

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**RESPUESTA DE LA CO-INOCULACIÓN DE  
*Rhizobium* y *Azospirillum* Y LA ADICIÓN DE  
MOLIBDENO EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**Melvin Jesús Alpizar Marín**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTECNÍA**

**2018**

**RESPUESTA DE LA CO-INOCULACIÓN DE *Rhizobium* y *Azospirillum*  
Y LA ADICIÓN DE MOLIBDENO EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**Melvin Jesús Alpízar Marín**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERÍA  
AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTECNÍA**

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA  
AÑO 2018**

RESPUESTA DE LA CO-INOCULACIÓN DE *Rhizobium* y *Azospirillum* Y LA ADICIÓN DE  
MOLIBDENO EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

Melvin Jesús Alpízar Marín

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA CON  
ÉNFASIS EN FITOTECNÍA

---

Lidieth Uribe Lorío Dra.

DIRECTOR DE TESIS

---

Leida Castro Barquero Licda.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

---

Néstor Chaves Barrantes Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

---

Gabriela Soto Muñoz Msc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

---

Luis Gómez Alpízar Dr.

DIRECTOR DE ESCUELA

---

Melvin Jesús Alpízar Marín

SUSTENTANTE

## **I. Dedicatoria**

A mi abuelo Antonio Marín González (qdDg), quién me inculcó el amor por la agricultura desde pequeño.

A mi tío Elidión Alpizar García (qdDg), por enseñarme a podar café a los 12 años.

A mis padres, Emilce Marín Moscoso y José Belisario Alpizar García, por todo su esfuerzo y sacrificio para que estudiara.

A todos mis hermanos.

Finalmente, a todos los agricultores de hueso colorado que han hecho grande a Costa Rica, con su esfuerzo y trabajo.

## **I. Agradecimiento**

En especial la Doctora Lidieth Uribe Lorío, como directora de tesis, por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación y por sus consejos para la vida, gracias infinitas.

Al personal del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. En especial a la Licenciada Leida Castro Barquero y Rebeca Vargas Madrigal. Muchas gracias por todo su apoyo.

A la Doctora Cristina Chinchilla Soto, colega y amiga del Centro de Investigaciones en Contaminación Ambiental, quien siempre me apoyó en los peores momentos, para que terminara esta tesis. Muchas gracias Cristina. Por siempre agradecido.

Esta tesis fue ejecutada bajo el marco del proyecto de investigación VI 733-B071, Biofertilización del cultivo del frijol, inscrito ante la vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Su desarrollo se efectuó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

## RESUMEN

El uso de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en el cultivo frijol, puede contribuir a una mayor sostenibilidad de la actividad reduciendo los costos productivos y beneficiando al consumidor y al ambiente.

Se estudió la co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum* y la adición de molibdeno, en dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Nambí y Cabécar bajo invernadero, en un arreglo factorial 3x2x2, con cinco repeticiones. Se trabajó con las cepas de *Rhizobium* CIAT 639 y CIAT 899, dos niveles de molibdeno aplicado al suelo (con molibdeno y sin molibdeno), y la inoculación con la cepa de *Azospirillum brasilense*, DSM1859.

Las variables de crecimiento estudiadas fueron altura de planta, peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de raíces, longitud de raíces, superficie específica de raíz, contenido de nutrientes de la parte aérea, número y peso fresco de nódulos. Todas las variables fueron medidas al 50% de la floración.

Para la variedad de frijol negro Nambí, se observaron diferencias significativas en el factor inoculación con *Rhizobium*, para las variables peso fresco (18,14 g) y seco (2,32 g) de la parte aérea con la cepa CIAT 899, con respecto al tratamiento sin inocular 15,94 g y 2,11 g respectivamente. En el caso de la variedad Cabécar fueron encontradas diferencias significativas para las variables altura de planta (27,43 cm), peso seco de la parte aérea (2,42 g), peso seco de la raíz (0,98 g) entre la cepa CIAT 899 y el tratamiento sin inocular.

Con respecto al factor inoculación con *Azospirillum brasilense*, en la variedad Nambí, se encontraron diferencias significativas para las variables peso fresco de la parte aérea: suelo inoculado (18,25 g) y suelo sin inocular (15,61 g). Así mismo para el peso seco de la parte aérea: suelo inoculado (2,36 g), y suelo sin inocular, (2,09 g),

La co-inoculación de la cepa CIAT 899 con *Azospirillum* (DSM1859) produjo inhibición de la nodulación.

## TABLA DE CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN .....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO .....	IV
RESUMEN.....	V
TABLA DE CONTENIDO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA. EL FRIJOL.....	5
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO.....	6
FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	7
FERTILIZACIÓN .....	9
ORDEN DE SUELO ULTISOL.....	10
OBJETIVOS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
LOCALIZACIÓN DEL ENSAYO.....	12
PREPARACIÓN DEL SUSTRATO .....	12
MATERIAL VEGETAL.....	13
CEPAS UTILIZADAS Y PROCESO DE INOCULACIÓN .....	14
APLICACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN .....	16
EVALUACIONES DEL MATERIAL VEGETAL.....	16
CONTENIDO DE NUTRIENTES .....	16
PESO FRESCO, SECO Y LONGITUD DE RAÍCES.....	17
EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DE <i>RHIZOHIUM</i> INOCULADAS .....	18
DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
VARIEDAD NAMBÍ .....	19
CONTENIDO DE EN LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA DE FRIJOL NAMBÍ.....	28
VARIEDAD CABÉCAR.....	32
CONTENIDO DE NUTRIENTES EN LA PARTE AÉREA DE LA PLANTA DE FRIJOL VARIEDAD CABÉCAR .....	37
RESPUESTA VARIEDAD -CEPA DE RHIZOBIUM Y AZOSPIRILLUM .....	39
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS .....	42
ANEXOS .....	50

## Lista de Figuras

Figura 1. Variedades de 3 frijol utilizadas en el ensayo, A) Nambí (Negro) y B) Cabécar (Rojo) .....	13
Figura 2. 1a. Bolsas de crecimiento utilizadas para evaluar la nodulación previa al establecimiento del ensayo. 1b. Nodulación producida por la cepa CIAT 899 .....	14
Figura 3. Proceso de inoculación con <i>Rhizobium</i> de la semilla de frijol variedad Cabécar .....	15
Figura 4. Efecto del factor inoculación con <i>Rhizobium</i> sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Nambí. ....	21
Figura 5. Efecto del factor inoculación con <i>Rhizobium</i> , sobre la altura de la planta en la variedad de frijol Nambí. ....	21
Figura 6. Efecto del factor inoculación con <i>Rhizobium</i> sobre la superficie específica y la longitud de la raíz en la variedad de frijol Nambí. ....	22
Figura 7. Efecto del factor inoculación <i>Azospirillum brasilense</i> sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Nambí .....	23
Figura 8. Efecto del factor inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la altura de la planta y la superficie específica de la raíz en la variedad de frijol Nambí. ....	24
Figura 9. Efecto del factor inoculación con <i>Azospirillum brasilense</i> sobre la longitud de la raíz en la variedad de frijol Nambí. ....	24
Figura 10. Raíz del frijol con nódulos, variedad de Nambí, tratamiento CIAT 899 + Mo + DSM 1859. ....	26
Figura 11. Efecto de los tratamientos sobre la concentración de nitrógeno en la parte aérea de la variedad de frijol Nambí. ....	31
Figura 12. Efecto del factor <i>Rhizobium</i> sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Cabécar. ....	33
Figura 13. Efecto del factor <i>Rhizobium</i> sobre la altura de la planta en la variedad de frijol Cabécar .....	34
Figura 14. Efecto del factor <i>Rhizobium</i> sobre la superficie específica de la raíz en la variedad de frijol Cabécar. ....	35
Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la concentración de potasio en la parte aérea de la variedad de frijol Cabécar. ....	39



## Lista de Cuadros

Cuadro 1. Análisis químico de suelo Ultisol San Mateo, Alajuela.....	12
Cuadro 2. Efecto del factor inoculación con <i>Rhizobium</i> , sobre el peso fresco y seco de..... la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Nambí.	20
Cuadro 3. Efecto de los tratamientos aplicados sobre número de nódulos, su peso fresco y..... porcentaje de plantas que presentaron nodulación de la variedad de frijol Nambí.	26
Cuadro 4. Análisis foliar de la parte aérea variedad de frijol Nambí.....	30
Cuadro 5. Efecto de cada uno de los factores y sus interacciones con su respectiva..... probabilidad (p) para las variables altura de planta, peso fresco y seco de parte aérea y peso fresco y seco de raíz, en la variedad de frijol Cabécar.	32
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos aplicados sobre número de nódulos, su peso fresco ..... y porcentaje de plantas que presentaron nodulación de la variedad de frijol Cabécar.	36
Cuadro 7. Análisis foliar de la parte aérea de variedad de frijol Cabecar. ....	38

## INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la base de la dieta del costarricense, es consumido por el 97 % de la población y es la principal fuente de proteína (Rodríguez y Fernández, 2003, Rodríguez y Fernández, 2015). Por lo tanto, es un cultivo básico para la seguridad alimentaria del país, y es clave aumentar la productividad de esta leguminosa.

A pesar de la importancia de este cultivo y los esfuerzos realizados por instituciones como el Ministerio de Agricultura y Ganadería, el INTA, el programa PITTA-Frijol y la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, con su programa de Leguminosas de grano, la productividad promedio fue de 0,73 toneladas métricas por hectárea entre los años 2012 y 2015 (INFOAGRO, 2016). Además, las políticas de globalización provocaron una reducción del área de siembra, pasando de 63160 ha en 1991 a un mínimo de 22331 ha, en el año 2016; mientras que la producción pasó de 35560 Tm (SIMA, 2015) a 16501 Tm, en estos mismos años (INFOAGRO, 2017).

Esta reducción en la siembra de frijol ha provocado que se dé una dependencia de la importación de grano. La pérdida de la autosuficiencia en la producción de frijol se debió a la salida del Consejo Nacional de la Producción (CNP), por la cual, muchos productores, por no decir la gran mayoría, se vieron obligados a dejar la actividad ya que no tenían la venta de la producción asegurada, ni mucho menos la recuperación de la inversión (Mena, 2001).

Los suelos más adecuados para el cultivo de frijol son los limosos, con pH entre 5,5 a 7, 0 y ricos en materia orgánica. Bajo estas condiciones edafológicas es posible una producción de 2500 kg ha<sup>-1</sup>, que remueven entre 60 a 80 Kg de nitrógeno y 40 kg de fósforo del suelo (Singh y Jauhar, 2005), cuando estos dos nutrientes se encuentran a bajas concentraciones, son una limitante para el cultivo. El nitrógeno desempeña un rol importante en la formación de proteínas y el fosforo promueve el desarrollo radical, tiene un papel clave en la formación de semillas, y participa en el proceso de la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Bertsch, 1995).

En Costa Rica en las regiones Huetar Norte y Brunca, es donde se cultiva esta leguminosa, la nodulación y la fijación de nitrógeno son comunes, pero no en los niveles adecuados para obtener altos rendimientos. Una forma de favorecer la nodulación y en consecuencia aumentar la fijación simbiótica de nitrógeno, es el empleo de cepas de *Rhizobium* más eficientes y competitivas, para disminuir la aplicación de fertilizante nitrogenado a la siembra y durante el ciclo del cultivo (Castro *et al*, 1993, Acuña y Castro, 1996, Acuña y Uribe, 1996, Singh y Jauhar, 2005, Uribe *et al*, 1990)

La co-inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum lipoferum* con cepas de *Rhizobium*, ha demostrado tener un efecto positivo sobre la fijación biológica de nitrógeno (Yadegari *et al*, 2010, Ribeiro *et al*, 2016). Asimismo, el aporte de molibdeno también favorece la fijación biológica de nitrógeno (Robitalle 1975, Kaiser *et al*, 2005, Kandil *et al*, 2013).

*Azospirillum* se clasifica como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal de vida libre en el suelo, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno y establecer asociaciones con gramíneas y otras plantas (Bashan *et al*, 1996, Rangel-Lucio *et al*, 2011, García *et al*, 2013). Entre los efectos observados en gramíneas se citan mayor ganancia del peso seco total, mayor concentración de nitrógeno en follaje y grano, mayor número de espigas, espigas fértiles y mazorcas, floración más precoz, plantas más altas y se ha observado un mayor desarrollo del sistema radical en cultivos como arroz, trigo y pastos (Castellano *et al*, 2015, Cassan *et al*, 2016).

Específicamente en el caso del cultivo del frijol, la co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum* presenta como beneficio un mayor número de pelos radicales, una mayor cantidad de flavonoides exudados por el sistema radical y un incremento en el número de nódulos (Remans *et al*, 2008). Por su parte, Burdman *et al* (1997) encontraron en un ensayo realizado en macetas, un mayor número de nódulos y mayor fijación de nitrógeno en los tratamientos de co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum*, que en los inoculados únicamente con *Rhizobium*. La inoculación con *Azospirillum* podría beneficiar de manera indirecta el establecimiento y proliferación en la rizosfera de otros microorganismos favorables para el cultivo (Russo *et al*, 2005).

