

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA

**"EVALUACION EN GUATEMALA DE NUEVE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI,
SELECCIONADAS PARA PRUEBAS INTERNACIONALES DE FIJACION DE
NITROGENO ATMOSFERICO EN FRIJOL, PROBADAS EN LA VARIEDAD ICTA-81".**



**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRONOMO
EN EL GRADO ACADEMICO DE**

LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 1982

01
T(662)
c. 3

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DR. EDUARDO MEYER MALDONADO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO:	Dr. ANTONIO A. SANDOVAL
VOCAL 1o.	Ing. Agr. OSCAR R. LEIVA
VOCAL 2o.	Ing. Agr. GUSTAVO MENDEZ
VOCAL 3o.	Ing. Agr. NESTOR F. VARGAS
VOCAL 4o.	Prof. LEONEL ENRIQUE DURAN
VOCAL 5o.	Prof. FRANCISCO MUÑOZ N.
SECRETARIO	Ing. Agr. CARLOS R. FERNANDEZ

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN
GENERAL PRIVADO

DECANO:	Dr. ANTONIO A. SANDOVAL
EXAMINADOR:	Ing. Agr. GUSTAVO MENDEZ
EXAMINADOR:	Ing. Agr. LUIS A. CASTAÑEDA
EXAMINADOR:	Ing. Agr. JUAN GONZALEZ
SECRETARIO:	Ing. Agr. CARLOS R. FERNANDEZ



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia.....
Asunto.....
.....

17 de noviembre de 1982

Doctor
Antonio Sandoval
Decano Fac. Agronomía
Universidad de San Carlos
de Guatemala
Ciudad Universitaria
Guatemala

Respetable Doctor:

Atentamente me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que en esta fecha he finalizado la asesoría del trabajo de investigación que el estudiante Juan Carlos - Méndez Barrios con carnet No. 78-02625, presentará como tesis de grado para su graduación como Ingeniero Agrónomo, el trabajo se titula "EVALUACION EN GUATEMALA DE NUEVE CEPAS DE RHIZOBIUM phaseoli, SELECCIONADAS PARA PRUEBAS INTERNACIONALES DE FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO EN FRIJOL, PROBADAS EN LA VARIEDAD ICTA-81".

Debo manifestarle que la investigación en cuestión constituye un valioso aporte de la Facultad de Agronomía de la USAC en el campo de la Rhizobiología aplicada.

Y considero que la misma llena la calidad técnica y científica que la Facultad exige, por lo anterior estimo que el estudiante Méndez Barrios ha cumplido con la obligación adquirida y sugiero que el trabajo sea aprobado.

Sin otro particular me suscribo deferentemente de usted,

"ID Y ENSEÑAR A TODOS"

ROLANDO G. AGUILERA MEJIA
INGENIERO AGRONOMO
Colegiado: 157


Ing. Agr. Rolando Aguilera
Prof. de Microbiología

Guatemala,
Noviembre de 1982

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

De conformidad a lo que establece la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis titulado:

"Evaluación en Guatemala de nueve Cepas de Rhizobium phaseoli, seleccionadas para pruebas internacionales de fijación de Nitrógeno Atmosférico en frijol, probadas en la variedad ICTA-81".

Presentándolo como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Deferentemente,

P. Agr. Juan Carlos Méndez Barrios

AGRADECIMIENTO

A mi asesor: Ingeniero Agrónomo Rolando Aguilera Mejía, por su interés y dedicación en la asesoría y colaboración para el desarrollo de ésta tesis.

Al personal de campo y laboratorio de microbiología de la Facultad de Agronomía por su desinteresada colaboración.

A mi compañero y colega Pedro Emilio Velásquez por su ayuda a lo largo de todo el trabajo, tanto de campo como de laboratorio.

Al Arquitecto Julio César López, por la ayuda prestada en la elaboración de gráficos de éste trabajo.

