtro con papel Whatman No. 42. El filtrado se guardo en frascos de vidrio, los cuales fueron sellados con parafilm para evitar la evaporación de los ácidos; posteriormente se llevo a cabo la dilución correspondiente para su lectura.

#### 6.8.1.2.2 Determinación de fósforo

Se transfirió una alícuota de 1 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 25 mL, mediante el método de Vanadato-Molibdato amarillo. Posteriormente se

agregaron 0.5 mL de ácido nítrico (1:2 de agua destilada), 05 mL de solución de vanadato de amonio y 0.5 mL de solución de molibdato de amonio. Después de agregados los reactivos a la solución de filtrado, se aforo con agua destilada a la marca de 25 mL, se agito y se dejo reposar por 30 minutos. Al transcurrir ese tiempo, se transfirió la solución a tubos de colorímetro y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de luz UV visible a 470 nm. La concentración de fosforo se determino mediante una curva de calibración en un intervalo de 0 a 25 ppm.

### 6.8.1.3 Potasio (K)

#### 6.8.1.3.1 Determinación de potasio

Los materiales filtrados obtenidos mediante la digestión húmeda para fósforo, también se utilizaron para la determinación de potasio. Para ello, se transfirió 1 mL de la solución a matraces volumétricos de 50 mL, los cuales fueron aforados con agua destilada. De ésta solución se tomo directamente la lectura de las muestras en porcentaje de transmitancia.

Se utilizó el método de emisión de llama-flamometría (flamometro marca Buck Scientific modelo PFP-7). Previo a la lectura, el equipo fue ajustado con las curvas de calibración 5, 15, 20, 25 y 30 ppm con longitudes de onda de 766.5 nm. Los cálculos se hicieron en base a la curva de calibración obtenida tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\%K = \frac{\text{Lectura de transmitancia} \times \text{Vol. Digestión} \times \text{Vol. Dilución}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

#### 6.8.1.4 Calcio (Ca) y magnesio (Mg)

##### 6.8.1.4.1 Determinación de calcio y magnesio.

A partir de la digestión obtenida para la determinación de fósforo, se colocaron alícuotas de 1 mL en matraces volumétricos de 25 mL, los cuales se aforaron con agua destilada. De ésta solución se realizó una segunda dilución, la cual consistió en colocar alícuotas de 1 mL en matraces volumétricos de 10 mL, a los cuales se agregó 1 mL de reactivo de óxido de lantano y se llevó al volumen final con agua destilada. Se mezclaron perfectamente y después se realizaron los ajustes correspondientes al equipo espectrofotómetro de absorción atómica (Spectr AA, 50B, marca Varian®) tomando en cuenta la escala de absorbancia. Las muestras tuvieron una dilución tal, que permitió ajustarlas dentro de la curva de calibración, para calcio fue de 0-10 ppm y para magnesio fue de 0-1 ppm. Los cálculos se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$\%Ca \text{ y } Mg = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Vol. Digestión} \times \text{Vol. Dilución}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

#### 6.8.1.5 Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn) y Cobre (Cu)

##### 6.8.1.5.1 Determinación de hierro, manganeso, zinc y cobre.

De la misma solución proveniente de la digestión húmeda realizada para la determinación de fósforo, se filtró y se procedió a tomar directamente (sin realizar diluciones) las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica, previo a ello se utilizó una curva de calibración con las concentraciones siguientes: para (Fe) se utilizó de 1-10 ppm, Mn de 1-10 ppm, Cu de 1-5 ppm y para Zn se utilizó la concentración de 0.1-1.3 ppm. Los cálculos se efectuaron mediante las curvas de calibración, utilizando un factor obtenido de la pendiente, considerando siempre las diluciones hechas durante la determinación de cada micronutriente, y se obtuvieron los resultados en base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Fe, Mn, Cu y Zn} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Vol. Digestión}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

### 6.8.2.1 Peso seco de follaje

Del área útil de cada unidad experimental se seleccionó una planta completa (tallos, hojas y vainas), excluyendo la raíz. El material vegetal se llevó al horno de secado a temperatura de 65 a 70°C por 48 horas; posteriormente se midió la variable peso seco de follaje (PSF) con el uso de una balanza analítica marca Scout pro® con capacidad de hasta de 200 g.

### 6.8.2.2 Número de nódulos por planta

En la etapa reproductiva (80 dds), se seleccionó una planta de cada unidad experimental con el objetivo de realizar el muestreo de nódulos; éste consistió en extraer el sistema radicular con todo y cepellón a una profundidad aproximada de 15 cm, con el uso de una pala. Posteriormente, las raíces con el suelo adherido se introdujeron en un recipiente con agua, con el fin de desprender el suelo, teniendo cuidado de que los nódulos no se desprendieran. Para cada planta se realizó el conteo del número de nódulos (NN) (Figura 7).



Figura 7. Nódulos formados en raíces de plantas de frijol variedad azufrado higuera.

### 6.8.2.3 Peso seco de nódulos

Después de coleccionar los nódulos de cada planta, éstos se etiquetaron de acuerdo a su tratamiento correspondiente y se llevaron al horno de secado marca flisa®, en donde se mantuvieron a temperatura de 65 a 70°C por 48 horas; finalmente se tomo la variable peso seco de nódulos (PSN) con el uso de una balanza analítica.

### 6.8.2.4 Rendimiento de grano

La cosecha se realizó de manera anticipada por la presencia de un fenómeno ambiental (helada) que se presentó en la etapa final de la maduración del grano, la cual afectó de manera uniforme la calidad del grano y el rendimiento de todos los tratamientos en el experimento.

La cosecha se realizó el día 18 de Febrero del 2011 y se hizo de manera manual. En cada unidad experimental se consideró como parcela útil los dos surcos centrales, a los cuales se les eliminó los dos primeros metros en cada orilla (quedando finalmente, como parcela útil, dos surcos de seis metros de largo en cada unidad experimental), esto con el objetivo de disminuir posibles contaminaciones entre tratamientos y eliminar el efecto de orilla (Figura 8).



Figura 8. Cosecha de frijol variedad azufrado higuera bajo riego por goteo.

El peso del grano cosechado en cada unidad experimental se obtuvo con el uso de una balanza granataria.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Muestreo y Aislamiento de *Rhizobium*

Se obtuvo un total de 15 aislamientos de *Rhizobium* a partir de nódulos de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de diferentes regiones del norte de Sinaloa, lo que indica que éstos microorganismos están adaptados a las condiciones ambientales y al tipo de suelo que predomina en el norte del Estado.

### 7.2 Etapa de Invernadero

#### 7.2.1 Selección de cepas nativas de *Rhizobium* en invernadero

##### 7.2.1.1 Altura de planta y peso seco de follaje

El mayor valor de altura de planta (54.6 cm) se encontró en el tratamiento inoculado con la cepa CIIDIR 13, lo cual superó estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) a los tratamientos CIIDIR 9, CIIDIR 12, CIIDIR 14, CIIDIR 15 y al testigo. El testigo presentó el valor más bajo de ésta variable con un promedio de 23.66 cm y únicamente tuvo diferencias estadísticas significativas con los tratamientos CIIDIR 13 y CIIDIR 7 (Figura 9 y Figura 10).

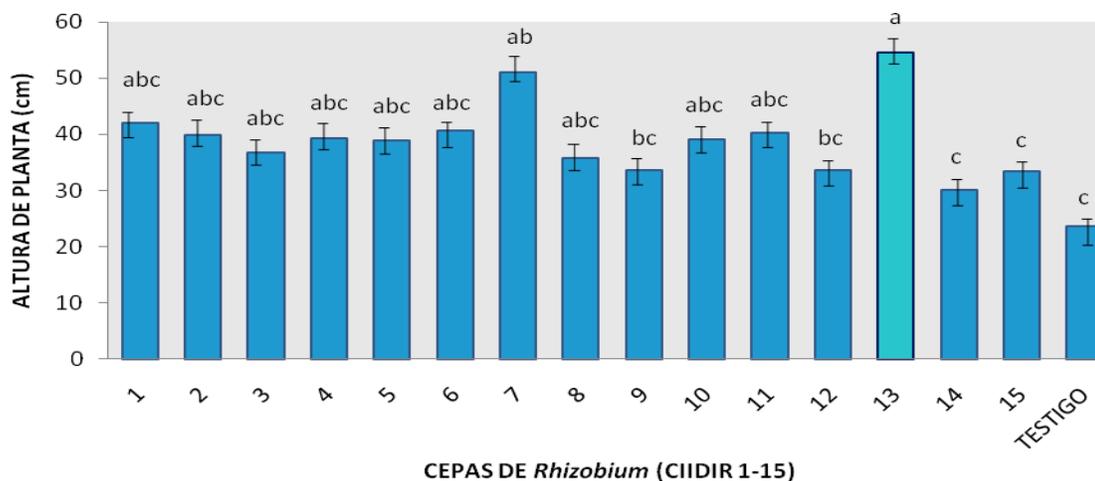


Figura 9. Medias de la variable altura de planta en frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium* en invernadero. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



Figura 10. Comparación entre una planta inoculada con la cepa CIIDIR 13 de *Rhizobium* y testigo.