Por muchos años se creyó que el mayor aporte de *Azospirillum* al crecimiento vegetal se debía a su capacidad de fijar nitrógeno, pero se ha determinado que se debe más bien al aumento del crecimiento radical, como consecuencia de las hormonas que produce y libera

a la rizósfera, como auxinas, giberilinas y citoquininas (Okon y Labandera-González, 1994, Cassan *et al*, 2016, Saine *et al*, 2015).

El molibdeno fue descubierto como elemento esencial para el crecimiento de las plantas en el año 1939 (Arnon y stout, 1939), en estudios con plantas de tomate creciendo en medio hidropónico.

En el caso de las leguminosas, el molibdeno es esencial para la fijación biológica del nitrógeno (Zimmer y Mendel, 1999), ya que forma parte de la enzima nitrato reductasa, que reduce el  $\text{NO}_3$  a  $\text{NO}_2$ , y la nitrogenasa que se encuentra presente en las leguminosas noduladas (Kirkby y Römheld, 2008). Viera *et al*, (1998), establecieron que una aplicación de  $40 \text{ g ha}^{-1}$  de molibdeno a los 25 días de la emergencia del frijol, causó un aumento de la actividad de la nitrogenasa y nitrato reductasa, provocando un mayor contenido del nitrógeno total acumulado en los tallos. En Costa Rica Acuña y Cordero, (1989), encontraron un efecto positivo de la aplicación de molibdeno, sobre la variable altura de las plantas. Al combinar la co-inoculación *Rhizobium* y *Azospirillum* con la adición de molibdeno, se esperaría una mejor respuesta a la fijación biológica de nitrógeno y por lo tanto un mayor crecimiento de las plantas.

El uso de co-inoculación puede resultar ventajoso en suelos con condiciones nutricionales limitadas (Bárbaro *et al* , 2008), tal como es el caso de los suelos del orden Ultisol, sobre los cuáles se produce gran parte del frijol común en Costa Rica, si bien son suelos con muy buenas condiciones físicas debido a la formación de pseudoarenas, que favorecen una buena estructura y drenaje natural, poseen características químicas marginales (fertilidad media a baja, debido al lavado de nutrientes causado por la lluvia). Por esta situación, presentan problemas de acidez, lixiviación de bases (Ca, K y Mg), bajo contenido de microelementos, como boro y zinc; hierro abundante y pueden presentar toxicidad por aluminio y manganeso (Bertsch, 1995).

No se encontró en la literatura científica costarricense, estudios de co-inoculación entre *Rhizobium*, *Azospirillum* y la fertilización con molibdeno en el cultivo del frijol, dada la importancia del frijol en la seguridad alimentaria del país, es de gran relevancia la realización de investigaciones que traten este tema con el fin de aumentar la productividad de este cultivo.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### El frijol

El frijol es una leguminosa que constituye la mayor fuente de proteína y energía para consumo humano en el mundo (Broughton *et al*, 2003). En la actualidad se habla de una producción mundial de 25,4 millones de toneladas, entre los mayores productores de este grano se encuentran: India, Myanmar, Brasil, Estados Unidos, México, China y Tanzania, entre todos ellos producen el 63,0 por ciento la producción mundial (FIRA, 2016). En el caso de Costa Rica para la cosecha julio 2015 y junio 2016, fueron sembradas 2331 hectáreas, entre frijol rojo y negro, para una producción de 14179 toneladas secas y limpias (MEIC, 2016). Sin embargo, esta producción es insuficiente para cubrir la demanda nacional, cercana a las 50 mil toneladas anuales.

En Costa Rica en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno ha funcionado desde el año 1955, el Programa de Leguminosas de grano que entre sus actividades se ha dedicado a la producción y mejoramiento del frijol con el fin de obtener una mayor productividad y rendimiento. La EEFBM ha reproducido frijol para semilla y ha puesto a disposición de los productores las variedades de frijol Cabécar y Nambí que son actualmente las más cultivadas en el país.

La variedad de frijol Cabécar, frijol rojo, fue desarrollada en la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, en Honduras, en el año 1995 y fue introducida en Costa Rica en 1999 (Hernández y Araya, 2003), como reemplazo a la antigua variedad Bibri, de color rojo. Por su parte, la variedad Nambí fue introducida en Costa Rica en el año 2011, como parte del Ensayo Regional de Líneas de Frijol de Grano Negro Tolerantes a los Efectos del Cambio Climático con Énfasis en la Sequía y las Altas Temperaturas (Hernández *et al*, sf).

La liberación de la variedad Nambí ocurrió a finales del año 2016, es una planta resistente a la sequía terminal y puede rendir hasta 1000 Kg/ha (INTA, 2016).

### **Rizobacterias promotoras de crecimiento**

Kloepper, (1978) acuñó el término Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, para definir a las bacterias que viven en la rizosfera de las plantas y que debido a los metabolitos que producen, tienen la capacidad de incrementar el crecimiento vegetal, y favorecer las defensas de la planta ante organismos patógenos. Se sugiere que las rizobacterias promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos como: la solubilización de fósforo; la producción de sideróforos y la quelatación de hierro; la fijación biológica de nitrógeno; la modulación de los niveles de fitohormonas y la supresión de patógenos en la raíz (Gamalero *et al*, 2011). Algunas de estas bacterias pueden vivir dentro de las raíces de las plantas, de forma endófitas, otras habitan solamente la rizosfera (Beneduzi *et al*, 2012, Zaidi *et al*, 2015).

El género *Azospirillum* forma parte de las (BPC), la cual beneficia a la planta por la fijación atmosférica de nitrógeno, también tiene la capacidad de sintetizar fitohormonas, en particular ácido indol acético y a través de diversos mecanismos puede conferir a las plantas cierta tolerancia al estrés biótico y abiótico (Fukami *et al*, 2018).

A partir del estudio de las BPC fue desarrollada toda una línea de investigación hasta llegar a los biofertilizantes de uso actual (Lugtemberd *et al*, 2009; Van Loon, 2007; Bhattacharyya *et al*, 2012).



### **Fijación biológica de nitrógeno**

La fijación biológica de nitrógeno es la captura de nitrógeno atmosférico y su transformación a nitrógeno amoniacal mediante la intervención de microorganismos de suelo, en una relación simbiótica o no (CIAT, 1987).

Las bacterias de suelo que tienen la capacidad de producir nódulos en las raíces de las leguminosas y fijar nitrógeno se llaman rizobios (CIAT, 1987). Por su importancia en la agricultura ha sido una de las relaciones simbióticas más estudiadas. Un ejemplo de uso intensivo de esta tecnología se ha dado en Brasil, siendo un país pionero en la fijación biológica de nitrógeno, en varios cultivos, entre ellos, soya, frijol y caña de azúcar (Döbereiner, 1997).

A pesar de que la FBN representa una buena alternativa para remplazar la fertilización nitrogenada, la respuesta a la inoculación en cultivos comerciales es muy variable, lo que se ha atribuido a factores como pH, alcalinidad, disponibilidad de nutrientes como el fósforo, contenido de materia orgánica, salinidad, contenido de humedad, temperatura, microorganismos presentes, textura del suelo, clima y variedad de frijol utilizada (Graham, 1981, Acuña y Castro, 1996, Al-Falih, 2002, Remans, *et al*, 2007).

La familia Rhizobiacea, Conn (1938), está compuesta por al menos 10 géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Allorhizobium*, *Kaistia*, *Ensifer*, *Sinorhizobium* y *Shinela*. De estos géneros únicamente *Rhizobium* es capaz de producir nódulos en las raíces de las leguminosas. Del género *Rhizobium*, descrito por Frank en 1889, se encuentran 70 especies descritas (Marcondes De Souza, *et al* 2014). Las dos cepas utilizadas en este ensayo, CIAT 639 y CIAT 899, provienen del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Esta última cepa clasificada como *Rhizobium tropici*, es tolerante a altas temperaturas, alta acidez y es muy estable simbióticamente (Martínez-Romero, 1991).

Por otro lado, también se han descrito bacterias de vida libre asociadas a la rizosfera de las plantas que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, como lo es el género *Azospirillum* (Bashan *et al*, 1996; Méndez, 2014). Entre los efectos benéficos de *Azospirillum* se encuentra el aumento en el crecimiento de la planta, la producción del cultivo y el contenido del nitrógeno foliar (Raverkar *et al*, 1988); además, la inoculación con *Azospirillum* puede favorecer el control de patógenos, como *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.* *Rhizoctonia spp.* (Raaijmakers, 2009); incrementar la fijación de nitrógeno atmosférico (Bashan *et al*, 2004) y contribuir a la mitigación del déficit de agua (Bano *et al*, 2013).

La co-inoculación es la aplicación en forma simultánea de dos o más microorganismos, con el fin de potencializar sus efectos (Bárbaro *et al* 2008, Ferline *et al*, 2006). En frijol se ha estudiado la combinación *Rhizobium tropici* y *Azospirillum brasilense* en las variedades BAT 477 y DOR 364 Remans *et al*, 2008; y la variedad Perola (Ribeiro *et al*, 2016) logró una mayor fijación de nitrógeno y aumento de la productividad en la variedad BAT 477, caso contrario sucedió con la variedad DOR 364, en el cual los mejores resultados se obtuvieron con solo la inoculación con *Rhizobium*, por otro lado en la variedad Perola, se dio un incremento en la nodulación en el segundo año de aplicación del inoculo. Por su parte, Remans *et al*, (2007) determinaron que la variedad de frijol BAT477, suministrada por el CIAT, inoculada con *Rhizobium etli*, CNPAF512, presentó un número, peso seco de nódulos, y contenido de P total mayor cuando las plantas crecieron en una alta concentración de fósforo (P) (100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), que cuando se utilizó una concentración baja (1  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). A la vez, demostraron que el efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre la nodulación de las plantas de frijol es dependiente de la nutrición con fósforo.

En diferentes estudios se ha demostrado que la selección de cepas de inoculantes por su alta capacidad de fijar N bajo condiciones controladas, no garantiza su éxito como inoculante en el campo, ya que las bacterias deben sobrevivir, competir y establecerse en la rizosfera de las plantas (Uribe, 1994, Cuadrado *et al*, 2009). Se han seleccionado cepas tolerantes a

diferentes condiciones limitantes como bajos niveles de P (Uribe, 1993, Keyser *et al*, 1979) y pH ácido (Ghahan *et al*, 1982, Campos, 1995). Las cepas utilizadas en este estudio, *Rhizobium* sp CIAT 639 y *Rhizobium tropici* CIAT 899 fueron seleccionadas por su capacidad de fijar nitrógeno y establecerse en diferentes ambientes, como suelos ácidos (Hungria *et al*, 2003).

### **Fertilización**

Para que se establezca la simbiosis se debe aplicar fósforo, la deficiencia de este elemento es frecuente, sobre todo en suelos ácidos y en suelos volcánicos (Bertsch, 1995). Así mismo, la aplicación de calcio y boro contribuyen a la FBN (Bolaños y Bonilla, 2010. Por su parte, Weisany *et al*, (2013) menciona como elementos esenciales para la adecuada fijación biológica de nitrógeno son los siguientes: carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azúfre, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, molibdeno, boro, cloro, níquel y cobalto.

En un ensayo realizado en Brasil, se inoculó frijol común con la cepa de *Rhizobium tropici* (SEMIA 488), se usaron dos fuentes de molibdeno: molibdato de sodio y molibdato de amonio; a 0, 1, 2, 3, p de semilla. La mejor nodulación se logró con 2 y 3 g de molibdato de amonio y con las cepas nativas de *Rhizobium sp* presentes en el suelo y no con la utilizada en la inoculación (Matoso *et al*, 2014). Al estudiar diferentes combinaciones de dosis de molibdeno y nitrógeno Amane *et al*, (1999), establecieron que con dosis entre 70 y 100 gramos de molibdeno por hectárea, se logró la máxima producción de grano. Los autores encontraron que cuando se aplicaron altas dosis de nitrógeno, se requirieron bajas dosis de molibdeno, mientras que con el uso de bajas dosis de nitrógeno se debió aumentar la dosis de molibdeno. Así mismo, Castro *et al*, (1993), encontraron que un alto contenido de fósforo en el suelo favorece la FBN, tanto por los beneficios de la presencia de ese elemento, como porque las cepas nativas de *Rhizobium* presentes en el suelo se ven beneficiadas, aumentando la disponibilidad de nitrógeno para la planta. Acuña y Cordero

(1989), estudiaron el efecto del Mo sobre las variables altura y peso seco de la parte aérea promedio en plantas de frijol de la variedad Negro Huasteco, cultivadas en un suelo Ultisol de la zona de Puriscal y encontraron que para ambas variables el efecto fue estadísticamente significativo. La altura superior se logró con una dosis de 0,05 kg/ha de Mo y el mayor peso seco de la parte aérea con 0,1 kg/ha de Mo.

Por su parte Vargas y Ramírez, (1989), en un ensayo de campo para determinar el efecto de *Rhizobium*, N, P y Mo sobre los cultivos de soya y maní, en un suelo clasificado como Typic Pelluster, en Cañas, encontraron en ambos cultivos un efecto positivo a la aplicación inicial de N, P y Mo sobre las variables evaluadas.