TESIS QUE DEDICO:

A DIOS:

A MIS PADRES:

Luis Arturo Méndez
Francisca Barrios de Méndez

A MI ABUELO:

Juan José Méndez, mi primer instructor en
el campo y el mejor agricultor que he cono-
cido.

A MIS HERMANOS Y
AMIGOS

A LA FACULTAD DE AGRONOMIA,
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA.

A MI QUERIDA PATRIA GUATEMALA.

RESUMEN

La escasez natural de N_2 en los suelos, hace necesario que éste se suministre a las plantas mediante fertilización artificial, con la consiguiente elevación de los costos de producción debido a lo caro de los fertilizantes. Para el caso de las leguminosas, dentro de las cuales se clasifica el frijol, existe una alternativa de tipo biológico que resulta ser más económica y en algunos casos más eficiente, se trata de una bacteria del género Rhizobium que puede vivir simbióticamente con éstas plantas. Esta simbiosis permite que la bacteria fije Nitrógeno Atmosférico y lo ceda a la planta para su normal desarrollo.

En este trabajo se evaluaron nueve cepas de Rhizobium Phaseoli, las cuales forman parte del grupo seleccionado para los ensayos IBIT (International Bean Inoculation Trial) y fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, en Cali Colombia. Las cepas evaluadas fueron las siguientes: CIAT 57, 127, 166, 255, 390, 407, 727, 904 y 952. Se probaron las mismas en la variedad de frijol negro ICTA-81, en un ensayo de campo realizado en el área experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El diseño empleado fue en bloques al azar, utilizando para el efecto cuatro repeticiones y 12 tratamientos divididos éstos de la siguiente manera: 9 cepas de Rhizobium Phaseoli y tres tratamientos sin inoculante con niveles 0, 50 y 100 kilogramos por hectárea de Nitrógeno que sirvieron como tratamientos comparadores del nivel de fijación de las cepas de Rhizobios.

Los parámetros utilizados en la evaluación fueron los siguientes:

- a) Porcentaje de nódulos eficientes;
- b) Número de nódulos;
- c) Peso por nódulo;
- d) Peso total de nódulos;
- e) Patrón de distribución nodular;
- f) Peso de materia seca de la planta; y,
- g) Rendimiento de grano.

El análisis estadístico y la interpretación de resultados mediante el uso de correlaciones y funciones lineales de regresión demostró algunas interacciones que se dan entre los distintos parámetros de medición; en resumen, se puede indicar que la producción de frijol por parte de la planta es función del nivel de Nitrógeno en el sistema y éste es medible indirectamente por el peso de materia seca de la misma, el que a su vez es indicador de la eficiencia o ineficiencia de la cepa inoculada de Rhizobium. En las correlaciones efectuadas también se encontró que las cepas eficientes presentan un alto peso total de nódulos, un alto peso por nódulo y que cuando esto ocurre, baja el número de nódulos, pero se aumenta el porcentaje de nódulos eficientes para fijar Nitrógeno.

El análisis de comportamiento individual de las cepas mostró que las más eficientes en la fijación de Nitrógeno con la variedad de frijol ICTA-81, son las CIAT 390 y 407, obedeciendo estas a altos patrones de peso individual y total de nódulos, alto porcentaje de nódulos eficientes y bajo número de nódulos en relación a las cepas ineficientes. La localiza-

ción de la mayor parte de nódulos en la raíz de la planta, fue en el cuello y raíz principal, de la misma; patrón que también corresponde a las cepas eficientes. Por último se encontró que los rendimientos de materia seca y grano de las plantas inoculadas con estas cepas fueron comparables a los rendimientos de materia seca y grano de las plantas fertilizadas con 50 y 100 kilogramos de Nitrógeno por hectárea.