En lo que respecta a peso seco de follaje (PSF) (tallos y hojas), el tratamiento inoculado con la cepa CIIDIR 13 de *Rhizobium* fue el que presentó el valor más alto (3.4 g) y superó estadísticamente a los tratamientos (CIIDIR 1, CIIDIR 3, CIIDIR 4, CIIDIR 5, CIIDIR 8, CIIDIR 9, CIIDIR 12, CIIDIR 14, CIIDIR 15 y testigo) como se puede observar en la Figura 11; lo anterior significa que las cepas de *Rhizobium* actuaron de manera diferente en la promoción de crecimiento de plántulas de frijol, resultados similares fueron reportados por Mora, (1995) y en el cultivo de soya en condiciones de campo (Appunu *et al.*, 2008).

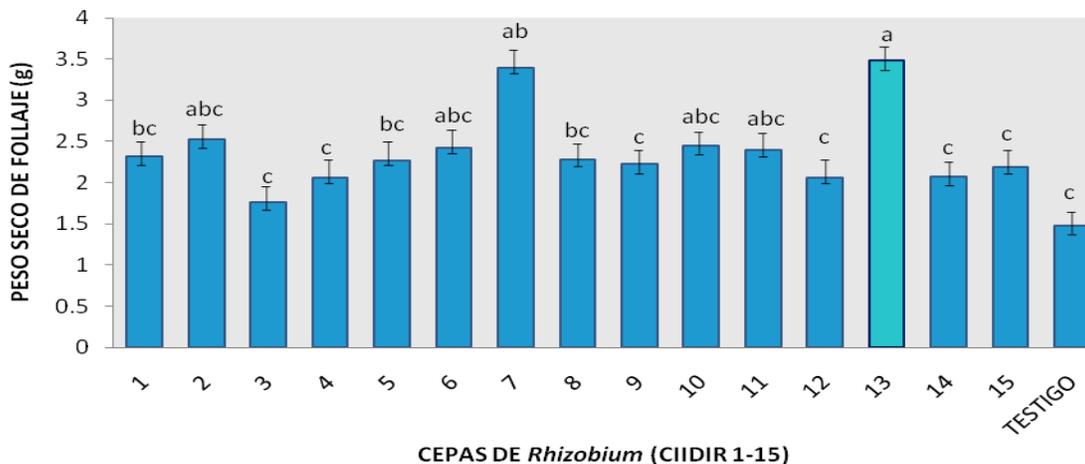


Figura 11. Medias de la variable peso seco de follaje de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium* en invernadero. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 7.2.1.2 Volumen de raíces, número de nódulos por planta y peso seco de nódulos

Para la variable volumen de raíces no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ); sin embargo, el testigo fue el que tuvo el valor más bajo (17.33 mL) en comparación con las 15 cepas de *Rhizobium* evaluadas.

En cuanto a número de nódulos por planta, la cepa de *Rhizobium* CIIDIR 13 no presentó los valores más altos, ya que fueron los tratamientos inoculados con las cepas (CIIDIR 1, CIIDIR2, CIIDIR 7 y CIIDIR 12) los que obtuvieron la mayor nodulación. En el caso del tratamiento testigo, se presentó nódulos únicamente en una de las repeticiones (cinco nódulos), lo cual representó un promedio de 1.66 nódulos por planta, y se atribuye a la solarización del sustrato utilizado en el experimento de invernadero.

Investigaciones previas sugieren que la variable número de nódulos por planta no es la más adecuada para definir la eficiencia de fijación de nitrógeno en una asociación *Rhizobium*-Leguminosa y que las mejores asociaciones deben definirse en base a otros parámetros (Hefny *et al.*, 2001).

Para el peso seco de nódulos (variable relacionada con el contenido de leghemoglobina en los nódulos y con la eficiencia de fijación de nitrógeno en leguminosas) no se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre *Rhizobium* CIIDIR 13 (0.16 g) y las cepas que presentaron mayor nodulación (CIIDIR 1, CIIDIR2, CIIDIR 7 y CIIDIR 12) (Cuadro 2). Lo que significa que la cepa de *Rhizobium* CIIDIR 13 presentó el mayor peso seco por nódulos (0.00148 g), por lo tanto es una cepa con características de eficiencia en el proceso de FBN en frijol (Johnson y Hume, 1973); éstos resultados indican que existe variación en la efectividad o capacidad para fijar nitrógeno atmosférico entre algunas cepas de *Rhizobium* y coincide con lo reportado por (Mora, 1995).

El valor más bajo de peso seco de nódulos se presentó en el testigo, lo cual se debe a que fueron pocos nódulos y de tamaño muy pequeño en comparación con los nódulos formados en los demás tratamientos.

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de cepas de *Rhizobium* en el volumen de raíces (VR), número de nódulos por planta (NN) y peso seco de nódulos (PSN) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

| CEPAS DE <i>Rhizobium</i> (CIIDIR 1-15) | VR (mL)         | NN              | PSN (g)           |
|---|-----------------|-----------------|-------------------|
| 1                                       | 29.66 ab        | 435 a           | 0.25 abcd         |
| 2                                       | 47 a            | 408 a           | 0.26 abc          |
| 3                                       | 38.66 ab        | 230.33 abcd     | 0.08 abcde        |
| 4                                       | 24.66 ab        | 129.67 bcd      | 0.03 e            |
| 5                                       | 42.33 ab        | 156 bcd         | 0.09 abcde        |
| 6                                       | 30.66 ab        | 235 abcd        | 0.03 de           |
| 7                                       | <b>35.66 ab</b> | <b>409 a</b>    | <b>0.28 ab</b>    |
| 8                                       | 33.33 ab        | 52.67 cd        | 0.05 cde          |
| 9                                       | 21.33 ab        | 269.33 abc      | 0.30 a            |
| 10                                      | 38.66 ab        | 116.67 bcd      | 0.03 e            |
| 11                                      | 35.66 ab        | 308.67 ab       | 0.16 abcde        |
| 12                                      | 35.33 ab        | 405.33 a        | 0.11 abcde        |
| 13                                      | <b>31.66 ab</b> | <b>107.67 d</b> | <b>0.16 abcde</b> |
| 14                                      | 27 ab           | 89 bcd          | 0.03 e            |
| 15                                      | 22.33 ab        | 236.33 abcd     | 0.06 bcde         |
| <b>TESTIGO</b>                          | 17.33 ab        | 1.66 d          | 0.00 e            |

Medias con letras iguales en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey ( $P \leq 0.05$ )

La cepa de *Rhizobium* CIIDIR 13 fue la que presentó la mayor capacidad de fijación de nitrógeno en plántulas de frijol, además de presentar la mayor altura de plantas y peso seco de follaje; por lo tanto, ésta cepa fue elegida para ser usada en el experimento de campo.

## 7.2.2 Selección de aislamientos nativos de *Bacillus* spp. en invernadero

### 7.2.2.1 Altura de planta y peso seco de follaje

El valor más alto en altura de planta se obtuvo con el tratamiento BS 29 (45.66 cm), el cual superó estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) a los tratamientos Bs 31 y testigo. El tratamiento testigo presentó los valores más bajo de altura de planta (29.83 cm) (Figura 12).

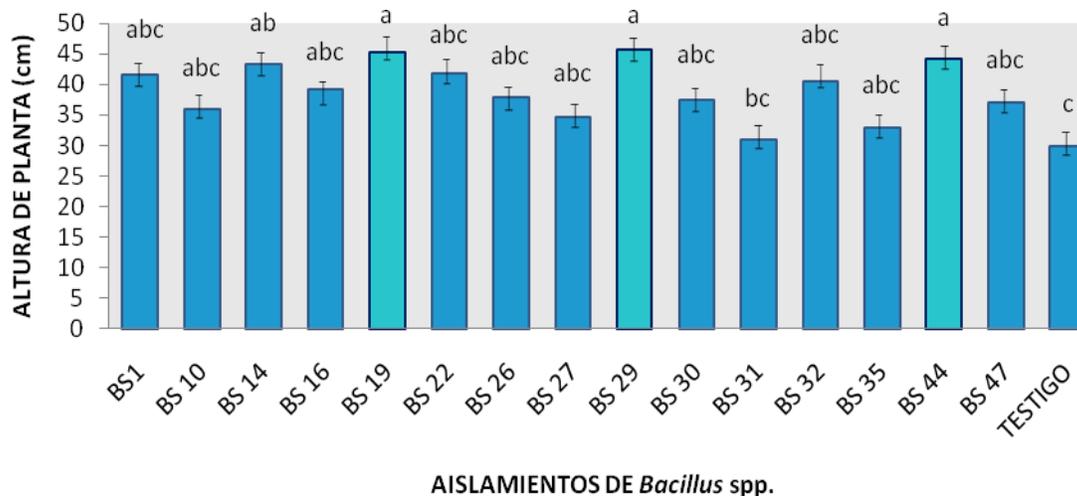


Figura 12. Medias de la variable altura de planta en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con diferentes aislamientos de *Bacillus* spp en invernadero. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Para la variable peso seco de follaje (PSF) (tallos y hojas), se encontró que la mayor acumulación de materia seca de la parte aérea fue obtenida con el tratamiento BS14 (2.63 g) y superó estadísticamente al tratamiento Bs 31 (1.49 g) y al testigo (1.50 g) ( $p \leq 0.05$ ), los cuales presentaron los valores más bajos de PSF (Figura 13).