### **Orden de suelo Ultisol**

Desde el punto de vista mineralógico Bertsch (1995), describe a estos suelos con predominancia de arcillas 1:1, y óxidos de hierro y aluminio. La presencia de las arcillas 1:1, produce la formación de puentes de hidrogeno entre ellas, que conlleva a la formación de agregados, llamados pseudoarenas, esta característica les confiere a estos suelos buenas propiedades físicas, como una buena estructura y drenaje natural. Debido al efecto de los factores formadores de suelo, como clima (alta precipitación) y tiempo, se produce en estos suelos un lavado natural (lixiviación,) que tiene como consecuencia la pérdida de nutrientes, especialmente bases (calcio, magnesio y potasio). Estos suelos presentan además una baja disponibilidad de fósforo, causada por la fijación de este elemento con el hierro y el aluminio. Existe deficiencia de nitrógeno y de elementos trazas como boro y zinc, especialmente. No obstante, evitando el deterioro de las propiedades físicas y con un correcto manejo nutricional, estos suelos pueden ser muy productivos.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la fertilización con molibdeno y la co-inoculación con *Rhizobium* y *Azospirillum*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto de la inoculación con *Rhizobium* y *Azospirillum* sobre el peso fresco, peso seco de nódulos, peso seco aéreo y contenido foliar de nutrientes en las variedades Cabécar y Nambí
2. Estudiar el efecto de la fertilización con molibdeno sobre las plantas de frijol inoculadas con las bacterias promotoras de crecimiento *Rhizobium* y *Azospirillum*.
3. Determinar la presencia de las cepas inoculadas de *Rhizobium* en las raíces de las plantas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del ensayo

El ensayo se realizó en el invernadero del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica. El suelo utilizado (Cuadro 1) provino del distrito de San Isidro Labrador, cantón de San Mateo, provincia de Alajuela y fue clasificado como un Ultisol, Ustic Palehumults de acuerdo con el trabajo realizado por Enckevort *et al*, (1994).

**Cuadro 1.** Análisis químico de suelo Ultisol, San Mateo, Alajuela, 2018.

pH	Cmol (+)/L					%	mg/L					%			C/N
	H <sub>2</sub> O	Acidez	Ca	Mg	K		CICE	SA	P	Zn	Cu	Fe	Mn	C total	
5,5	5,0	3,51	1,13	0,35	7,01	29	3	1,9	11	127	23	6,05	0,46	8,65	13,2

### Preparación del sustrato

El análisis del suelo utilizado en esta investigación (Cuadro 1), coincide con los resultados obtenidos por Enckevort *et al*, (1994) cuando fue estudiado este suelo, los autores reportan además las siguientes propiedades: Suelo pardo oscuro en la capa superior, muy arcilloso en el subsuelo, de buen drenaje, pH bajo, deficiente en fósforo, potasio y calcio; lo que concuerda con las características para un suelo del Orden Ultisol según Berstsch (1995). Adicionalmente estos suelos presentan niveles bajos e insuficientes de elementos menores, como los son el zinc y boro (Méndez y Bertsch, 2012).

El suelo fue homogenizado y cribado, y se colocó en macetas de plástico de dos litros. Se aplicó una fertilización fosfórica base de acuerdo con lo recomendado por el CIAT (CIAT, 1986), utilizando como fuente MKP fosfato de potasio. El fertilizante se adicionó en una

dosis de 400 mg por maceta, (208 Kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), se disolvió en agua y fue aplicado una semana antes de la siembra

### **Material Vegetal**

En este estudio se utilizaron las variedades de frijol Nambí (negro) y Cabécar (rojo). La variedad Nambí llegó a Costa Rica en el año 2011, mediante el Ensayo regional de Líneas de Frijol de grano Negro Tolerante a los Efectos del cambio Climático con Énfasis en la Sequía y las Altas Temperaturas (Hernández *et al*, 2016). Por su parte la variedad Cabécar fue desarrollada por La Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, en 1995, fue introducida en Costa Rica en el año 1999, como parte del proyecto Ensayo Centroamericano de Adaptación y Rendimiento (ECAR rojo) (Hernández y Araya, 2003). Ambas variedades son multiplicadas para su distribución nacional por el Programa de Leguminosas de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno.

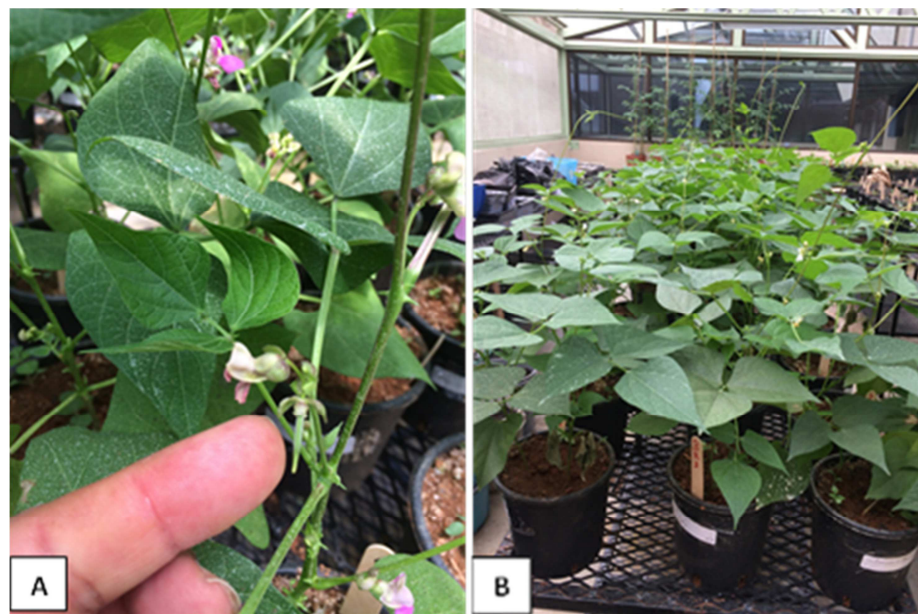


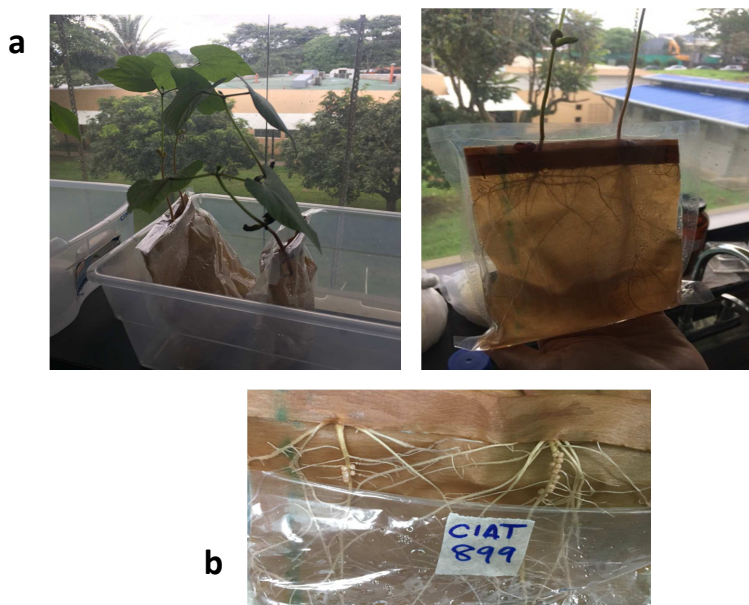
Figura 1. Variedades de frijol utilizadas en el ensayo, A) Nambí (Negro) y B) Cabécar (Rojo).

### Cepas utilizadas y proceso de inoculación

Se utilizaron las cepas *Rhizobium* CIAT 639, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Azospirillum brasilense* DSM1859, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Agrícola, del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica.

Las cepas *Rhizobium* CIAT 639 y *Rhizobium tropici* CIAT 899 se conservaron hasta su uso en caldo levadura manitol con glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , las cepas se rayaron en platos con agar levadura manitol (ALM) 4 días antes de la inoculación. Previo a la multiplicación de las cepas, fue evaluada en bolsas estériles su capacidad de formar nódulos, con el fin tener la certeza de contar con la capacidad de establecer la simbiosis con las variedades de frijol usadas en este estudio (Figura 1).

La cepa *Azospirillum brasilense* se conservó en caldo nutritivo con glicerol a  $70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las cepas se rayaron en platos con agar nutritivo 4 días antes de la inoculación. Se prepararon suspensiones iguales al estándar número 1 de Mc Farland de cada una de las cepas y se inocularon en las macetas en los tratamientos respectivos.



**Figura 2.** 1a. Bolsas de crecimiento utilizadas para evaluar la nodulación previa al establecimiento del ensayo. 1b. Nodulación producida por la cepa CIAT 899.



En cada maceta, de dos litros, fueron sembradas cuatro semillas, inmediatamente se procedió a realizar la inoculación con las cepas *Rhizobium* CIAT 899, *Rhizobium* CIAT 639 y *Azospirillum brasilense*, agregando 10 mL por maceta de una suspensión con una concentración de aproximadamente  $3,5 \times 10^8$  UFC/mL (Figura 2), se tapó la semilla con suelo. Ocho días después de la emergencia de las plantas, fue efectuado un raleo, se dejó tres plantas. Una semana después fue eliminada otra planta, dejando finalmente dos plantas por maceta. El riego se realizó con agua desionizada.



**Figura 3.** Proceso de inoculación con *Rhizobium* de la semilla de frijol variedad Cabécar. Invernadero del Laboratorio de Microbiología Agrícola, del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica, 2018.

### **Aplicación de la fertilización**

Con la presencia de la primera hoja trifoliada completamente expandida, se aplicó el molibdeno, como molibdato de sodio al suelo, a una dosis de 110 g/ha, pesando la cantidad necesaria, disolviéndola en 6 litros de agua y aplicando 50 mL por maceta.

### **Evaluaciones del material vegetal**

El día 36 y 54 después de la siembra se cosechó el experimento para las variedades Nambí y Cabécar respectivamente. Al 50 % de floración se evaluó la altura de planta, peso fresco y seco de la parte aérea, contenido de nutrientes, el peso seco y fresco de la raíz, la longitud radical, superficie específica de raíz, el número de nódulos por planta, así como su peso fresco. Las plantas se colocaron en bolsas de papel, y fueron secadas en una estufa a 80 °C, por 3 días para llevarlas a peso seco.

### **Contenido de nutrientes**

Con la parte aérea de las cinco repeticiones de cada uno de los tratamientos, se formó una sola muestra y se procedió a realizar el análisis para el contenido de nutrientes. Se determinó nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y potasio, expresado como % m/m; hierro, cobre, zinc, manganeso y boro expresado en mg/L. El análisis fue efectuado en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Foliareos del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica, bajo el método digestión ácida en microondas y las lecturas se realizan por medio de un espectrofotómetro de emisión óptica ICP-Plasma (Anexo 1).

### **Peso fresco, seco y longitud específica y longitud de raíces**

Las raíces se lavaron, se separaron los nódulos, se pesaron y posteriormente se preservaron en etanol a una concentración V/V del 10 %. Las muestras fueron guardadas en bolsas Ziploc, se almacenaron en refrigeración, para su posterior análisis con el programa GiARoots. Para esto se utilizó un sistema integrado de fotografía (utilizando una Cámara Nikon D7100) y el programa Camera Control Pro2 V 2.16.0 disponible en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. Las raíces se sacaron de las bolsas, se escurrieron, se colocaron y se expandieron sobre papel servilleta para su secado y se procedió a fotografiar cada una de ellas.

Utilizando el programa ImageJ se mejoró el contraste, se realizó la segmentación del color, para pasar cada una de las fotografías a imagen binaria. Con el programa GIA Roots, utilizando una escala de 162 píxeles/cm, se rotó la imagen, se procedió a realizar la segmentación adaptativamente doble y finalmente se aplicó el algoritmo, de acuerdo con Galkovskyi *et al* (2012). Se estimó la longitud específica ( $\text{cm}/\text{cm}^3$ ) y el largo (cm). Al final de este proceso las raíces fueron secadas en una estufa a 80 °C, por 3 días para llevarlas a peso seco.

### **Evaluación de la nodulación y aislamiento de las cepas de *Rhizobium* inoculadas.**

Los nódulos se separaron de las raíces, se pesaron, se colocaron en tubos eppendorf y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento. Con el fin de determinar si las cepas inoculadas fueron capaces de formar nódulos, a partir de una muestra al azar de 5 nódulos de cada tratamiento y del control sin inocular se procedió al aislamiento de los rizobios, según el protocolo establecido por el Laboratorio de Microbiología Agrícola. Los nódulos se colocaron en una caja Petri, se sumergieron durante un minuto en alcohol de 95%, luego se colocaron en un plato petri que contiene hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto. Se lavaron con agua estéril y se rayaron en medio de cultivo con ALM. Las cepas se incubaron a 25 °C. Se compararon las características coloniales (tamaño, coloración, forma, superficie, opacidad y consistencia) con las cepas inoculadas.