CONTENIDO

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION	2
III. OBJETIVOS	2
IV. HIPOTESIS	2
V. REVISION DE LITERATURA	
V.1. Microbiología general de Rhizobium y requerimientos nutricionales	3
V.2. Simbiosis entre leguminosas y Rhizobium	4
A) El proceso de infección	4
B) Importancia del hospedero en la nodulación	4
C) Situaciones negativas en la simbiosis (Rhizobium phaseolus)	5
V.3. Parámetros utilizados en la evaluación de una cepa	7
A) Reducción de acetilenos	8
B) Determinación colorimétrica del etileno	8
C) Aspectos generales de la nodulación	8
D) Peso y coloración de las plantas	8
E) Evaluación de la nodulación	9
V.4. Epoca de evaluación	9
V.5. Técnicas de inoculación de bacterias fijadoras de Nitrógeno sobre semillas de leguminosas	10
VI. MATERIALES Y METODOS	
VI.1 Localización	11
VI.2 Material experimental	11
VI.3 Metodología	11
A) Metodología de laboratorio	11
B) Metodología de campo	13
VII. TRATAMIENTOS ESTUDIADOS	14
VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
IX. DATOS QUE SE TOMARON	17

	Pag.
X. MANEJO DEL EXPERIMENTO	
X.1. Siembra	18
X.2. Raleo	18
X.3. Limpias	18
X.4. Control de plagas y enfermedades	18
X.5. Fertilizaciones	18
XI. RESULTADOS Y DISCUSION	
XI.1 Cuadros de Resultados	20
XI.2 Análisis de varianza	26
XI.3 Cuadros y gráficos de interpretación	27
XI.4 Discusión de resultados	35
XII. CONCLUSIONES	39
XIII. RECOMENDACIONES	40
XIV. BIBLIOGRAFIA	41

Desde hace algunos años, muchos países están realizando grandes esfuerzos por entender científicamente la simbiosis Rhizobium-leguminosas, todos los trabajos se encaminan a un solo fin "disminuir la escasez de proteína para el hambre en los países en desarrollo (15). Los proyectos tienden a la búsqueda y selección de cepas eficientes en la fijación del Nitrógeno Atmosférico en su mayoría, otros investigadores también propenden el mejoramiento de leguminosas, tanto forrajeras como productoras de grano.

Guatemala, en los últimos años se está incorporando a la investigación en el campo de la Rhizobiología, así se pueden encontrar ya algunos trabajos realizados por Instituciones Es-tatales de investigación agrícola e instituciones de docencia como la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos -USAC-

En los trabajos realizados se observa marcada afición por el cultivo del frijol y esto es justificable debido a la importancia de este grano en la dieta del pueblo guatemalteco. (1).

El presente trabajo pretende seleccionar dentro de un grupo de cepas de Rhizobium phaseoli las más fijadoras de Nitrógeno Atmosférico comparando su eficiencia a contra determinados niveles de fertilización de Nitrógeno Mineral.

Si a la importancia que reviste el cultivo del frijol para Guatemala, se le suman los bajos rendimientos que se obtienen por unidad de área, se tendrá que implementar una serie de investigaciones en todos los campos multidisciplinarios que conlleven al incremento de la producción de frijol en Guatemala y aquí se pueden mencionar: mejoramiento genético, fertilidad, y fertilización, enfermedades y plagas; y por supuesto, la Microbiología aplicada del Rhizobium phaseoli.

Al analizar brevemente algunas estadísticas en cuanto a producción y rendimiento comparados con el consumo nacional así como otros datos interesantes para los últimos años, se puede observar que: según la unidad de programación de SIECA (19), para los años 79 y 80, existió un área cultivada de 68.5 miles de hectáreas y 65.1 respectivamente, para los años en mención con producciones de 1,372.3 miles de quintales y 1,298.3 miles de quintales (14 qq/mz. y 13.9 qq/mz. respectivamente), existiendo para esos mismos años un consumo nacional de 1,877.2 miles de quintales y 2,033.5 miles de quintales respectivamente.

También se puede analizar en el Informe Económico del Banco de Guatemala (4) los rendimientos citados para la cosecha 81/82, superficie cosechada 117.2 miles de quintales obteniéndose un rendimiento de 17.2 quintales por manzana, observándose que este dato es bastante mayor a los años anteriores.