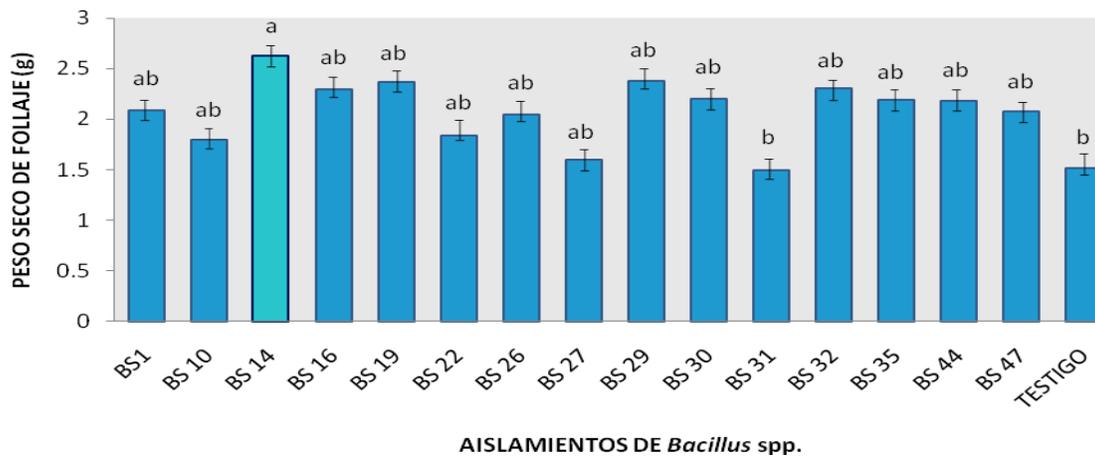


Figura 13. Medias de la variable peso seco de follaje de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con diferentes aislamientos de *Bacillus* spp en invernadero. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en éste experimento coinciden con lo reportado por algunos autores como Arkhipova *et al.* (2005) y Kaymak *et al.* (2008), quienes encontraron efectos positivos de bacterias del género *Bacillus* al promover el crecimiento de plantas no leguminosas, en comparación con los tratamientos control, sin inoculación; lo cual se debe a la capacidad de éstas bacterias de promover el crecimiento vegetal mediante mecanismos como la síntesis de hormonas vegetales y solubilización de nutrientes (Rodríguez y Fraga, 1999; Vazquez *et al.*, 2000).

### 7.2.2.2 Volumen de raíces y Diámetro de tallo

Los resultados de éste experimento no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para la variable volumen de raíces. Sin embargo, cabe resaltar que el tratamiento Bs 14 fue el que tuvo el mayor valor de ésta variable.

Para diámetro de tallo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de aislamientos de *Bacillus* spp en el volumen de raíces (VR) y diámetro de tallos en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en invernadero.

| AISLAMIENTOS DE <i>Bacillus</i> spp. (Códigos BS) | VR (mL)       | DT (cm)       |
|---|---------------|---------------|
| 1   | 14 a          | 0.34 a        |
| 10  | 16 a          | 0.3 a         |
| 14  | <b>25.5 a</b> | <b>0.37 a</b> |
| 16  | 15 a          | 0.35 a        |
| 19  | 18.34 a       | 0.33 a        |
| 22  | 16.34 a       | 0.39 a        |
| 26  | 20 a          | 0.37 a        |
| 27  | 14 a          | 0.31 a        |
| 29  | 22.67 a       | 0.34 a        |
| 30  | 18.34 a       | 0.33 a        |
| 31  | 13.34 a       | 0.3 a         |
| 32  | 16.34 a       | 0.32 a        |
| 35  | 22.34 a       | 0.35 a        |
| 44  | 23.34 a       | 0.35 a        |
| 47  | 24.67 a       | 0.37 a        |
| TESTIGO   | 22.34 a       | 0.33 a        |

Medias con letras iguales en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

El tratamiento Bs 14 fue el que presentó la mayor capacidad de promover el crecimiento de plántulas de frijol, debido a que se ubicó en los valores más altos de altura de planta y presentó el mayor valor de PSF; por lo tanto, éste aislamiento (Bs 14) fue elegido para ser usado en el experimento de campo.

## 7.3 Trabajo de Campo

### 7.3.1 Propiedades físicas y químicas del suelo

El resultado del análisis de suelos indicó que se trata de un suelo de textura media (de fácil laboreo), con pH neutro, sin problemas de sales (CE inferior a dos mmhos  $\text{cm}^{-1}$ ), con bajo contenido de materia orgánica (como es el caso de la mayoría de los suelos de la región), con alto contenido de fósforo, potasio, calcio y magnesio (Cuadro 4).

En cuanto al contenido de elementos menores (Hierro, Cobre, Zinc y Manganeso), el suelo contenía las cantidades necesarias para el buen desarrollo del cultivo y para el establecimiento de una fijación simbiótica de nitrógeno adecuada, ya que ésta puede ser afectada por la ausencia de alguno de éstos nutrimentos (Daza *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Características físicas y químicas del suelo del área experimental del CIIDIR Sinaloa, ubicado en el municipio de Guasave, Sinaloa, México.

| Determinación    | Resultado                   |
|------------------|-----------------------------|
| Materia orgánica | 0.80 %                      |
| pH               | 7.1                         |
| CE               | 1.73 mmhos $\text{cm}^{-1}$ |
| Fosforo (P)      | 22.90 ppm                   |
| Textura          | FRANCO-LIMOSO               |
| Potasio (K)      | 0.84 Cmol $\text{kg}^{-1}$  |
| Calcio (Ca)      | 33.25 Cmol $\text{kg}^{-1}$ |
| Magnesio (Mg)    | 8.64 Cmol $\text{kg}^{-1}$  |
| Sodio (Na)       | 2.0 Cmol $\text{kg}^{-1}$   |
| Hierro (Fe)      | 5.63 ppm                    |
| Cobre (Cu)       | 4.87 ppm                    |
| Cinc (Zn)        | 2.13 ppm                    |
| Manganeso (Mn)   | 0.85 ppm                    |

### 7.3.2 Análisis foliar de nutrimentos

#### 7.3.2.1 Concentración de nitrógeno total

Las mayores concentraciones foliares de nitrógeno se encontraron en los tratamientos *Rz+Bs* (*Rhizobium* CIIDIR 13 + *Bacillus* Bs 14) (4.43%) y *Rz+Bs+80N(1:0)* (*Rhizobium* CIIDIR 13 + *Bacillus* Bs 14 + 80 kg de N ha<sup>-1</sup> en forma de nitratos) (4.86%); los cuales superaron estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) al testigo (1.91%) (Figura 14).

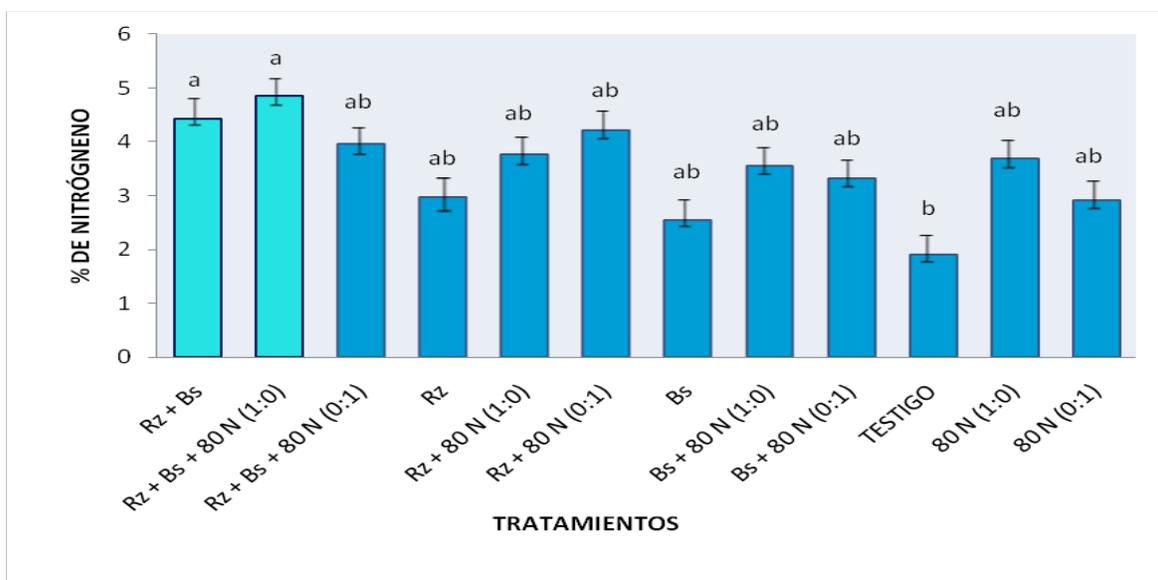


Figura 14. Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de nitrógeno total en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

El valor más bajo de concentración foliar de nitrógeno se presentó en el testigo (1.91 %).

En trabajos previos llevados a cabo a nivel de invernadero, se ha reportado que la combinación de BPCV con *Rhizobium* incrementó el contenido de nitrógeno en plantas de frijol, en comparación con la aplicación individual de *Rhizobium* (Stajković *et al.*, 2011); por otro lado (Figueiredo *et al.*, 2008) encontraron resultados contrastantes al estudiar el efecto de algunas BPCV en inoculación combinada con *Rhizobium* en el cultivo de frijol en condiciones de invernadero, ya que las co-

inoculaciones no superaron estadísticamente en acumulación foliar de nitrógeno a la inoculación individual de *Rhizobium*.

Un aspecto muy importante a considerar es que se ha encontrado que algunas cepas, tanto de *Rhizobium* como de *Bacillus*, presentan producción de sideróforos (Carson *et al.*, 2000; Wahyudi *et al.*, 2011), compuestos relacionados con la disponibilidad de Fe para las plantas y que influyen de manera positiva con la eficiencia de fijación de nitrógeno en leguminosas (Duhan *et al.*, 1998).