### **Diseño Experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental fue un arreglo factorial 3x2x2, con cinco repeticiones, en el cuál el factor uno corresponde a la inoculación con los rizobios: 1. *Rhizobium* CIAT 639; 2. *Rhizobium* CIAT 899 y 3. Suelo sin inoculación con *Rhizobium*. El factor dos corresponde a dos niveles de molibdeno aplicado al suelo, 1. Con molibdeno y 2. Sin molibdeno. Finalmente, el factor tres corresponde a la inoculación con la cepa de *Azospirillum brasilense*, 1. Inoculado con *Azospirillum brasilense* y 2. Sin inocular.

Los datos obtenidos para altura de planta, peso fresco y seco de parte aérea, peso fresco y seco de raíz, longitud específica de la raíz, longitud de raíz, número de nódulos y peso fresco de nódulos, así como los contenidos de nutrientes les fue realizada una prueba de normalidad, Shapiro-Wilks modificada. A las variables no continuas, se les realizó un análisis de varianza no paramétrico, mediante la prueba Kruskal Wallis. En el caso del peso seco de la raíz el resultado se transformó utilizando la raíz cuadrada. Como programa

estadístico se utilizó INFOSTAT, 2018, Grupo INFOSTAT, Universidad Nacional de Córdoba Argentina (2018) ( Di Rienzo et al, 20. Para realizar la comparación entre medias se escogió la prueba LSD Fisher ( $p > 0,05$ ).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Variedad Nambí**

Como se puede observar en el (Cuadro 2), para el factor *Rhizobium* se presentó un valor de  $P < 0,05$  en la variable peso fresco de la parte aérea; el factor molibdeno no tuvo efecto en ninguna de las variables estudiadas; mientras que para el factor *Azospirillum* se observó, en las variables peso fresco y seco de la parte aérea, un valor  $P < 0,05$ . Finalmente, las interacciones de los tres factores no fueron significativas.

Cuando se evaluó en la variedad Nambí, el factor inoculación con la cepa de *Rhizobium*, hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables peso fresco y seco de la parte aérea (Figura 4), encontrándose un mayor peso fresco y seco con la inoculación de la cepa CIAT 899 con respecto al tratamiento sin inocular. En el caso de la altura de la planta, el mejor resultado se dio con la cepa CIAT 639, que se diferenció de la cepa CIAT 899 y del suelo sin inocular (Figura 5). Por otra parte, las variables, longitud específica de raíz y longitud de raíz, no presentaron diferencias significativas (Figuras 6).

**Cuadro 2.** Efecto de cada uno de los factores y sus interacciones con su respectiva probabilidad (p) para las variables altura de planta, peso fresco y seco de parte aérea y peso fresco y seco de raíz, longitud específica de la raíz y longitud de raíz en la variedad de frijol Nambí.

Interacciones	Altura de planta (cm)	Peso parte aérea (g)		Peso parte radical (g)		Longitud Especifica de raíz (cm/cm <sup>3</sup> )	Longitud de raíz (cm)
		Fresco	Seco	Fresco	Seco		
<i>Rhizobium</i>	0,6890	0,0285	0,0827	0,3194	0,4189	0,8365	0,5085
Molibdeno	0,3927	0,6437	0,4047	0,2348	0,4330	0,4416	0,9170
<i>Azospirillum</i>	0,6272	0,0002	0,001	0,3855	0,6334	0,9492	0,8154
<i>Rhizobium</i> *Molibdeno	0,6123	0,2350	0,6011	0,6740	0,877	0,7875	0,1205
<i>Rhizobium</i> * <i>Azospirillum</i>	0,8112	0,2207	0,3383	0,2806	0,8312	0,3631	0,7144
Molibdeno* <i>Azospirillum</i>	0,5223	0,1814	0,6625	0,7504	0,9594	0,7661	0,9495
<i>Rhizobium</i> *Molibdeno* <i>Azospirillum</i>	0,6161	0,5179	0,5688	0,8494	0,6913	0,9098	0,9087

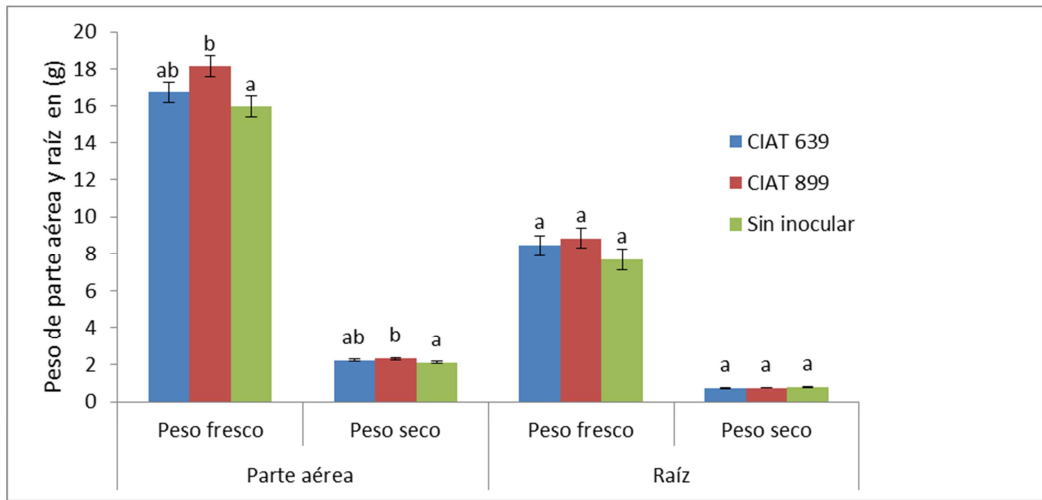


Figura 4. Efecto del factor inoculación con *Rhizobium*, sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Nambí.

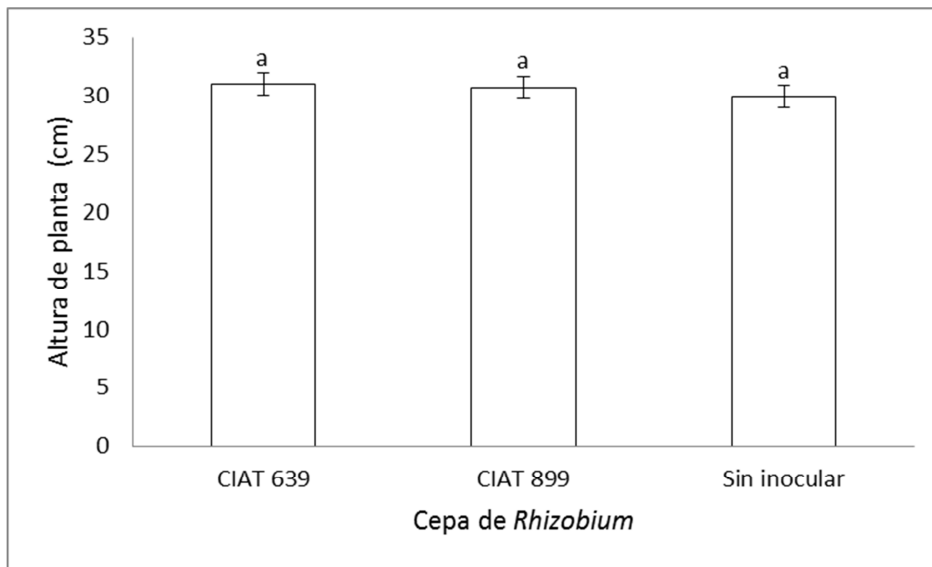


Figura 5. Efecto del factor inoculación con *Rhizobium*, sobre la altura de la planta en la variedad de frijol Nambí.

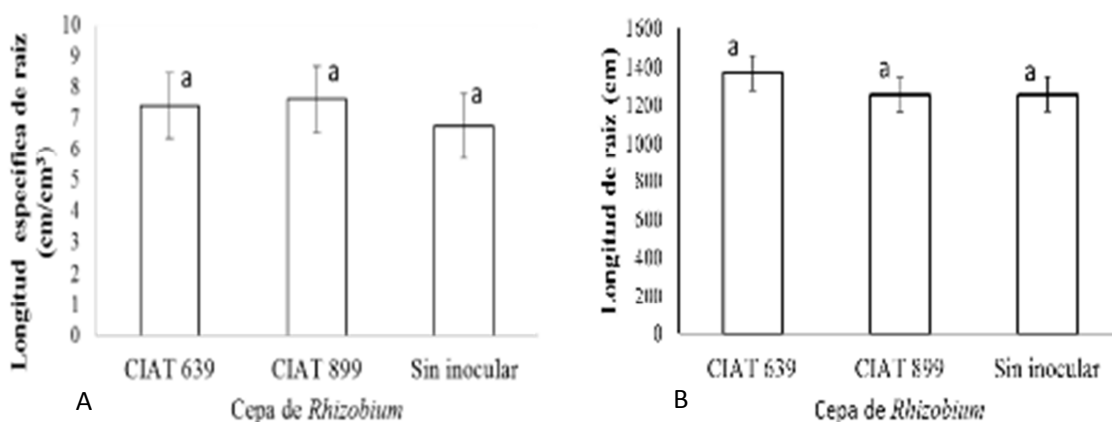


Figura 6. Efecto del factor inoculación con *Rhizobium* sobre la longitud específica (A) y la longitud de la raíz (B) en la variedad de frijol Nambí.

La inoculación con *Rhizobium* tuvo como consecuencia un efecto positivo en el peso aéreo de la planta de frijol con la cepa CIAT 899. Es conocido que la inoculación con cepas de *Rhizobium* en leguminosas, como lo es el frijol común favorece la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Graham, 1981; Barboza, 2015; Cruz, 2014). Al ser el nitrógeno uno de los nutrientes más limitantes en los suelos y por lo tanto en la producción agrícola (Bertsch, 1995), al utilizar inoculantes, se contribuye a la FBN y provoca un mayor desarrollo del cultivo, como ocurrió en este caso.

Existen estudios previos usando diferentes variedades de frijol en zonas frijoleras de Costa Rica, como el realizado por Acuña y Castro, (1996), en el cual con la cepa CIAT 166, se logró el mejor peso seco foliar, incluso superando al tratamiento fertilizado con nitrógeno. Sin embargo, dentro del mismo ensayo el comportamiento fue diferente dependiendo de la variedad de frijol utilizada, la cepa de *Rhizobium*, y la localidad. En este caso, la cepa CIAT 899 y la cepa CIAT 639 mostraron un comportamiento diferente. La cepa CIAT 899, demostró en un estudio realizado por Hungría *et al*, (2003), en el estado de Paraná, Brasil, ser una cepa altamente competitiva al lograr establecerse en un suelo con alto contenido de *Rhizobium* nativo, obteniendo una mayor producción que el control, sin fertilización nitrogenada.



Cuando se evaluó el factor inoculación con *Azospirillum brasilense*, se encontró que para las variables peso fresco y seco de la parte aérea hubo diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y sin inocular. El mayor peso se obtuvo en el suelo inoculado con la cepa *A. brasilense* (Figura 7).

Al inocular el suelo con *Azospirillum brasilense* se presentó mayor acumulación de biomasa, que se reflejó en un mayor peso fresco y seco de la parte aérea (Figura 7). Un efecto positivo, producto de la co-inoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum brasilense* fue también observado por Hungría *et al* (2013). En un ensayo efectuado a nivel de campo, utilizando la cepa CIAT 899 y la variedad IPR-Colibrí, los autores observaron con respecto al tratamiento testigo, un incremento de 98 kg/ha (8,3%) con la inoculación de únicamente *Rhizobium tropici*, y de 285 (19,6 %) kg/ha cuando se co-inoculó con *A. brasilense*. Resultados similares, reporta el mismo autor, para soya, donde obtuvo un incremento promedio de 420 kg/ha (14,1 %), con la co-inoculación, sobre el control, suelo no inoculado. Finalmente, en las demás variables: altura de planta (Figura 8 A), longitud de raíz (Figura 8 B), y superficie específica de la raíz (Figura 9), no hubo diferencias significativas.

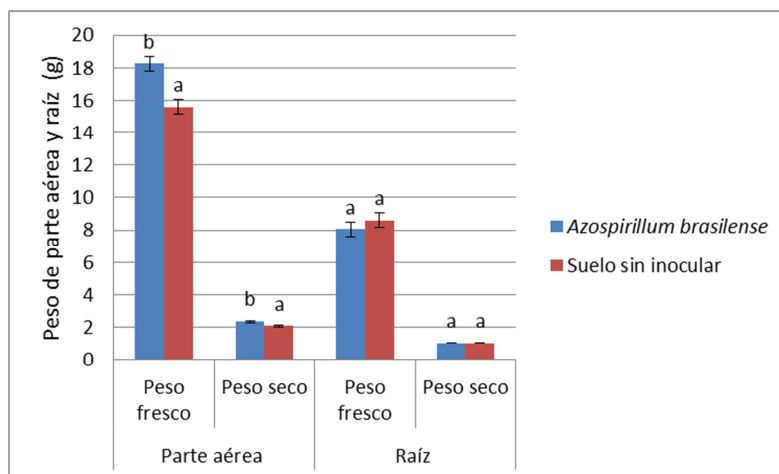


Figura 7. Efecto del factor inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Nambí.

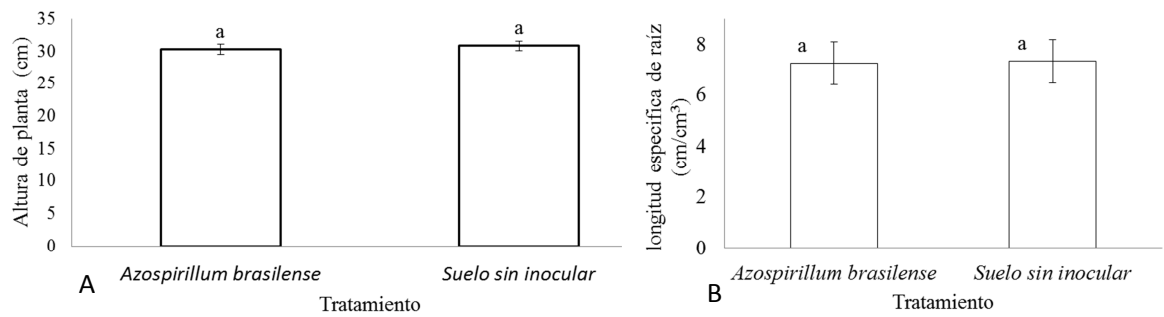


Figura 8. Efecto del factor inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre altura de planta (A) y longitud específica de raíz (B) de la variedad de frijol Nambí.

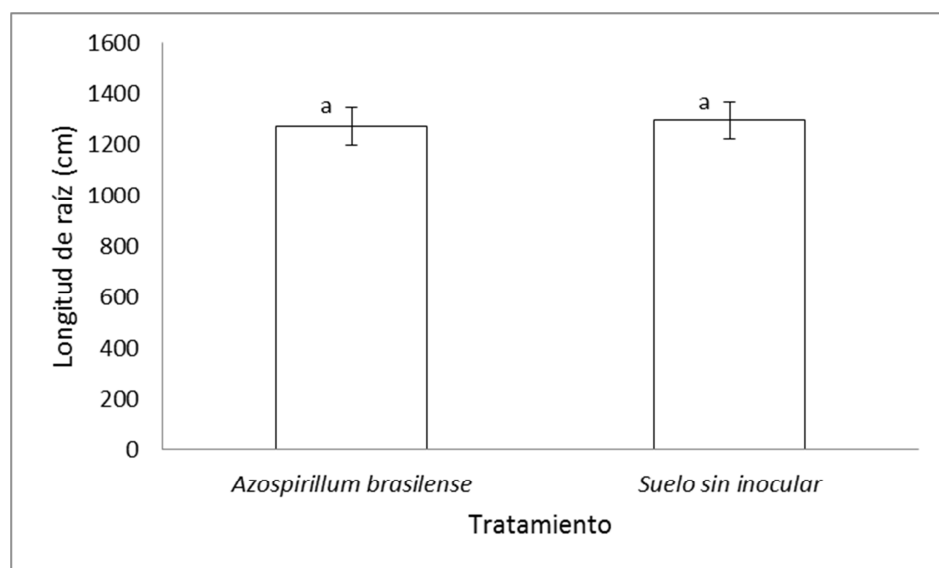


Figura 9. Efecto del factor inoculación con *Azospirillum brasilense* sobre la longitud de la raíz en la variedad de frijol Nambí.

En el cuadro 3 se puede observar el número y peso fresco de nódulos para las plantas de frijol de la variedad Nambí. El número de nódulos varió de 0 a 82 y el peso de 0 a 239 mg. A pesar de que existen diferencias significativas entre los tratamientos, se puede indicar que la producción de nódulos fue pobre y errática (Cuadro 3). Si bien las plantas fueron inoculadas, no todas formaron nódulos y la nodulación por cepas nativas fue escasa. Los tratamientos que obtuvieron el mayor porcentaje de plantas con nódulos fueron los inoculados con la cepa CIAT 639 con un 60%, seguida por la cepa CIAT 899 (Figura 10) con un 40% y los que menos plantas noduladas presentaron fueron los tratamientos sin inocular (35%). La presencia de cepas nativas de *Rhizobium* fue pobre en la variedad de frijol Nambí con nódulos muy pequeños en comparación con los tratamientos que fueron inoculados con cepas de *Rhizobium*. Estos resultados pueden deberse a la deficiencia de fósforo en el suelo (Valladares, 2009); a un bajo pH, o alta concentración de aluminio y manganeso (Graham, 1981).

De acuerdo a los valores expresados en el cuadro 3, cuando se utilizó la cepa CIAT 899, sin la aplicación de molibdeno, esta fue capaz de producir la mayor cantidad de nódulos, esto se debe probablemente a que es una cepa muy competitiva, capaz de sobrevivir y colonizar suelos con condiciones adversas como el suelo utilizado en este experimento (Campos, 1995; Graham *et al*, 1982; Martínez-Romero, 1991). Sin embargo, cuando se utilizó la cepa de *Azospirillum* en combinación con la cepa CIAT 899 no se encontraron nódulos, lo que se debe probablemente a que la presencia *Azospirillum* inhibió la nodulación del *Rhizobium*, un efecto similar fue también observado por Remans *et al*, (2008), con la variedad DOR 364. La nodulación de las plantas inoculadas con la cepa CIAT 639 no se vio afectada por la inoculación con *Azospirillum*. Por su parte, en el tratamiento sin inocular la aplicación de *Azospirillum* en los suelos sin molibdeno redujo la nodulación. A partir de los nódulos se lograron recuperar las cepas CIAT 899 y CIAT 639 en medio de cultivo, en los tratamientos en los que fueron inoculados.

**Cuadro 3.** Efecto de los tratamientos aplicados sobre número de nódulos, peso fresco y porcentaje de plantas que presentaron nodulación de la variedad de frijol Nambí.

Tratamiento	Nº de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	% plantas con nódulos
CIAT 639 + Mo + DSM1859	32,4 abcd	85abc	60
CIAT 639 + Mo	8,4 abcd	21abc	40
CIAT 639 + DSM1859	48,6 cd	189 c	80
CIAT 639	28,2bcd	65bc	80
CIAT 899 + Mo + DSM1859	0a	0a	0
CIAT 899 + Mo	40,8bcd	71bc	80
CIAT 899 + DSM1859	0 a	0 a	0
CIAT 899	82,0 d	239 c	80
SSI + Mo + DSM1859	0,4 ab	0,8 ab	40
SSI + Mo	2,0abc	2abc	40
SSI + DSM1859	0 a	0 a	0
SSI	6,4abcd	14 abc	60

SSI: Suelo sin inocular. Mo: Molibdeno. CIAT 639: *Rhizobium sp.*, CIAT 899: *Rhizobium tropici*, *Azospirillum brasilense*: DSM1859.

Medias con una letra común no son significativamente deferentes ( $p > 0,05$ ).



Figura 10. Raíz de frijol con nódulos, variedad Nambí, tratamiento CIAT 899 + Mo.

El suelo utilizado en este ensayo es de fertilidad baja, característica del orden Ultisol, (Bertsch, 1995). Posee un bajo pH, problemas de acidez, es bajo en calcio, fósforo y zinc (Cuadro 1). Sin embargo, esas son las condiciones en las que producen los agricultores en la zona de San Isidro de Labrador, sitio del cual es oriundo este suelo. Únicamente fue aplicado fósforo antes de la siembra, como fertilización base. El fósforo es el factor que más limita la FBN (Bonilla y Bolaños 2010; Remans et al, 2007; Kandil et al, 2013; Weisany, 2013), al igual que bajas concentraciones de molibdeno, calcio y boro. Por su parte Ghahan (1981), menciona que entre los problemas edáficos de los suelos dedicados al cultivo de frijol en Latinoamérica se encuentran, bajo contenido de fósforo, azufre, calcio y deficiencias de micronutrientes. Es posible que, al utilizar un suelo tan degradado química y biológicamente, estos elementos se encuentren en concentraciones no aptas para la adecuada FBN, como se puede observar en el (cuadro 1), análisis de suelo, lo que pudo haber contribuido a la baja producción de nódulos.

## **Contenido de nutrientes en la parte aérea de la planta de frijol Nambí**

El nitrógeno y el fósforo, para frijol son muy importantes, y a su vez constituyen los nutrientes más limitantes en los suelos agrícolas (Bertsch, 1995). En la revisión realizada por Bolaños y Bonilla (2010) mencionan que la fijación biológica de nitrógeno es una simbiosis no obligada, por lo tanto, cuando se encuentran niveles altos de N en el suelo, esta no ocurre, además es un proceso altamente dependiente de energía, donde el fósforo es clave, ya que está ligado a los procesos fisiológicos de la planta, como lo es la generación de ATP.

En el suelo en estudio se reportó una concentración de 3 mg fósforo, muy por debajo del nivel crítico de 10 mg (Méndez *et al*, 2012). Además, se encontraron por debajo del nivel crítico el zinc, calcio; así como pH bajo y como consecuencia se presentó una acidez alta. A pesar de que fue realizada una fertilización fosfórica, (208 kilogramos de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), otros factores pudieron haber afectado la adquisición de este nutriente ya que se encontró una baja concentración de P en el tejido de la planta (Cuadro 6). Esto se reafirma en los trabajos realizados por Acuña *et al*, (1989) y Castro *et al*, (1993); que demostraron que un nivel adecuado de fósforo y el uso de dos cepas efectivas de *Rhizobium* favorece la fijación biológica de nitrógeno en suelos de baja fertilidad. Tomando como referencia la tabla de interpretación de análisis foliar en frijol (Molina y Meléndez, 2002), el contenido de nutrientes para la variedad Nambí en el caso del nitrógeno para la mayoría de los tratamientos fue bajo (Cuadro 4). La concentración de N varió de 2,70% a 4,70%, a pesar de los bajos contenidos, con la aplicación de inoculantes microbianos y Mo se obtuvieron los niveles adecuados (3,71 % y de 4,70 %, específicamente en los tratamientos: CIAT 639 + Mo + DSM1859 y CIAT 899 + Mo + DSM1859 respectivamente; ello a pesar de la escasa nodulación, probablemente la cepa de *Azospirillum* contribuyó a la adquisición de nutrientes y a la fijación de N. Cabe destacar que los tratamientos inoculados con *Azospirillum* presentaron valores más altos que el respectivo tratamiento sin *Azospirillum*. El contenido de fósforo, boro y cobre fue bajo en todos los tratamientos; variando de 0,22

% a 0,32 %, 16 mg/kg a 21 mg/kg y 6 mg/kg a 9 mg/kg, respectivamente, el calcio se encontró a una concentración suficiente, excepto para los tratamientos CIAT 899 y suelo sin inocular (SSI). En estos casos la concentración fue baja; los contenidos de magnesio, potasio y azufre fueron suficientes para todos los tratamientos; en el caso del hierro y zinc alcanzó el nivel de suficiente para todos los tratamientos; y finalmente el manganeso se encontró entre los rangos de suficiente a alto.

Kandil, (2013) por su parte concluyó que al aumentar la fertilización fosfórica se incrementan el contenido de macro y micro nutrientes. A pesar de que el fósforo pudo ser una factor limitante la absorción de nitrógeno se vio favorecida por la inoculación con *Azospirillum brasilense*, y en menor grado con *Rhizobium*, la inoculación solo con *Azospirillum brasilense*, puede ser una buena alternativa para los productores de este grano de bajos insumos. Otras investigaciones, como la efectuada por Remans (2008), en la que se evaluaron dos variedades de frijol (BAT 477 y DOR 364) en tres sitios en Cuba, encontraron que para la variedad DOR364, la co-inoculación *Rhizobium-Azospirillum* comparada con solo la inoculación con *Rhizobium* incrementó la cantidad de nitrógeno fijado y la producción de grano, al contrario en la variedad BAT 477, el efecto de la co-inoculación *Rhizobium-Azospirillum*, redujo la fijación de nitrógeno y la producción, comparada con la inoculación únicamente con *Rhizobium*.

Al parecer, la producción de nódulos por la cepa de *Rhizobium* CIAT 899 fue inhibida por la presencia de *Azospirillum*, los tratamientos CIAT 899 + Mo + DSM1859 y CIAT 899 + DSM1859 (Cuadro 3). Sin embargo, con las combinaciones antes citadas se logró la mayor concentración de nitrógeno en la parte aérea, por lo tanto, es de esperar que dicho nitrógeno fuera fijado por el *Azospirillum* (Figura 11).