### 7.3.2.2 Fósforo (P)

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el tratamiento Bs+80 N (1:0) (*Bacillus* Bs 14 + nitrógeno en forma de nitratos) y el testigo. La mayor concentración de fósforo se presentó al aplicar el tratamiento Bs+80 N (1:0) con un promedio de 0.46%.

A pesar de que el suelo contenía cantidades elevadas de fósforo, la concentración foliar más baja de éste nutriente se presentó en el tratamiento testigo (0.29%) (Figura 15); lo cual puede atribuirse a que el fósforo es un elemento que reacciona fácilmente con el calcio en un medio alcalino, formando fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), compuesto insoluble que limita la disponibilidad del fósforo para las plantas. En los tratamientos en donde se aplicó *Bacillus* y que presentaron valores altos de concentración foliar de P, se atribuye a la capacidad que tienen éstas bacterias de solubilizar fosfatos inorgánicos, mediante la producción de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999; Vázquez *et al.*, 2000).

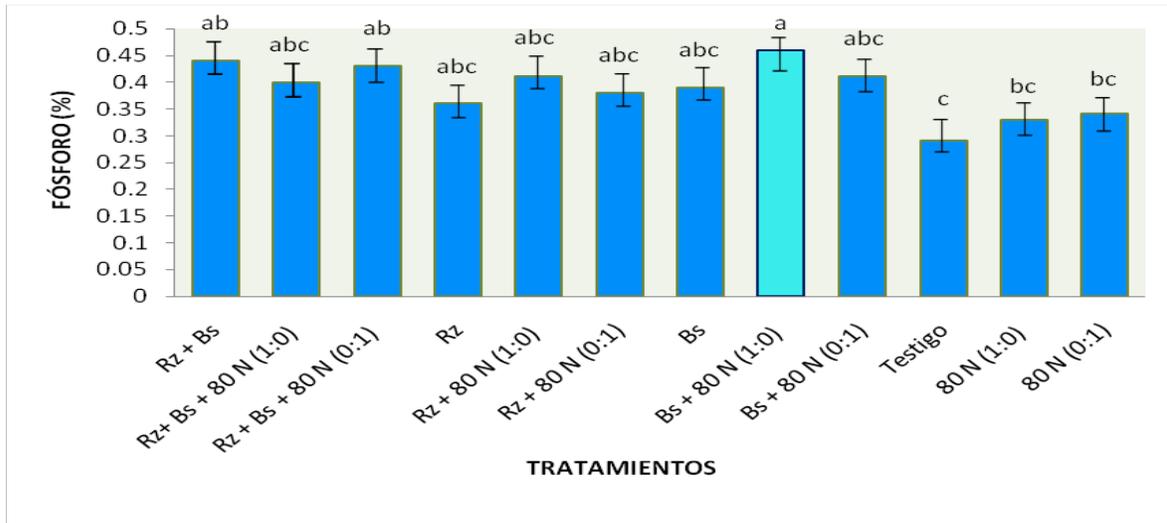


Figura 15. Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de fósforo en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### 7.3.2.3 Potasio (K)

La mayor concentración foliar de potasio se encontró al aplicar el tratamiento Bs+80N(1:0) (7.88%); el cual superó estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) a otros tratamientos, excepto al testigo (Figura 16).

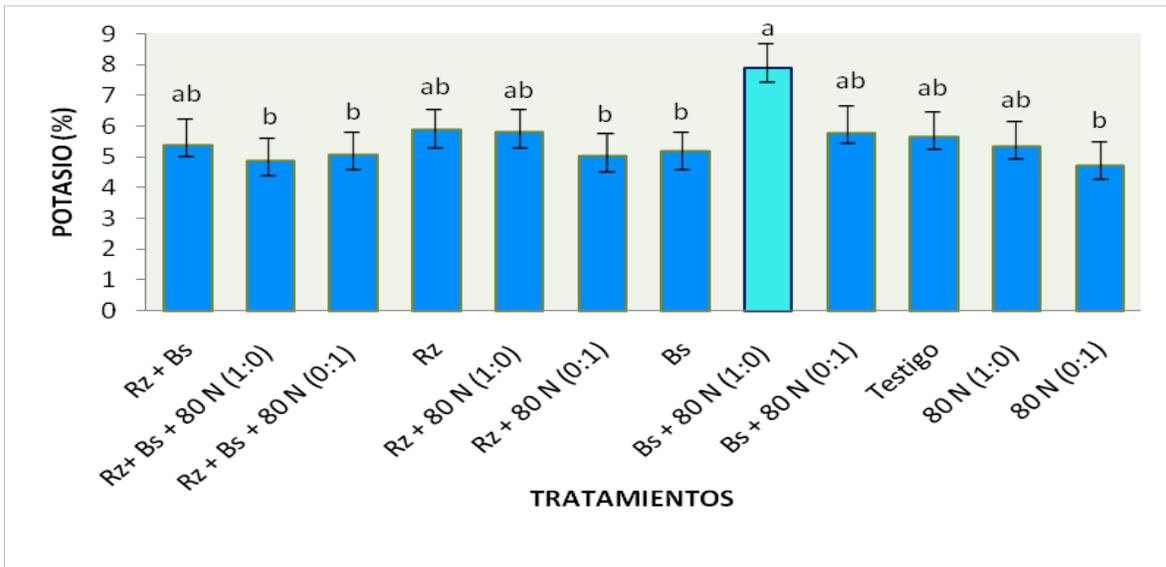


Figura 16. Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la concentración foliar de potasio en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

La aplicación de nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), afectó negativamente a la concentración de potasio en el follaje, lo cual se debe al antagonismo entre cationes (Causin y Arnozis, 1988; Guo *et al.*, 2007).

#### **7.3.2.4 Calcio, magnesio y microelementos (hierro, zinc, manganeso y cobre)**

La mayor concentración foliar de calcio se encontró con el tratamiento *Rz+Bs+80N(1:0)* (4.62%); en contraste, éste valor no superó estadísticamente al testigo (2.71%), lo cual se atribuye a que el suelo en el que se estableció el experimento contenía cantidades suficientes de calcio para abastecer las necesidades del cultivo. En magnesio, el valor más alto se obtuvo en el tratamiento *Rz+Bs* (1.19 %).

Para el caso del hierro (Fe), el valor más alto (524.83 ppm) se encontró en el tratamiento *Rz+Bs+80N(1:0)* y no superó estadísticamente al tratamiento *Rz+Bs* (501.71 ppm). Los valores más bajos de Fe correspondieron al testigo y a los tratamientos *80N(1:0)* y *80N(0:1)*; lo anterior se atribuye a que algunas cepas de *Rhizobium* (Rossum *et al.*, 1994; Carson *et al.*, 2000) y algunas especies de *Bacillus* (Wilson *et al.*, 2010; Wahyudi *et al.*, 2011) han demostrado ser capaces de producir compuestos sideróforos, los cuales incrementan la disponibilidad de hierro para las plantas.

Para Zinc, Manganeso y Cobre, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos (fertilización química sintética, fertilización biológica y la combinación de ambos) en la concentración foliar de calcio (%), magnesio (%), hierro (ppm), zinc (ppm), manganeso (ppm) y cobre (ppm) en las plantas de frijol variedad azufrado higuera en condiciones de campo.

| TRATAMIENTOS                | Ca (%)  | Mg (%)  | Fe (ppm)  | Zn (ppm) | Mn (ppm) | Cu (ppm) |
|-----------------------------|---------|---------|-----------|----------|----------|----------|
| <i>Rz + Bs</i>              | 2.68 ab | 1.91 a  | 501.71 ab | 16.34 a  | 37.00 a  | 9.16 a   |
| <i>Rz + Bs + 80 N (1:0)</i> | 4.62 a  | 1.42 ab | 524.83 a  | 14.90 a  | 39.69 a  | 8.44 a   |
| <i>Rz + Bs + 80 N (0:1)</i> | 1.21 b  | 1.15 b  | 374.67 bc | 18.60 a  | 41.91 a  | 9.88 a   |
| <i>Rz</i>                   | 3.32 ab | 1.49 ab | 268.24 c  | 17.36 a  | 46.88 a  | 9.34 a   |
| <i>Rz + 80 N (1:0)</i>      | 1.81 ab | 1.20 b  | 331.25 c  | 19.45 a  | 41.95 a  | 8.40 a   |
| <i>Rz + 80 N (0:1)</i>      | 1.84 ab | 1.34 b  | 285.93 c  | 22.65 a  | 47.37 a  | 6.95 a   |
| <i>Bs</i>                   | 2.23 ab | 1.24 b  | 363.87 bc | 20.53 a  | 48.29 a  | 9.49 a   |
| <i>Bs + 80 N (1:0)</i>      | 1.64 b  | 1.29 b  | 369.12 bc | 20.11 a  | 41.92 a  | 10.97 a  |
| <i>Bs + 80 N (0:1)</i>      | 1.96 ab | 1.14 b  | 289.34 c  | 22.16 a  | 53.52 a  | 6.88 a   |
| Testigo                     | 2.71 ab | 1.51 ab | 261.36 c  | 17.45 a  | 43.61 a  | 10.31 a  |
| 80 N (1:0)                  | 2.44 ab | 1.34 b  | 231.75 c  | 17.07 a  | 47.63 a  | 9.34 a   |
| 80 N (0:1)                  | 2.44 ab | 1.54 ab | 256.75 c  | 17.07 a  | 51.45 a  | 7.95 a   |

Medias con letras iguales en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 7.3.3.1 Peso seco de follaje

En el tratamiento *Rz+Bs* se obtuvo la mayor producción de biomasa foliar con un promedio de 50.19 g, lo cual superó estadísticamente al testigo (26.04 g) y a los tratamientos *Rz+80N(0:1)* (32.343 g) y *80N(0:1)* (31.003 g) (Figura 17).