**Cuadro 4.** Análisis foliar de la parte aérea variedad de frijol Nambí.

Tratamiento	% <sup>1</sup> masa						mg/Kg					
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	
CIAT 639 + Mo + DSM1859	3,71	0,32	1,37	0,44	5,04	0,39	227	7	34	280	19	
CIAT 639 + Mo	3,39	0,22	1,61	0,47	4,12	0,30	305	7	27	150	18	
CIAT 639 + DSM1859	3,17	0,23	1,49	0,46	4,10	0,31	210	6	28	177	21	
CIAT 639	2,70	0,25	1,44	0,43	3,96	0,31	238	7	28	156	20	
CIAT 899 + Mo + DSM1859	4,70	0,25	1,94	0,62	4,34	0,32	274	7	33	307	21	
CIAT 899 + Mo	2,81	0,24	1,61	0,47	4,03	0,31	218	7	28	165	19	
CIAT 899 + DSM1859	4,37	0,22	1,68	0,54	4,35	0,33	259	6	30	215	17	
CIAT 899	3,01	0,29	1,16	0,36	4,48	0,36	269	6	29	216	20	
SSI + Mo + DSM1859	3,99	0,23	1,58	0,53	4,13	0,30	231	6	30	222	17	
SSI + Mo	3,33	0,23	1,15	0,41	4,39	0,35	235	8	32	345	17	
SSI + DSM1859	4,12	0,24	1,57	0,54	4,10	0,30	202	9	31	203	14	
SSI	2,83	0,23	1,06	0,36	4,60	0,31	182	6	29	256	16	

SSI: Suelo sin inocular. Mo: Molibdeno. CIAT 639: *Rhizobium sp.*, CIAT 899: *Rhizobium tropici*, *Azospirillum brasilense*: DSM185



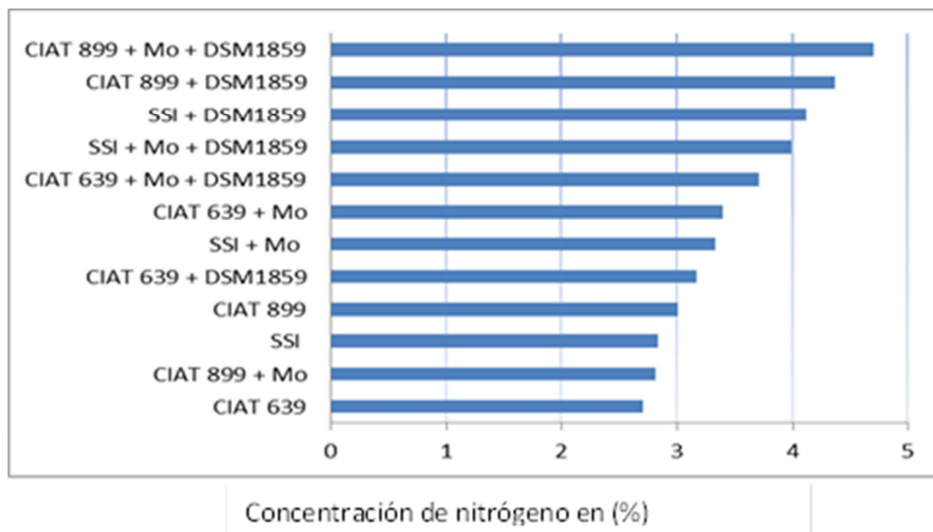


Figura 11. Efecto de los tratamientos sobre la concentración de nitrógeno en la parte aérea de la variedad de frijol Nambí.

## Variedad Cabécar

Como se observa en el (Cuadro 5), cuando se estudió el factor inoculación con *Rhizobium*, se presentaron diferencias significativas ( $P < a 0,05$ ) en las variables altura de planta, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y superficie específica de la raíz. Los factores molibdeno y *Azospirillum* no tuvieron efecto en ninguna de las variables estudiadas; al igual que las interacciones de los factores ( $P > a 0,05$ ).

**Cuadro 5.** Efecto de cada uno de los factores y sus interacciones con su respectiva probabilidad (p) para las variables altura de planta, peso fresco y seco de parte aérea, peso fresco y seco de raíz, superficie específica y longitud de raíz en la variedad de frijol Cabécar.

Interacciones	Altura de planta (cm)	Peso parte aérea (g)		Peso parte radical (g)		Superficie Específica de raíz (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )	Longitud de raíz (cm)
		Fresco	Seco	Fresco	Seco		
<i>Rhizobium</i>	0,0005	0,3225	0,0003	0,084	0,0026	0,0316	0,0808
Molibdeno	0,6774	0,3176	0,2822	0,2949	0,2354	0,3842	0,0981
<i>Azospirillum</i>	0,2307	0,7971	0,4829	0,2498	0,2158	0,9974	0,9000
<i>Rhizobium</i> *Molibdeno	0,4777	0,068	0,3658	0,7135	0,6813	0,5069	0,7765
<i>Rhizobium</i> * <i>Azospirillum</i>	0,4787	0,4906	0,1194	0,6298	0,1140	0,0778	0,9864
Molibdeno* <i>Azospirillum</i>	0,1747	0,6436	0,5621	0,9875	0,7402	0,4037	0,8935
<i>Rhizobium</i> *Molibdeno* <i>Azospirillum</i>	0,3153	0,3684	0,5139	0,6094	0,7148	0,1990	0,9310

Como se observa en la (Figura 12), cuando se estudió el factor inoculación con la cepa de *Rhizobium*, sobre las variables, peso fresco y seco de la parte aérea y peso fresco y seco de la raíz, se encontró que el tratamiento que presentó los mejores resultados fue la

inoculación con la cepa CIAT 639, que se diferenció significativamente del suelo sin inocular y de la cepa CIAT 899. En el caso de la altura de la planta (Figura 13) no hubo diferencias significativas.

En el caso de la superficie específica de la raíz (Figura 14 A), la cepa CIAT 639 presentó un valor significativamente menor que el tratamiento sin inocular y la cepa CIAT 899. En lo que respecta a la longitud de la raíz, para la cepa CIAT 899 fue significativamente mayor que la obtenida para la cepa CIAT 639 (Figura 14 B), ninguna de las cepas se diferenció de las plantas sin inocular. Al comparar la respuesta de la inoculación con *Azospirillum* el efecto fue diferente al encontrado cuando se empleó la variedad Nambí. En este experimento la mejor respuesta se dio con la cepa CIAT 639, por lo tanto, se nota una interacción cepa variedad, fenómeno que se ha sido observado por Remans *et al*, (2008); Valladares, (2009); Acuña y Castro (1996) y Uribe *et al*, (1990).

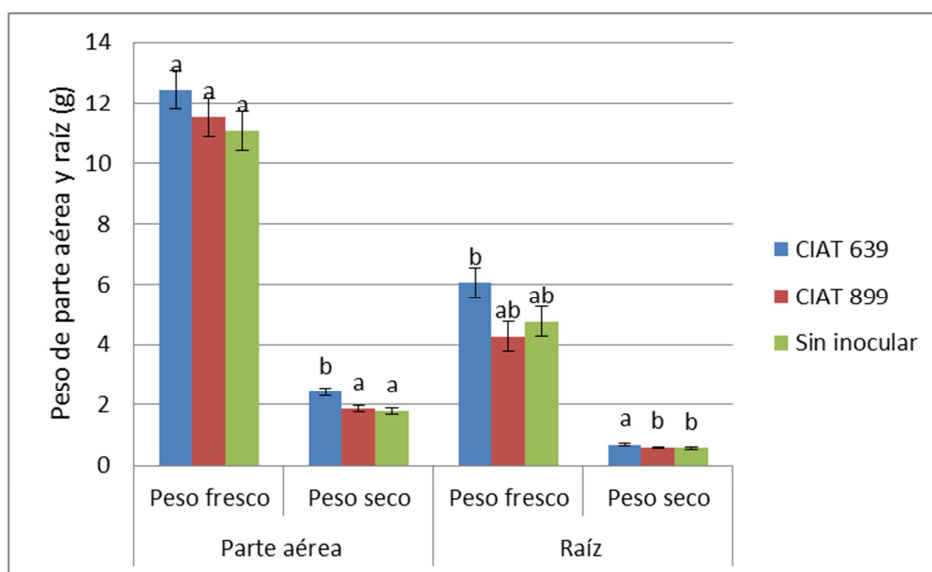


Figura 12. Efecto del factor *Rhizobium* sobre el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz de la variedad de frijol Cabécar.

El número de nódulos, para la variedad Cabécar se presentan en el cuadro 6. El número de nódulos varió de 0 a 30 y el peso de 0 a 187 mg. A pesar de que existen diferencias significativas entre los tratamientos, se puede indicar que la producción de nódulos fue pobre y errática. Si bien las plantas fueron inoculadas, no todas formaron nódulos y la nodulación por cepas nativas fue escasa. Los tratamientos que obtuvieron el mayor porcentaje de plantas con nódulos fueron los inoculados con la cepa CIAT 639 con un 70%, seguido por el suelo sin inocular 10 % mientras que el inoculado con la cepa CIAT 899 mostró un 5% de plantas con nódulos. La presencia de cepas nativas de *Rhizobium*, fue escasa en la variedad de frijol Cabécar.

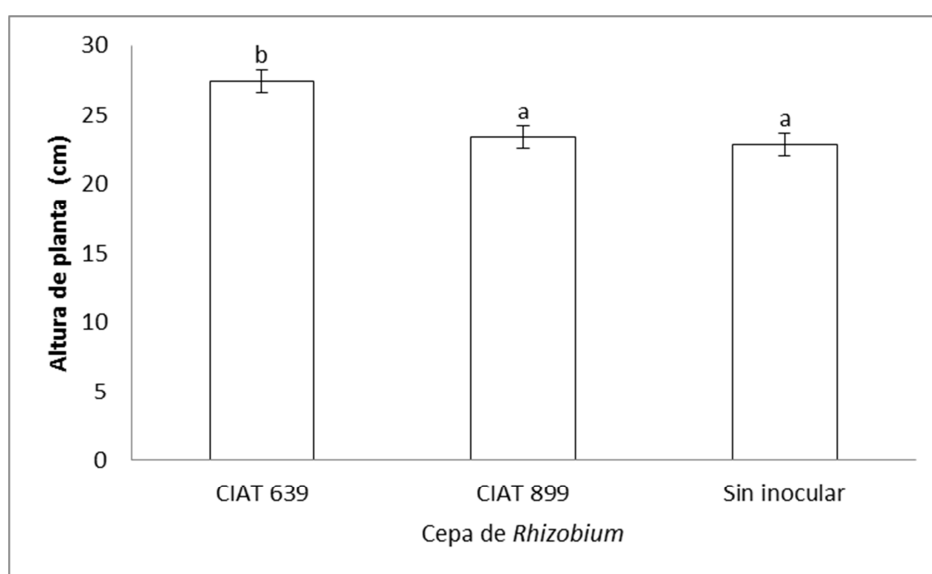


Figura13. Efecto del factor *Rhizobium* sobre la altura de la planta en la variedad de frijol Cabécar.

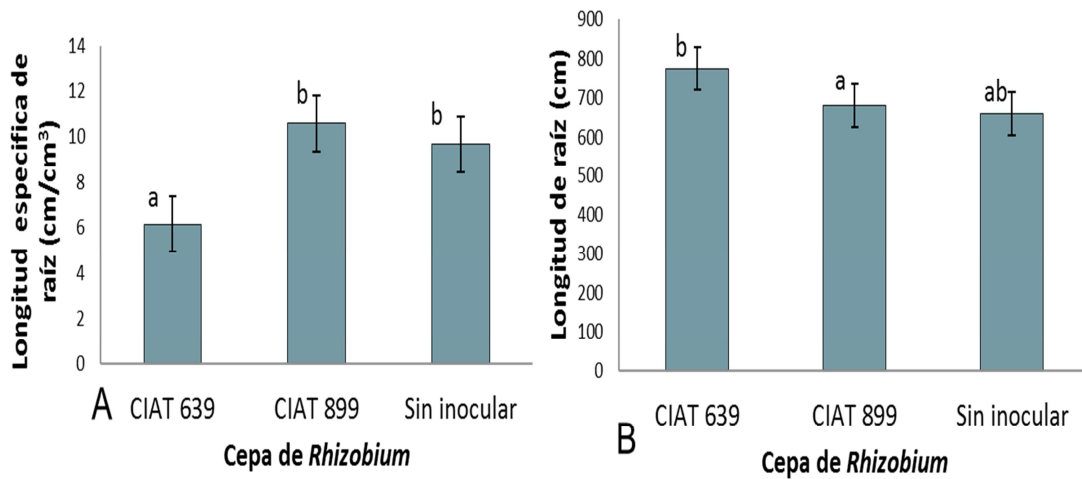


Figura 14. Efecto del factor *Rhizobium* sobre la superficie específica de la raíz (A) y longitud de raíz (B) en la variedad de frijol Cabécar.

A partir de los nódulos se lograron recuperar las cepas CIAT 899 y CIAT 639 en medio de cultivo, en los tratamientos en los que fueron inoculados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las variedades de frijol respondieron de forma diferente a la inoculación con *Rhizobium*, fenómeno que ha sido observado por Remans *et al.* (2008); Valladares, (2009); Acuña y Castro (1996) y Uribe *et al.* (1990).

**Cuadro 6.** Efecto de los tratamientos aplicados sobre número de nódulos, su peso fresco y porcentaje de plantas que presentaron nodulación de la variedad de frijol Cabécar.

Tratamiento	Nº de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	% plantas con nódulos
CIAT 639 + Mo + DSM1859	30,20bcd	187bcd	80
CIAT 639 + Mo	26,0cd	110cd	80
CIAT 639 + DSM1859	4,60abc	14ab	20
CIAT 639	30 d	119d	100
CIAT 899 + Mo + DSM1859	0,0a	0a	0
CIAT 899 + Mo	0,20ab	0,4ab	20
CIAT 899 + DSM1859	0,0a	0a	0
CIAT 899	0,0a	0a	0
SSI + Mo + DSM1859	0,0a	0,a	0
SSI + Mo	1,40abc	5abc	40
SSI + DSM1859	0,0a	0a	0
SSI	0,0a	0aa	0

SSI: Suelo sin inocular. Mo: Molibdeno. CIAT 639: *Rhizobium sp.*, CIAT 899: *Rhizobium tropici*, *Azospirillum brasilense*: DSM1859

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

### **Contenido de nutrientes en la parte aérea de la planta de frijol variedad Cabécar**

Cuando se estudió el contenido de nutrientes en la variedad Cabécar (Cuadro 7), se encontró que la concentración de nitrógeno y fósforo fue baja oscilando de 2,33 % a 3,89 % y de 0,20 % a 0,26 % respectivamente; por debajo del nivel crítico de 4,5 % para nitrógeno y de 0,35 % establecido según Molina Y Meléndez (2002) para frijol. En lo referente al calcio y al magnesio la concentración encontrada fue suficiente, mayor a 1,3 % y 0,35 % respectivamente, en la mayoría de tratamientos.

El potasio se encontró en el rango de suficiente a alto, con los tratamientos SSI + DSM1859, CIAT 899 + DSM1859, CIAT 899 y SSI + Mo + DSM1859 se logró las mayores concentraciones (Figura 15).

En lo que respecta al cobre, todos los tratamientos con excepción del CIAT 639 presentaron valores menores a 15 mg/kg, cabe destacar que los tratamientos CIAT 639 + Mo + DSM1859 y CIAT 899 + Mo + DSM1859 presentaron valores más altos que los respectivos tratamientos sin *Azospirillum* y sin Mo (Cuadro 7).

En lo referente al boro, este varió de 16 mg/Kg a 31 mg/kg, presentando en la mayoría de los tratamientos, valores bajos, menores a 20 mg/kg, sin embargo, en el tratamiento CIAT 639 + Mo + DSM1859 este elemento presentó valores por encima del nivel crítico (Cuadro 7).

Por su parte para los elementos hierro, manganeso, potasio y azufre presentaron niveles de suficiente a alto en todos los tratamientos (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Análisis foliar de la parte aérea de variedad de frijol Cabecar

Tratamiento	% <sup>1</sup> masa						mg/Kg				
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
CIAT 639 + Mo + DSM1859	2,83	0,22	1,39	0,37	2,99	0,37	8862	23	49	241	31
CIAT 639 + Mo	2,46	0,21	1,28	0,36	3,06	0,27	465	7	33	164	16
CIAT 639 + DSM1859	3,46	0,25	1,55	0,50	3,95	0,31	601	8	41	367	16
CIAT 639	2,33	0,20	1,09	0,32	3,01	0,28	1112	9	32	177	16
CIAT 899 + Mo + DSM1859	3,26	0,20	1,41	0,45	3,66	0,36	4117	14	41	326	19
CIAT 899 + Mo	3,80	0,25	1,61	0,47	3,82	0,33	1178	9	44	410	20
CIAT 899 + DSM1859	3,89	0,21	1,09	0,38	4,19	0,37	806	8	46	353	14
CIAT 899	3,61	0,25	1,53	0,45	4,15	0,35	517	8	42	396	17
SSI + Mo + DSM1859	3,76	0,24	1,47	0,50	4,13	0,36	1673	10	43	346	16
SSI + Mo	3,25	0,22	1,40	0,45	3,95	0,32	624	8	43	329	17
SSI + DSM1859	3,88	0,26	1,36	0,46	4,26	0,34	506	8	45	363	19
SSI	3,08	0,20	1,40	0,47	3,84	0,34	1734	10	43	308	17

SSI: Suelo sin inocular. Mo: Molibdeno. CIAT 639: *Rhizobium sp.*, CIAT 899: *Rhizobium tropici*, *Azospirillum brasilense*: DSM1859



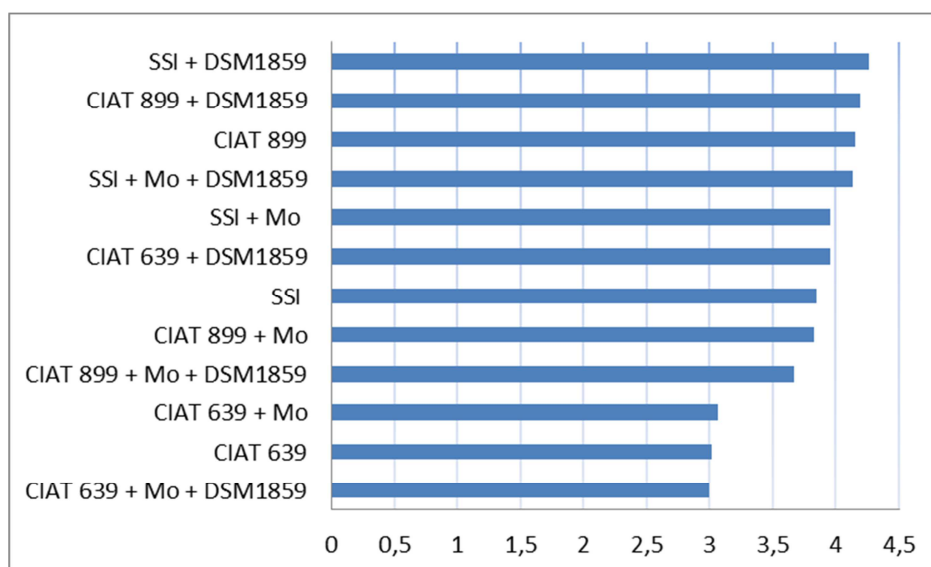


Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la concentración de potasio en la parte aérea de la variedad de frijol Cabécar.

### Respuesta Variedad – Cepa de *Rhizobium* y *Azospirillum*

La respuesta de las dos variedades a los tratamientos fue diferente, la variedad Nambí respondió mejor a la inoculación con la cepa CIAT 899, *Rhizobium tropici*, mientras que la variedad Cabécar a la cepa CIAT 639. En la variedad Nambí hubo efectos significativos sobre el peso fresco y seco, en el frijol Cabécar no hubo respuesta, por lo tanto, existe una interacción entre variedad y las rizobacterias utilizadas, como ha sido observado en otros estudios por Remans (2008), Graham (1981); Acuña y Castro (1996) y Uribe *et al*, (1990).

Por otro lado, la respuesta al *Azospirillum brasilense* difirió tanto entre variedades como entre cepas de *Rhizobium*. La cepa de *Rhizobium* CIAT 899 fue inhibida por la presencia de *Azospirillum* en ambas variedades de frijol cuadros 3 y 6.

En cuanto a la acumulación de nutrientes en la parte aérea, el comportamiento en ambas variedades fue muy similar, siendo favorecida con la co-inoculación. La variedad Nambí tuvo un crecimiento más vigoroso en comparación con la variedad Cabécar.

## CONCLUSIONES

Para la variedad de frijol negro Nambí, se observaron diferencias significativas en el factor inoculación con cepas de *Rhizobium* para las variables peso fresco y seco de la parte aérea, encontrándose un mayor peso fresco y seco con la inoculación de la cepa CIAT 899 con respecto al tratamiento sin inocular. En el caso de la variedad Cabécar fueron encontradas diferencias significativas para las variables altura de planta, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz, la cepa que presentó los mejores resultados fue la CIAT 639, que se diferenció significativamente del suelo sin inocular y la cepa CIAT 899.

Con respecto al factor inoculación con *Azospirillum* en la variedad Nambí favoreció el crecimiento de la parte aérea y en la Cabécar no tuvo ningún efecto significativo.

Mientras que el factor adición de molibdeno no tuvo efecto sobre las variables evaluadas en las dos variedades.

Si bien la mayor cantidad de nódulos se presentó en los tratamientos que fueron inoculados con alguna de las cepas de *Rhizobium*, CIAT 639 y CIAT 899, la nodulación fue escasa para ambas variedades.

La inoculación con *Azospirillum* tuvo un efecto negativo sobre la nodulación de la cepa de *Rhizobium* CIAT 899 ya que no ocurrió nodulación en ninguna de las variedades estudiadas.

Las concentraciones de nitrógeno foliar fueron bajas en las dos variedades sin embargo en los tratamientos en los cuales estaba presente el *Azospirillum* (DSM1859) se encontraron en el rango alto. Las concentraciones de fósforo fueron bajas en las dos variedades.

## **RECOMENDACIONES**

Evaluar el uso de insumos por parte del agricultor, como un encalado moderado, una tonelada de carbonato de calcio por año.

Evaluar dosis crecientes de molibdeno en invernadero con el fin de establecer la cantidad adecuada en la que se logre una respuesta significativa.

Realizar la co-inoculación a nivel de campo para evaluar la respuesta de las variedades, con la cepa CIAT 639.

## REFERENCIAS

- ACUÑA O., CASTRO L. 1996. Efecto de la variedad de frijol y la cepa de *Rhizobium* sobre la respuesta a la inoculación en tres localidades de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 20 (2): 151-157.
- ACUÑA O., CORDERO A. 1989. Efecto de diferentes dosis de molibdeno, fósforo y calcio sobre la nodulación y crecimiento de frijol en un Ultisol de Puriscal. *Agronomía Costarricense* 13 (2): 193-196.
- ACUÑA O., URIBE L. 1996. Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 35-40.
- AL-FALIH A.M.K. 2002. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* .5: (11):1277 -1293.
- ANAME M.I.V., VIERIA C., NOVAIS R.F., ARAÚJO G.A.A. 1999. Adubação nitrogenada e molíbdica da cultura do feijão na zonz da Mata de Minas Gerais. *R, Bras. Ci. Solo.* 23:643-650.
- ARNON D. I., STOUT P. R. 1939. Molybdenum as an essential element for higher plants. *Plant Physiology* 14: 599-602.
- BANO Q., ILYAS N., BANO A., ZAFAR N., AKRAM A., HASSAN F. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pakistan Journal of Botany.* 2013 (45):13–20.
- BÁRBARO I.M., BRANCALIÃO S.R., TICELLI M., MIGUEL F.B. SILVA J.A.A. 2008. Técnica alternativa: Co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. Consultado el 21 de setiembre 2018. Disponible en: [http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/coinoculacao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm)
- BARBOSA DE SOUZA J.E. 2015. Co-inoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* no feijoeiro-comum visando aumento de produtividade e redução de custo de produção. Tesis Msc. Goiânia – GO, Brasil. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia. 85 p.
- BASHAN Y., HOLGUIN G., DE-BASHAN L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50: 521-577.
- BASHAN Y., HOLGUIN, G., FERRERA-CERRATO R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I *Azospirillum*. *Terra* 14(2):159-193.

- BENEDUZI A., AMBROSINI A., PASSAGLIA LMP. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35(4):1044-1051.
- BERTSCH F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. San José, Costa Rica. ACCS. 157 P.
- BHATTACHARYYA D. K., JHA, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology* 28: 1327-1350.
- BONILLA I., BOLAÑOS L. 2010. Mineral nutrition for legume-rhizobia symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co and Ni: a review. *In* Lichtfouse E. (ed.). *Organic farming, Pest and Remediation of soil pollutions*. Berlin, German. Springer-Verlag. p. 253-349.
- BROUGHTON W., HÉRNANDEZ G., BLAIR M., BEEBE S., GEPTS P., VANDERLEYDE 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 (5-6): 923-929.
- CAMPOS R. 1995. Selección in vitro de *Rhizobium* tolerante a la acidez y aluminio. *Agronomía Colombiana* 12 (2): 142-148.
- CASSAN F., DÍAZ-ZORITA M. 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology & Biochemistry* 103: 117-130.
- CASTELLANOS M., ESPINOSA C., ALMOGUEA M. 2015. Uso de *Azospirillum* en la agricultura. *Agrosistemas* 3 (1): 401-413.
- CASTRO L., URIBE L., ALVARADO A. 1993. Efecto del enriquecimiento del inoculante de *Rhizobium* con dosis crecientes de P sobre el crecimiento de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomía Costarricense* 17(1): 55-59.
- CIAT (CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS TROPICALES). 1986. Simbiosis Leguminosa\_Rizobio: Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. 191 p.
- CIAT (CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS TROPICALES). 1987. Etapas de desarrollo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). 36 p.