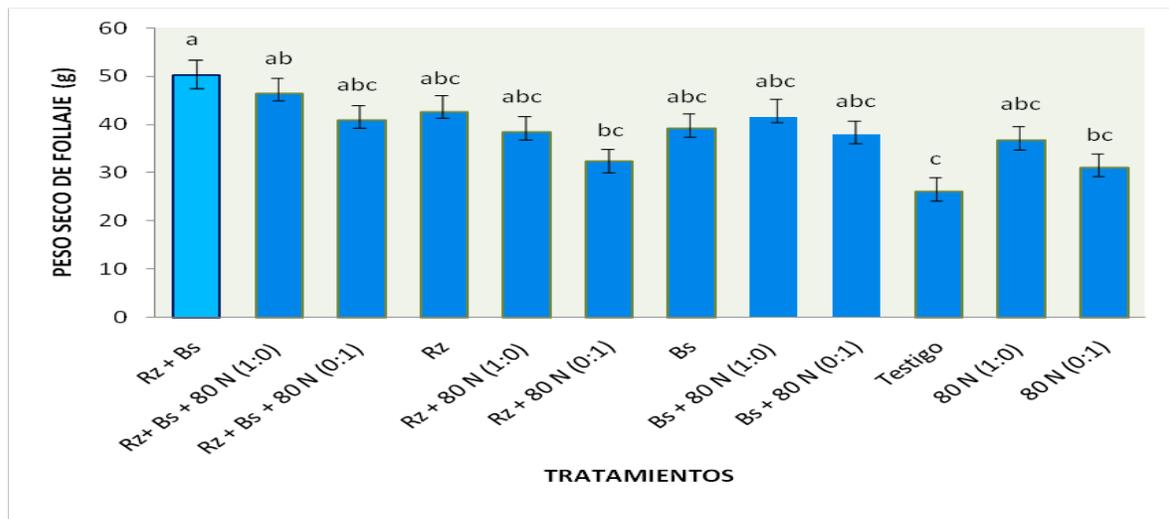


Figura 17. Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre materia seca de follaje en el cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

El valor más bajo de PSF se presentó en el testigo y fue superado estadísticamente por los tratamientos *Rz+Bs* y *Rz+Bs+80N(1:0)*.

Stajković *et al.* (2011) reportaron resultados similares en la producción de biomasa foliar en plantas de frijol al ser inoculadas con *Rhizobium phaseoli* más *Pseudomonas* o *Rhizobium phaseoli* más *Bacillus* spp en condiciones de invernadero. además, algunos autores han citado que cepas de *Rhizobium* y *Bacillus* son capaces de sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal (fitohormonas), las cuales estimulan el crecimiento de las plantas, incrementando la toma de agua y nutrientes, lo que se traduce a una mayor producción de biomasa aérea (Arkhipova *et al.*, 2005; Etesami *et al.*, 2009).

### 7.3.3.2 Número de nódulos por planta y peso seco de nódulos

El tratamiento *Rz* (*Rhizobium* CIIDIR 14) presentó el mayor número de nódulos por planta (31.33) y no presentó diferencias significativas con el tratamiento *Rz+Bs* (29.33); sin embargo, ambos superaron estadísticamente a los demás tratamientos. En éste experimento, la fertilización nitrogenada afectó negativamente la formación de nódulos y coincide con lo reportado por Buttery *et al.* (1986); el

tratamiento sin fertilización nitrogenada y sin inoculación (testigo) presentó muy baja nodulación (0.33) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medias de las variables número de nódulos por planta y peso seco de nódulos de plantas de frijol variedad azufrado higuera en condiciones de campo, bajo riego por goteo.

| TRATAMIENTO                 | NÚMERO DE NÓDULOS POR PLANTA | PESO SECO DE NÓDULOS (g) |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>Rz + Bs</i>              | 29.33 a                      | 0.016 a                  |
| <i>Rz + Bs + 80 N (1:0)</i> | 8.00 b                       | 0.002 c                  |
| <i>Rz + Bs + 80 N (0:1)</i> | 2.00 b                       | 0.0006 c                 |
| <i>Rz</i>                   | 31.33 a                      | 0.010 b                  |
| <i>Rz + 80 N (1:0)</i>      | 3.33 b                       | 0.0006 c                 |
| <i>Rz + 80 N (0:1)</i>      | 1.00 b                       | 0.00 c                   |
| <i>Bs</i>                   | 0.00 b                       | 0.00 c                   |
| <i>Bs + 80 N (1:0)</i>      | 0.00 b                       | 0.00 c                   |
| <i>Bs + 80 N (0:1)</i>      | 1.00 b                       | 0.001 c                  |
| Testigo                     | 0.33 b                       | 0.00 c                   |
| 80 N (1:0)                  | 0.00 b                       | 0.00 c                   |
| 80 N (0:1)                  | 0.00 b                       | 0.00 c                   |

Medias con letras iguales en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Los tratamientos con *Bacillus* no incrementaron la nodulación; sin embargo, existen reportes en los que la inoculación de *Bacillus* spp. incrementa el número de nódulos por planta en frijol, que previamente habían sido inoculadas con *Rhizobium tropici* (Camacho *et al.*, 2001), resultados similares se encontraron en alfalfa (Stajković *et al.*, 2009). En general, el efecto de las BPCV sobre la nodulación depende de muchos factores en los cuales se involucra a las cepas usadas, la especie vegetal y variedad, y las condiciones ambientales.

La variable peso seco de nódulos, se incrementó significativamente en el tratamiento *Rz+Bs* (0.016 g) con respecto al tratamiento *Rz* (0.010) ( $p \leq 0.05$ ); es

importante mencionar que existe una alta relación entre el peso seco de nódulos y el contenido de la proteína leghemoglobina en éstos, por lo que éste parámetro se relaciona con el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno (Huang *et al.*, 1988).

Los nódulos obtenidos en el tratamiento *Rz+Bs* presentaron el mayor peso seco unitario (0.00054 g) en comparación con el peso seco de los nódulos en el tratamiento *Rz* (0.00031 g).

Aún se desconoce con certeza sobre los mecanismos específicos que están involucrados en la inoculación de BPCV y *Rhizobium* al incrementar la fijación simbiótica de nitrógeno; sin embargo, son atribuidos efectos particulares como la inhibición del crecimiento de fito-patógenos, la capacidad de solubilizar fosfatos y de sintetizar hormonas vegetales lo cual permite un adecuado establecimiento de los rizobios en la zona de la rizosfera e incrementa la disponibilidad de nutrientes tanto para éstos microorganismos, como para las plantas hospederas (Camacho *et al.*, 2001); además, existen hipótesis de que algunos mecanismos como la producción de metabolitos del tipo sideróforos, fitoalexinas y flavonoides pueden mejorar la formación de nódulos en leguminosas (García *et al.*, 2004).

### 7.3.3.3 Rendimiento de grano

Se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). El tratamiento *Rz+Bs* presentó el mayor rendimiento de grano ( $2.32 \text{ t ha}^{-1}$ ), y superó estadísticamente a los tratamientos *Rz*, *Rz+80N(0:1)*, *80N(0:1)* y testigo. El valor más bajo de rendimiento de grano ( $1.14 \text{ t ha}^{-1}$ ) se obtuvo con la fertilización nitrogenada a base de amonio *80N(0:1)* y en el testigo ( $1.08 \text{ t ha}^{-1}$ ) (Figura 18).

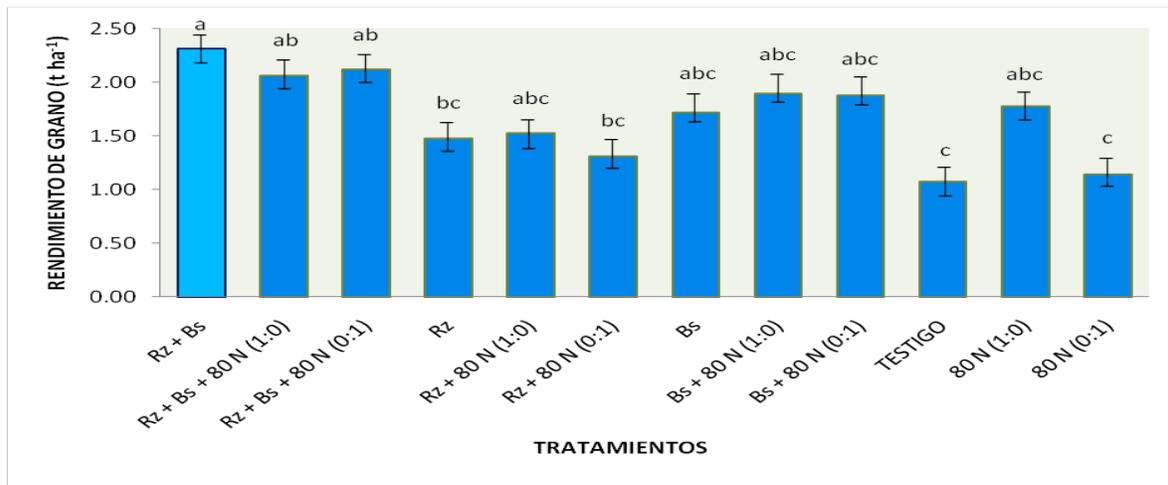


Figura 18. Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre el rendimiento del cultivo de frijol azufrado higuera con riego por goteo. Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En éste experimento, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos correspondientes a la fertilización nitrogenada, tanto en forma de nitratos 80N(1:0) ( $1.77 \text{ t ha}^{-1}$ ) como en forma de amonio 80N(0:1) ( $1.14 \text{ t ha}^{-1}$ ), como se ha reportado en experimentos a nivel de invernadero (Guo *et al.*, 2002).

La mayoría de los trabajos que han estudiado el efecto de alguna BPCV con *Rhizobium* en el cultivo de frijol, se han llevado a cabo en condiciones controladas (Figueiredo *et al.*, 2008); existen muy pocos reportes en condiciones de campo (Buttery *et al.*, 1986; Camacho *et al.*, 2001).

La fertilización nitrogenada a base de nitratos 80N(1:0) no afectó la fijación simbiótica de nitrógeno en éste cultivo, en comparación con la aplicación de amonio ( $\text{NH}_4$ ), esto es contrario a lo que mencionan algunos autores (Vessey y Bollman, 2006).

Cabe mencionar que cuando el cultivo se encontraba en etapa reproductiva, próximo a la cosecha, se presentó un fenómeno de baja temperatura (hasta  $-4^\circ\text{C}$ ), lo cual afectó de manera uniforme al rendimiento en todos los tratamientos del experimento.

## VIII. CONCLUSIONES

Cada una de las 15 cepas nativas de *Rhizobium* evaluadas en invernadero actuó de manera diferente en la fijación biológica de nitrógeno y promoción de crecimiento de plantas de frijol.

Cada uno de los 15 aislamientos nativos de *Bacillus* evaluados en invernadero tuvo diferente efecto en el crecimiento y desarrollo del cultivo de frijol.

En campo, el tratamiento que incluyó la combinación de *Rhizobium* y *Bacillus* incrementó la FBN y el rendimiento de grano del cultivo de frijol, en comparación a la aplicación individual de *Rhizobium*.

El tratamiento con fertilización sintética a base de amonio afectó a la FBN y a la concentración de potasio y calcio en el follaje.

El aislamiento Bs14 de *Bacillus* aumentó la concentración foliar de fósforo.

Las fuentes de fertilizantes nitrogenados (nitratos y amonio) afectaron el rendimiento del cultivo de frijol.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Amarger N., Macheret V., Laguerre G. (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. And *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. International Journal Systematic Bacteriology 47: 996-1006.
- Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant and Soil 272: 201-209.
- Arshad M., Frankenberger W.T. (1991) Microbial production of plant hormones. Plant and Soil 133: 1-8
- Appunu C., Sen D., Singh M.K., Dhar B. (2008) variation in symbiotic performance of *bradyrhizobium japonicum* strains and soybean cultivars under field conditions. Central European Agriculture 9: 169-173.
- Bai Y., Zhou X., Smith D.L. (2003) Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus strains* with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Science 43: 1174–1781.
- Bar-Yosef B., Sheikhoslami M.R. (1976) Distribution of water and ions in soils irrigated and fertilized from a trickle source. Soil Science Society American Journal 40: 575–582.
- Bacilio-Jimenez M.S., Aguilar-Flores E., Ventura-Zapata E., Pérez-Campos E., Bouquelet., Zenteno E. (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant and Soil 249: 271-277.

- Bano A., Fatima M. (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (L) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility Soils* 45: 405-413.
- Baron C., Zambryski P.C. (1995) Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. *Trends in Biotechnology* 13: 356-361.
- Bashan Y., Holguin G., Ferrera-Cerrato R. (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos II. Bacterias asociativas de la rizósfera. *Terra* 14: 195-210.
- Bergersen F.J., Turner G.L., Appley C.A. (1973) Studies of the physiological role of leghemoglobin in soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta* 292: 271-282.
- Bergersen F.J., Appley C.A. (1981) Leghemoglobin within bacteriod-enclosing membrane envelopes in soybean root nodules. *In* A. H. Gibson and W. E. Newton (eds.), *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra: Australian Academy of Science pp. 366.
- Brencic A., Winans S.C. (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant associated bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 155–194.
- Boonjawat J., Chaisiri P., Limpananont J., Soontaros S., Pongsawasdi P., Chaopongpang S., Pornpattkul S., Wongwaitayakul B., Sangduan L. (1991) Biology of nitrogen-fixing Rhizobacteria. *Plant and Soil* 137: 119-125.
- Bowen G.D., Rovira A.D. (1999) The Rhizosphere and its Management to Improve Plant Growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102

- Bloom A. J. (1994) Crop acquisition of ammonium and nitrate. In *Physiology and Determination of Crop Yield*, K. J. Boote, J. M. Bennett, T. R. Sinclair, and G. M. Paulsen, eds., Soil Science Society of America, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI 303–309.
- Buttery B.R., Park. S.J., Findlay W.I. (1986) Growth and yield of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer and to inoculation with *Rhizobium*. *Canadian Journal of Plant Science* 672: 425-432.
- Broughton W. J., Hernander G., Blair B., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55 -128.
- Burdman S., Kigel J., Okon Y. (1997) Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 29: 923-929.
- Cadahia L.C. (1998) Fertirrigación: Cultivos hortícolas y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa. Pp. 475
- Cadahia L.C. (2000) Fertirrigación: Cultivos hortícolas y ornamentales. 2da. Edición. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa. Pp. 475
- Causin H.F., Arnozis P.A. (1988) Efectos de las fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de la remolacha. *Ciencia del Suelo. Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET)* 6: 129-135.
- Camacho M., Santamaria C., Temprano F., Rodríguez- Navarro D.N., Daza A. (2001) Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 1058–1062.

- Camacho M., Santamaría C., Temprano F., Rodríguez-Navarro D.N., Daza A., Espuny R., Bellogín R., Ollero F.J., Lyra de M.C., Buendía-Clavería A., Zhou J., Li F.D., Mateos C., Velázquez E., Vinardell J.M., Ruiz-Sainz J.E. (2002) Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium*.
- Calvo P., Zúñiga D. (2010) Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*.
- Carson K., Meyer J. M., Dilworth M. (2000) Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 11-21.
- Canigia M.V.F. (2003) Manual de nodulación 1-53.
- Castro S., Carrera I., Martinez-Drets G. (2000) Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods* 41:173–177.
- Cassman K.G., Whitney A.S., Fox R.L. (1981) Phosphorus Requirements of Soybean and Cowpea as Affected by Mode of N Nutrition. Reprinted from *Agronomy Journal* 73: 17-22.
- Cleyet-Marel J.C., Bonito R.D., Beck D.P. (1990) Chickpea and its root-nodule bacteria: implications of their relationships for legume inoculation and biological nitrogen fixation. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires* - 9:101-106.
- Coelho M.B. (1991) Effects of processing and storage on vitamin stability. *Feed International* 12: 39-45.

- Crowley D.E., Wang Y.C., Reid C.P.P., Szaniszlo P.J. (1991) Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil* 130: 179-198.
- Chabot R., Antoun H., Cescas M.P. (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar, *phaseoli*. *Plant and Soil* 184: 311-321.
- Chi-Ying H., Zuei-Leng F., Wan-Chiun F. (1988) Effect of ammonium nitrate on the biosynthesis of leghemoglobin and nitrogen fixation in nodules of soybean plants. Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China. *Bot. Bull. Academia Sinica* 29: 143-15.
- Daza A., Santamaría C., Camacho M., Rodríguez-Navarro C.N., Temprano F. (2003) Short communication. Influence of micronutrients on biological nitrogen fixation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under greenhouse hydroponic culture conditions *Spanish Journal of Agricultural Research* 77-80.
- Dazzo F.B., Brill W.J. (1978) Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Plant Physiology* 62: 18–21.
- Delgadillo-Martínez J., Ferrera-Cerrato R., Galvis-Spínola A., Hernández-Garay A., Cobos-Peralta M.A. (2005) Fijación biológica de nitrógeno en una pradera de trébol hubba/ballico de corte o de pastoreo. *Terra Latinoamericana, Universidad Autónoma Chapingo, México* 23: 73-79.
- Dear B.S., Virgona J.M. (1996) Legumes in low-input perennial pastures of southern Australia: historical role and future development. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 39: 579-589.

- Dobereiner J., Urquiaga S., Boddey R.M. (1995) Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. *Fertilizer Research* 42: 339-346.
- Dobereiner J., Day J.M. (1975) Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. *In*: Stewart, W. D. P. (ed). Nitrogen fixation by free-living micro organisms. International Biological Prog. Cambridge University Press Pp. 39-56.
- Dobereiner J. (1992) History and new prospectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants *Symbiosis* 13:1-13.
- Duhan J.S., Dudeja S.S., Khurana A.L. (1998) Siderophore Production in Relation to N<sub>2</sub> Fixation and Iron Uptake in Pigeon Pea-*Rhizobium* Symbiosis. *Folia Microbiology* 43: 421-426.
- Dmitriev A.P. (2004) The Signaling Role of Nitric Oxide in Plants, *Tsitol. Genet.* 38: 67–75.
- De Felipe M. R. (2006) Fijación biológica de nitrógeno atmosférico en vida libre. En: Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones. Editores: Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., Rodelas, B. SEFIN. Pp. 9-16.
- Escalona A., Santana M., Acevedo I., Rodríguez V., Marcó L.M. (2009) Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el contenido de nitratos y lecturas "spad" en el cultivo de lechuga. *Agronomía Tropical* 59: 99-105.
- Espejel E.A.R. (2009) Fertilización con nitrato y amonio en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con raíces separadas 1:120.