- CRUZ M. 2014. Validación de diferenciales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) para evaluar la respuesta a la inoculación con cepas de *Rhizobium*. Tesis Lic. Honduras. Zamorano. 28 p.
- CUADRADO B., RUBIO G., SANTOS W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionadas en los cultivos de frijol Caupi. (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 38 (1): 78-104.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado el 17 de mayo 2018. Disponible en: URL <http://www.infostat.com.ar>
- DÖBEREINER J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. Soil Biology Biochemistry 29 (5/4): 771-774.
- ENCKEVORT P.V., UGALDE M., DOMIAN F., VÁSQUEZ J. 1994. Estudio de suelos y capacidad de uso en las áreas-piloto 4: Labrador de San Mateo. San José, Costa Rica. MAG-FAO. 53P.
- FERLINI H.Á. 2006 Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Artículos Técnicos - Agricultura. Consultado el 21 de setiembre. Disponible en: [http://www.engormix.com/co\\_inoculacion\\_soja\\_glycine\\_s\\_articulos\\_800\\_AGR.htm](http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm).
- FIRA (FIDEICOMISO INSTITUCIONAL EN RELACIÓN CON LA AGRICULTURA). 2016. Frijol 2016. México. 36 P.
- FUKAMI J., CEREZINE P., HUNGRIA M. 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express 8 (73) : 1-12.
- GALKOVSKYI T., MILEYKO Y., BUCKSCH A., MOORE B., SYMONOVA O., PRICE C.A., TOPP C.N., IYER-PASCUZZI A.S., ZUREK P.R., FANG S., JOHN HARER J., N BENFEY P.N., WEITZ J.S. 2012. GiA Roots: software for the high throughput analysis of plant root system architecture. BMC Plant Biology 12 (116): 1471-1483.
- GAMALERO E., GLICK B.R. 2011. Mechanisms used by plant growth promoting bacteria. In Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management. MAHESHWARI D.K. (ed). Berlin, German. Springer-Verlag. p. 17-46.

- GARCÍA J., PUENTE M., MARONICHEA G., PERTICARI A. 2013. Estudio de *Azospirillum* como tecnología aplicable en los cultivos de trigo y maíz. In ALBANESI A. (edi.). Microbiología Agrícola un Aporte de la Investigación. Tucumán, Argentina. Magna Publicaciones. P. 351-366.
- GRAHAM P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. Field Crops Research 4:93-112.
- GRAHAM P.H., VITERE S.E., MACKIE F., VARGAS A.T., PALACIOS A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium Phaseoli*. Field Crops Research 5: 121-128.
- HERNÁNDEZ J.C., CHAVES N. 2016. Nambí Variedad de frijol resistente a la sequía. P. 2.
- HERNÁNDEZ JC; ARAYA, R. 2003. Programa de Investigación y Transferencia Tecnología Agropecuaria en Frijol. (PITTA FRIJOL). Informe Técnico de la Variedad Cabécar, Para su Inscripción en el registro de Variedades Comerciales de la Oficina Nacional de Semillas. San José, Costa Rica. P. 28.
- HUNGRIA M., CAMPO R.J., CARVALHO I. 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. Biology fertility Soils 39: 88-93.
- HUNGRIA M., NOGUEIRA M.A., SILVA ARAUJO R. 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. Biology fertility Soils 39. 88-93.
- INFOAGRO. 2016. Boletín Estadístico Agropecuario N°26. SEPSA. San José Costa Rica. 210 p.
- INFOAGRO. 2017. Boletín Estadístico Agropecuario N°26. SEPSA. San José Costa Rica. 221 p.
- INTA (INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AGROPECUARIA). 2016. Memoria Institucional 2016 1: 33-34.
- KAISER B., GRIDLEY K., BRADY J., PHILLIPS T., TYERMAN S. 2005. The role of molybdenum in agricultural plant production. Annals of Botany 96: 745-754.
- KANDIL H., GAD N., ABDELHAMID M. 2013. Effects of different rates of phosphorus and molybdenum application on two varieties common bean of (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Agric. Food Tech. 3 (3): 8-16.

- KEYSER H.H., MUNNS D.N. 1979. Tolerance of Rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. *Journal Soil Science Society American* 43: 519-523.
- KIRKBY E., RÖMHELD V. 2008. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. *Informaciones Agronómicas* 69: 9-13.
- KLOEPPER J. W., SCHROTH M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. IV Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria. Angers.* 2: 879-882.
- LUGTENBERG B., KAMILOVA F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiology.* 63: 441-546.
- MARCONDES DE SOUZA J.A., VARANI A., DE MACEDO LEMOS E.G. 2014. The Family Rhizobiaceae. *In* ROSENBERG E., DELONG E.F. LORY S. STACKEBRAND E., THOMPSON F. (eds). *The Prokaryotes.* Berlin, German. Springer-Verlag. p. 419-437.
- MARTÍNEZ-ROMERO E., SEGOVIA L., MARTINS F., FRANCO A.A., GRAHAM P., PARDO M.A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41 (3): 417-426.
- MATOSO S.C.G, KUSDRA J.F. 2014. Nodulação e crescimento do feijoeiro em resposta à aplicação de molibdênio e inoculante rizobiano. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* 18 (6): 567-573.
- MEIC (MINISTERIO DE ECONOMÍA INDUSTRIA Y COMERCIO). 2016. Informe sobre frijol y maíz blanco periodo de cosecha 2015-2016. 22 P.
- MENA, M. 2001. Hacia dónde van los granos básicos en Costa Rica. *In: Memoria del V Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia de Tecnología. Programa de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria-Frijol (PITTA-FRIJOL).* Alajuela, Costa Rica: Revista Agronomía Centroamericana (Compilación y edición), Estación Experimental Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica.
- MÉNDEZ G.M., CASTRO M.E., GARCÍA P.E. 2014. *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. *Biológicas.* 16 (1): 11-18.
- MÉNDEZ J.C., BERTSCH F. 2012. Guía para la interpretación de la fertilidad de los suelos de Costa Rica. ACCS. San José, Costa Rica. 106 p.



- MOLINA E., MELÉNDEZ G. 2002. Tabla para la interpretación de análisis foliar. Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Consultado el 21 de setiembre 2018. Disponible <http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Memorias/Tablas%20Interpretaci%C3%B3n%20An%C3%A1lisis%20Foliar.pdf>
- OKON Y., LABANDERA- GONZÁLEZ C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology Biochemistry* 26 (12):1591-1601.
- RAAIJMAKERS J., PAULITZ T., STEINBERG C., ALABOUVETTE C., MONNE-LOCCOZ Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*. 321 (1-2): 341-361.
- RANGEL-LUCIO J., RODRÍGUEZ-MENDOS AM., FERRERA-CERRATO R., CASTELLANOS-RAMOS J., RAMÍREZ-GAMA R., ALVARADO-BÁRCENAS E. 2011. Afinidad y efecto del *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana* 22 (2): 269-279.
- RAVERKAR K.P., KONDE B.K. 1988. Effect of Rhizobium and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Planta and Soil*. 106: 249-253.
- REMANS R., CROONENBORGHES A., TORRES R., MICHIELS J. 2007. Effects of plant growth rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *European Journal Plant Pathology*. 119:341- 351.
- REMANS R., REMAEKERS L., SCHELKENS S., HERNANDEZ G., GARCÍA A., REYES J, L., MÉNDEZ N., TOSCANO V., MULLING M., GALVE L., VANDERLEYDEN J. 2008. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation in nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312: 25-37.
- RIBEIRO A., FERREIRA R. A., ARF O., PORTUGAL J., CHAVES D. 2016. Co-inoculation of Rhizobium and *Azospirillum brasilense* in common beans under two irrigation depths. *Res. Ceres Viçosa*. 63 (2): 198-207.
- ROBITALLE H. A. 1975. Effect of foliar molybdenum spray on nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Annu. Rep. BeanImprov. Coop.* 18.65
- RODRÍGUEZ L., X. E. FERNÁNDEZ-ROJAS. 2003. Los frijoles (*Phaseolus vulgaris*): su aporte a la dieta costarricense. *Acta Médica Costarricense*. 45(3). 120-125.

- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ S., FERNÁNDEZ-ROJAS X. E. 2015. Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 145-151.
- RUSSO A., FELICI C., TOFFANIN A., GÖT, M., COLLADOS C., BAREA J.M., MOËNNE-LOCCOZ Y. SMALLA, K., VANDERLEYDEN J. NUTI M. 2005. Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. *Biology fertility soil.* 41: 301-309.
- SAINE P., KHANNA V., GANDWAR M. 2015. Mechanisms of Plant Growth Promotion by Rhizobacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 9 (2): 1163-1177.
- SIMA. 2015. Costa Rica: Frijol Área rendimiento y producción (en línea). Sistema de información de Mercados Agroalimentarios. Consultado el 07 de enero 2017. Disponible en <https://www.simacr.go.cr/index.php/produccion-frijol-frijol>.
- SINGH R., JAUHAR P. 2005. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L). In Genetic Resources Engineering, and Crop CRC Press, Boca Ratón, USA. p 11-47.
- URIBE L. 1993. Competencia entre la cepa de rhizobium *leguminosarum* bv *phaseoli* CIAT 166 tolerante a bajos niveles de fosfato y un mutante Tn5 no tolerante. *Agronomía Costarricense*.17 (2): 39-48.
- URIBE L. 1994. Formación de nódulos de *Rhizobium*: factores que pueden conferir ventaja competitiva. *Agronomía Costarricense*. 18 (1): 121-131.
- URIBE L., ACUÑA O., HERNÁNDEZ G. 1990. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Huasteco a la inoculación con tres cepas de *Rhizobium* bajo condiciones de mínima labranza en tres localidades de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 14(2):201-206.
- VALLADARES R.M. 2009. Respuesta de 12 genotipos de frijol a a inoculación con *Rhizobium* bajo condiciones de estrés hídrico y baja fertilidad. Tesis Lic. Honduras. Zamorano.28 p.
- VAN LOON L.C. 2007.Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European journal Plant pathology* 119: 243-254.
- VARGAS R., RAMÍREZ C. 1989. Respuesta de la soya y el maní a Rhizobium y a la fertilización con N,P, Mo en un Typic Pellustert de Cañas, Guanacaste *Agronomía Costarricense* 14 (1): 93-98.

- VIERA R.F., VIERA C., CARDOSO E.J.B.N., MOSQUIM P.R. 1998. Foliar applications of molybdenum in common bean. II. Nitrogenase and nitrate reductase activities in soil of low fertility. *Journal of plant nutrition* 21 (10):2141-2151.
- WEISANY W., RAEI Y., HAJI K. 2013. Role of some mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 2 (4): 77-84.
- YADEGARI M., RAHMANI A., NOORMOHAMMADI, G., AYNEBAND A. 2010. Plant growth Promoting Rhizobacteria Increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of plant nutrition*. 33 (12): 1733-1743.
- ZAIDI A., AHMAD E., KHAN M.S., SAIF, S., RIZVI A. 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. Elsevier, vol.193. p. 231-239.
- ZIMMER W., MENDEL R. 1998. Molybdenum metabolism in plants. *Plant biology* 1: 160-168.

## Anexo 1.

### Resumen de la Determinación de Ca, Mg, P, K, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B, Foliar por ICP

Información suministrada por el Laboratorio de Suelos y Análisis del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

La muestra se procesa en su totalidad, excepto para algunos cultivos. Se lava con agua potable y luego con agua desionizada para eliminar suelo, polvo o residuos superficiales de agroquímicos que puedan alterar el resultado final. Terminado el proceso de lavado, se ingresa de inmediato a las estufas para su secado a una temperatura cercana a los 80 °C. Las muestras deben permanecer en la estufa hasta que estén totalmente secas. Posteriormente se procede a molerla, utilizando los molinos con una criba de malla 1 mm.

La muestra se pesa, se coloca dentro de un envase de teflón del microondas y se le agrega ácido nítrico concentrado. El envase se cierra herméticamente y se coloca en el rotor que será introducido en el microondas. Para este proceso se utiliza una secuencia que incluye dos etapas con una duración de 35 min y una temperatura máxima de 200°C.

Una vez terminada la digestión, el rotor se deja enfriar, se abre el envase y el contenido totalmente digerido se trasvasa a un balón aforado, se lleva a volumen con agua desionizada y se agita.

Se prepara una curva de calibración para **Calcio, Magnesio, Fósforo, Potasio, Azufre Hierro, Cobre, Zinc, Manganeso y Boro**, y se determina la concentración de estos elementos presentes en el extracto obtenido anteriormente por medio del espectrofotómetro de emisión óptica ICP-Plasma. Los resultados finales se expresan en términos de porcentaje (Ca, Mg, P, K, S) y mg/kg (Fe, Cu, Zn, Mn y B)

### Bibliografía

FOCHT C. (Ed). 2000. 3. Plants. In HORWITZ W. (Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 th Edition. AOAC Official Method 922.02 Plants. Vol I, Chapter

JONES J.R., JB, WOLF B. AND MILLS H.A. 1991. Plant analysis handbook: A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Athens, GA, Micro-Macro Publishing. p 23-26.

KALRA Y. 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. Boca Raton, FLA, CRC Press. p 39.

RYNK R. 1992. On-farm composting handbook. Ithaca, NY, Northeast Regional Agricultural Engineering Service. p 23.

KALRA Y. 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil and Plant Analysis Council, Inc. Boca Raton, FLA, CRC Press. pp 69-73.

MILESTONE MICROWAVE. 2006. Techniques and Digestion Application Book. CD (CIA-DE03-01-39).

MILLS HA, Jones Jr JB. 1991. Plant analysis handbook: A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Athens, GA, Micro-Macro Publishing. pp. 119-124.

SPARKS DL. 1996. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. J.M. Bartels. (Ed.). pp 49-64.