- Essalmani H., Lahlou H. (2003) Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. Lentis. C.R. Biologies 326: 1163-1173.
- Etesami H., Alikhani H.A., Akbari A.A. (2009) Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. World Applied Sciences Journal 6: 1576-1584.
- Echegaray-Alemán A. (1995) El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. In: Ferrera-Cerrato R. y Pérez M.J. Editores. Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México. Pp. 7-35.
- FAO. (2008) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Base de datos estadísticos. <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- Feigin A., Letey J., Jarrell W.M. (1982) Nitrogen utilization efficiency by drip irrigated celery receiving preplant or water applied Nitrogen fertilizer. Agronomy Journal 74: 978–983.
- Feil B. (1994) Growth and ammonium: Nitrate uptake ratio of spring wheat cultivars under a homogeneous and a spatially separated supply of ammonium and nitrate. Plant Nutrition 17: 717 – 728.
- Ferrari E., Souto S.M., Dobereiner J. (1967) Effect of soil temperature on nodulation and growth of perennial soja (*Glycine javanica* L.). Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Rio de Janeiro 2: 461–466.

FIRA. (2001) Boletín informativo: el frijol en México competitividad y oportunidades de desarrollo.  
<http://www.fira.gob.mx/SAS/Docs/BFIRA/Frijol%20en%20Mexico.pdf>

Figueiredo M.V.B., Martinez C.R., Burity H.A., Chanway C.P. (2008) Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 1187-1193.

Flor C.A., Thung M.T. (1994) Desórdenes nutricionales. In: Pastor. C. M. y Schwartz, H. F. 1994 eds. Problemas de producción de frijol en los trópicos. 2da. Edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Pp.734.

García J.A.L., Probanza A., Ramos B., Flores J.J.C., Mañero F.J.G. (2004) Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) on the Biological Nitrogen Fixation, Nodulation, and Growth of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. Tesis 4: 71-77.

García J.L.G., mendoza M.d.I.N.R., García P.S., Acuña E.A.g. (2009) Relación amonio/nitrato en la producción de hierbas aromáticas en hidroponía. Agricultura Técnica en México 35: 5-11.

Granelli G., Lovati F., Testoni A. (1994) Fertigation in kiwifruit growing~ L'Informatore Agrario 50: 65-68.

Graham P. (1981) Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. a review. Field Crops Research 4: 93-112.

- González E.M., Aparicio-Tejo P.M., Gordon A.J., Minchin F.R., Royuela M., Arrese-Igor C. (1998) Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany* 49: 1705–1714.
- Guo S., Brück H., Sattelmacher B. (2002) Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil* 239: 267-275.
- Guo S., Kaldenhoff R., Uehlein N., Sattelmacher B., Brueck H. (2007) Relationship between water and nitrogen uptake in nitrate- and ammonium-supplied *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Journal of Plant Nutrition* 170: 73-80.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (2000) Campo experimental del Valle del Fuerte, Sinaloa, México.
- INIFAP (2002) Tecnología de Producción para el Cultivo de Frijol de Riego en el Altiplano de San Luis Potosí. Tecnología No. 25.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (2008) Campo experimental Valle del Fuerte, Sinaloa, México.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (2010) Campo experimental del Valle del Fuerte, Sinaloa, México.
- Hamaoui B., Abbadib J.M., Burdmana S., Rashidb A., Sariga S., Okona Y. (2001) Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions *Agronomie* 21: 553-560.

- Han T.X., Wang E.T., Han L.L., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X. (2008) Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 287-301.
- Hardarson G. (1993) Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152: 1-17.
- Herman R.P., Provencio K.R., Torrez R.J., Seager G.M. (1993) Effect of water and nitrogen additions on free-living nitrogen fixer populations in desert grass root zones. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3021-3026.
- Heeb A., Lundegardh B., Ericsson T., Savage G.P. (2005) Effects of nitrate-, ammonium-, and organic-nitrogen-based fertilizers on growth and yield of tomatoes *Journal of Plant Nutrition. Soil Sci* 168: 123-129.
- Hefny M., Doliński R., Mek W. (2001) Variation in symbiotic characters of alfalfa cultivars inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strains. *Biology and Fertility of Soils* 33: 435-437.
- Heldt H.W. (1997) *Plant biochemistry and molecular biology*: pp. xxiv + 522 pp.
- Huang C.Y., Fong Z.L., Fu W.C. (1988) Effect of ammonium nitrate on the biosynthesis of leghemoglobin and nitrogen fixation in nodules of soybean plants. *Bot. Bull. Academia Sinica* 29: 143-151.
- Iribarne M.I., Balagué L.J., Diosma G., Balatti P.A. (1998) Capacidad de fijación de nitrógeno de estirpes autóctonas de *Mesorhizobium* spp. en simbiosis con dos poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* (Miller). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 103: 157-164.

- Janczarek M., Kalita M., Skorupska A.M. (2009) New taxonomic markers for identification of *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species. *Archive of Microbiology* 191: 207–219.
- Jingquan Y., Dewei C. (1988) Effects of different nitrogen forms on tomato grown in carbonized rice hull. *Soilless Culture* 4: 51-61.
- Johnson H.S., Hume D.J. (1973) Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 1165-1168.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology* 5: 619-633.
- Kaymak H.C., Yarali F., Guvenc I., Donmez M.F. (2008) The effect of inoculation with plant growth rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) cuttings. *African Journal of Biotechnology* 7: 4479-4483.
- Kirichenko E.V. (2001) Mechanisms of Inhibitory Effect of Mineral Nitrogen on Formation of the Legume–*Rhizobium* System, *Fiziol. Biokh. Kul't. Rast.* 33: 95–104.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radish. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Vol. 2. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, pp. 879–882.

- Kuykendall L.D. (2005) In DJ Brenner, NR Krieg, JT Stanley (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, USA pp 324-361.
- Kretovich V.L. (1994) *Biokhimiya usvoeniya azota vozdukha rasteniyami* (Biochemistry of Nitrogen Assimilation from the Air by Plants), Moscow: Nauka.
- Laguerre G., van Berkum P., Amarger N., Pre! vost D. (1997) Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4748±4758.
- Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981–993.
- Lea P.J., Morot-Gaudry J.F. (2001) Plant Nitrogen. INRA, Springer, Berlin, Heidelberg, Paris.
- Leigh G.J. (2002) Nitrogen fixation at the millennium. London: Elsevier Science.
- Lips S.H., Leidi E.O., Silberbush M., Soares M.I.M., Lewis O.E.M. (1990) Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1271-1289.
- Liu S.T., Lee L.Y., Tai C.Y., Hung C.H., Chang Y.S., Wolfram J.H., Rogers R., Goldstein A.H. (1992) Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101. *Journal of Bacteriology* 174: 5814-5819.

- López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Valencia-Cantero E., Velázquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I. (2009) *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas* 11: 01 - 08.
- Martínez-Romero E. (2003) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252: 11-23.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B. (2004) Plant growth promoting bacteria confers resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 565-572.
- Mazotto A.M., Melo A.C.N.d., Macrae A., Rosado A.S., Peixoto R., Cedrola S.M.L., Couri S.n., Zingali R.B., Villa A.L.C.V., Rabinovitch L., Chaves J.Q., Vermelho A.B. (2010) Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Mmolawa K., Or D. (2000) Root zone solute dynamics under drip irrigation: A review. *Plant and Soil* 222: 163–190.
- Mengel K., Kirkby E.A. (1987) Nitrogen *In: Principles of plant nutrition*. Mengel, K. and Kirkby, E. A. (eds.). 4th edition. International Potash Institute. WorldblaufenBern / Switzerland 593: 347-374.
- Michiels J., Dombrecht B., Vermeiren N., Xi C., Luyten E., Vanderleyden J. (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol Ecol* 26: 193–205.

- Mora F. (1995) Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 6: 68-74.
- Morales Carrillo N. (2000) Esquema de Comercialización del Frijol Zacatecano. Universidad Autónoma Chapingo.
- Neill S.J., Bright J., Desikan R., Hancock J. (2008) Nitric Oxide Evolution and Perception, *Journal of Experimental Botany* 59: 25–35.
- NOM-021-RECNAT (2000) Aprobada por el Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Conservación, Protección, Restauración y Aprovechamiento de los Recursos Forestales de Suelos y Costas. Norma Oficial Mexicana. Pp. 227.
- Ofosu-Budu K.G., Ogata S., Fujita K. (1992) Temperature Effects on Root Nodule Activity and Nitrogen Release in Some Sub-Tropical and Temperate Legumes. *Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition* 38: 717-726.
- Olivares J. (2004) Fijación biológica de Nitrógeno. <http://www.eez.csic.es/~olivares/prensa/ds29-07-99.htm>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (1995) Guías para la Calidad del Agua Potable: Recomendaciones. Ginebra, Suiza. Pp.195.
- Ozturk A., Caglar O., Sahin F. (2003) Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization *Journal of Plant Nutrition, Soil Science* 166: 262-266.

- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M. (1996) Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2279–2285
- Palma-Martín F.J. (2009) Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en la simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino. Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR. 3512-2009. ISBN:978-84-692-6396-9.
- Palmer K.M., Young J.P., W. (2000) Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2445–2450.
- Peña P.E. (1997) Manual práctico de Fertirriego. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. SEMARNAP.
- Piha M.Y., Munns D.N. (1987) Nitrogen fixation potencial of grain legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* 98: 169-182.
- Perrine F.M., Rolfe B.G., Hynes M.F., Hocart C.H. (2004) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indoleacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 723-729.
- Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J.D., Völker U., Hecker M. (2001) Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183, No. 19.
- Poupot R., Martinez-Romero E., Prome J.C. (1993) Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an *N*-methyl-*N*-acylglucosamine terminus. *Biochemistry* 32: 10430±10435.

- Poupot R., Martinez-Romero E., Gautier N., Prome J.C. (1995) Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *Journal of Biological Chemistry* 270: 6050±6055.
- Pueppke S.G., Broughton W.J. (1999) *Rhizobium* sp. Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant and Microbe Interactions* 12: 293±318.
- Pliego L., Ocaña A., Lluch C. (2002) Crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación y asimilación de nitratos con dosis de nitrógeno en frijol. *Terra Latinoamericana* 21: 213-223.
- Quadrelli A.M., Laich F.S., Andreoli E., Echeverria H. E. (1997) Respuesta de *Lotus tenuis* Waldst a la inoculación con *Rhizobium loti* y a la fertilización fosfatada. *Ciencia del Suelo* 15: 22-27.
- Ramos M.L.G., Parsons R., Sprent J.I., James E.K. (2003) Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38: 339–347.
- Raven J.A., Smith F.A. (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol* 76: 415–431.
- Remans R., Croonenborghs A., Torres G.R., Michiels J., Vanderleyden J. (2007) Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *European Journal of Plant Pathology* 119: 341–351.

- Rivas R., Peix A., Mateos P.F., Trujillo M.E., Martínez-Molina E., Velázquez E. (2006) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant and Soil* 287: 23–33.
- Rios I.H., Herrera E.J.G., López F.J.P., Arámbula L.A.T., Rivas J.J.B., Torres M.E.T., Castañeda O.M., Castañeda A.V., Ramírez J.P.G., Ramírez A.E., Martínez I.C., Magaña D.T., Carrillo A.R.Q., Orozco A.A., Kipping D.R., Laurel H.O., Ramírez A.B.T. (2003) Programa Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología en el Estado de San Luis Potosí. Etapa II: Caracterización de la cadena agroalimentaria del frijol de riego e identificación de sus demandas tecnológicas 1-58.
- Rinu, Pandey A. (2009) *Bacillus subtilis* NRRL B-30408 inoculation enhances the symbiotic efficiency of *Lens esculenta* Moench at a Himalayan location. *Journal of Plant Nutrition. Soil Science* 172: 134-139.
- Rossum D.V., Muyotcha A., Verseveld H.W.V., Stouthamer A.H., 1 F.C.B. (1994) Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating groundnut. *Plant and Soil* 163:177-187.
- Rodríguez H., Fraga R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances, Research review paper* 17: 319-339.
- Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C. (2001) Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21: 627–634.
- SAGAR. (1998) Situación actual y perspectiva de la producción de Frijol en México 1990 – 1998.

- Sassi A.S., Aydi S., Gonzalez E., Abdely Ch. (2008) Osmotic stress affects water relations, growth, and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants. *Acta Physiol Plant* 30: 441–449.
- Sarig S., Blum A., Okon. (1988) Improvement of water status and yield of field grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Agricultural Science* 110: 271-277.
- Santillana N., Arellano C., Zúñiga D. (2005) Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada* 4: 47-51.
- Silvester R., Kipe J., Harris D. (1987) Simbiosis leguminosa-rizobio: Evaluación, selección y manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Pp.72.
- Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Martinez-Romero E., Souza V. (2003) *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 884-893.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SIACON, Anuario Agrícola por Municipio SAGARPA (2008). Consulta de Indicadores de Frijol. [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2009). Consulta de Indicadores de Frijol. <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1095&tipo=1>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2010). Consulta de Indicadores de Frijol.

Sessitsch A., Howieson J.G., Perret X., Antoun H., Martínez-Romero E. (2002) Advances in *Rhizobium* research. Critical Review of Plant Science 21: 323-378.

Segovia L., Young J.P.W., Martínez-Romero E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* type (strains as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of System Bacteriology 43: 374-377.

Somasegaran P., Hoben H.J. (1985) Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii NifTAL. Project and MIRCEN. Department of Agronomy and Soil Science. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources. College of Tropical Agriculture and Human Resources 1-510.

Srinivasan M., Petersen D.J., Holl F.B. (1997) Influence of indoleacetic-acid producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology 42: 1006-1014.

Sridevi M., Mallaiah K.V. (2007) Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. Indian Journal of Microbiology 49: 98-102.

Schmidt P.E., Parniske M., Werner D. (1992) Production of the phytoalexin glyceollin I by soybean roots in response to symbiotic and pathogenic infection. Botanic Acta 105: 18-25.

- Stajković O., Delić D., Jošić D., Kuzmanović Đ., Rasulić N., Knežević-Vukčević J. (2011) Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters* 16: 5919-5926.
- Shumnyi V.K., Sidorova K.K., Klevenskaya I.L. (1991) *Biologicheskaya fiksatsiya azota (Biological Nitrogen Fixation)*, Novosibirsk: Nauka.
- Swain M.R., Ray R.C., Nautiyal C.S. (2008) Biocontrol Efficacy of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Cow Dung Against Postharvest Yam (*Dioscorea rotundata* L.) Pathogens. *Curr Microbiol* 57: 407-411.
- Thies J.E., Singleton B.W., Bohlool B.B. (1991) Influence of the size of indigenous Rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on well-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 19-28.
- Todar K. (2003) The genus *Bacillus*. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. Pp 35.
- Ugalde A.F.J., López V.G., López E.S., Contreras R.C., Lagunes R.S., Acosta A. B. (2001) Fertirriego: alternativa de productividad y rentabilidad en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista tecnológica forestal y agropecuaria* 1-7.
- Van Rossum D., Muyotcha A., Van Verseveld H.W., Stouthamer A.H., Boogerd F. (1994) Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating groundnut. *Plant and Soil* 163: 177-187.

- Vázquez C.G., Sáenz E.O., Alvarado R.V., García F.Z. (2000) Absorción de nitrato y amonio por plantas de nopal en hidroponía. *Terra Latinoamericana*, Universidad Autonoma de Chapingo 18: 133-139.
- Vazquez P., Holguin G., Puente M.E., Lopez-Cortes A., Bashan Y. (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol Fertil Soils* 30: 460-468.
- Vessey K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vessey K., Buss T.J. (2002) *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes – Controlled-environment studies. *Canadian Journal of Plant Science* 82: 282-290.
- Vessey J.K., Bolman M.I. (2006) Differential Effects of Nitrate and Ammonium Supply on Nodule Initiation, Development, and Distribution on Roots of Pea (*Pisum sativum*), *Canadian Journal of Botanic* 84: 893-903.
- Velázquez E. (2006) Diversidad de bacterias rizo endosimbióticas de plantas. En: Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones. Editores: Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C., Rodelas, B. SEFIN. Pp. 45- 52.
- Velmurugan N., Choi M.S., Han S.S., Lee Y.S. (2009) Evaluation of Antagonistic Activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus lecheniformis* Against Wood-Staining Fungi: In vitro and In vivo Experiments *The Journal of Microbiology* 47: 385-392.

- Verma J.P., Yadav J., Tiwari K.N., Lavakush, Singh V. (2010) Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. *International Journal of Agricultural Research* 5: 954-983.
- Vincent J.M. (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Pp 199.
- Voysest O. (2000) Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de América Latina 1930- (1999). Cali, Valle, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Wilson M.K., Abergel R.J., Arceneaux J.E.L., Raymond K.N., Byers B.R. (2010) Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals* 23: 129-134.
- Wahyudi A.T., Astuti R.P., Widyawati A., Meryandini A., Nawangsih A.A. (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40.
- Yan X.R., Chen W.F., Fu J.F., Lu Y.L., Xue C.Y., Sui X.H., Li Y., Wang E.T., Chen W.X. (2007) *Mesorhizobium* spp. are the main microsymbionts of *Caragana* spp. grown in Liaoning Province of China. *Microbiol Lett, Federation of European Microbiological Societies* 265-273.

## X. ANEXOS

Cuadro 1A: Solución nutritiva Jensen, deficiente en nitrógeno (VINCENT, 1970)

|   |                  |
|---|------------------|
| <b>Ca HPO<sub>4</sub></b>                   | <b>1.0 g</b>     |
| <b>K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub></b>        | <b>0.2 g</b>     |
| <b>Mg SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O</b> | <b>0.2 g</b>     |
| <b>Na Cl</b>                                | <b>0.2 g</b>     |
| <b>Fe Cl<sub>3</sub></b>                    | <b>0.1 g</b>     |
| <b>Sol. De Oligoelementos*</b>              | <b>1.0 ml</b>    |
| <b>Agua destilada</b>                       | <b>1000.0 ml</b> |
| <b>pH</b>                                   | <b>6.7 – 7.0</b> |

\* Solución de oligoelementos

|   |                  |
|---|------------------|
| <b>H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub></b>         | <b>0.5 g</b>     |
| <b>Zn SO<sub>4</sub></b>                    | <b>0.05 g</b>    |
| <b>Mn SO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O</b>   | <b>0.5 g</b>     |
| <b>Cu SO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O</b> | <b>0.02 g</b>    |
| <b>Na Mo O<sub>4</sub></b>                  | <b>0.05 g</b>    |
| <b>Agua Destilada</b>                       | <b>1000.0 ml</b> |