Los datos mencionados hablan por sí solos, los bajos rendimientos como ya se vió, obedecen a una serie de factores, es posible que uno de ellos sea el Nitrógeno, y aunque existen alternativas naturales de suplir este elemento en forma económica a través de la inoculación de cepas de Rhizobium phaseoli efectivas para fijar este elemento Nitrógeno, esto no se hace por desconocimiento casi general de ésta técnica.

III.

OBJETIVOS

Evaluar el comportamiento de nueve cepas de Rhizobium phaseoli seleccionadas internacionalmente como eficientes fijadoras de Nitrógeno Atmosférico, en la variedad guatemalteca de frijol ICTA-81.

IV.

HIPOTESIS

Todas las cepas Rhizobium phaseoli son igualmente fijadoras de Nitrógeno Atmosférico con la variedad de frijol ICTA-81.

V.1. Microbiología General de Rhizobium y Requerimientos Nutricionales:

Las bacterias del género Rhizobium son aquellas capaces de formar nódulos morfológicamente distintos en las raíces de las plantas de la familia leguminosaceae; el Manual Bergey (8a. edición) las caracteriza como bacilos gram negativos, con 0.5-0.9 μ m por 1.2-3.0 μ m, conteniendo gránulos de polibeta hidroxibutirato, es una bacteria generalmente móvil, cuando joven posee de dos a seis flagelos peritricos o un flagelo polar o subpolar y no es formadora de esporas. Es una bacteria aerobia, quimioorgano-eterotrófica, su temperatura óptima de crecimiento es de 25° a 30°C, puede utilizar fuentes de Nitrógeno diversas como por ejemplo: NO₃, NH₄, aminoácidos y Nitrógeno Molecular cuando están en simbiosis con plantas. Es capaz de crecer en tensiones de oxígeno menores que 0.0001 atmósferas, crece pobremente en un medio Peptona agar, crece muy poco en leche LITMUS, ocasionalmente provoca una reacción alcalina o ácida y reacciona positivamente en la proteolisis, hidroliza la caseína, algunas estirpes comunmente poseen gránulos metacromáticos; ejemplo: R. Leguminosarum (13).

Las especies de rhizobios son reunidas en dos grupos de acuerdo a sus características de crecimiento en medio de extracto de levadura: En el grupo uno, están las de crecimiento rápido o productoras de ácido y contienen de dos a seis flagelos peritricos, aquí se pueden mencionar las siguientes especies: Rhizobium leguminosarum, phaseoli, trifoli, meliloti. En el grupo dos están las especies de crecimiento lento, en este medio y solo poseen un flagelo polar o subpolar, aquí están: R. Japonicum y Lupini, (13).

El grupo número uno presenta un tiempo de generación de dos a cuatro horas, forman colonias relativamente grandes de dos a cuatro mm. de diámetro y tienen un poder formador de gomas abundante. El grupo dos presenta un tiempo de generación de seis a ocho horas, sus colonias son pequeñas, menores o iguales a un mm.

De acuerdo con Vincent (19) los Requerimientos Nutricionales requeridos por el Rhizobium son los siguientes:

ELEMENTO	REQUERIMIENTO - 3 10 M
Fe.	0.005 -0.1
Mg.	0.1
Ca.	0.025
Mg. + Ca.	0.5
Co.	0.00001
Zn.	0.0001 -0.001
Mn.	0.0001 -0.01
K	

V.2. Simbiosis entre Leguminosas y Rhizobium:

Según Alaidés (2) el Rhizobio se encuentra distribuido en diferentes nichos ecológicos, no sólo en la rizosfera y rizoplasma de las leguminosas, sino también de otras plantas, en agregados y coloides del suelo. Generalmente vive saprofiticamente, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio. No sólo la bacteria debe sobrevivir sino precisa multiplicarse, competir con la microflora nativa, colonizar la rizosfera y además poseer la habilidad de formar nódulos y principalmente ser eficiente en la fijación de Nitrógeno (Roughley, 1976), Alaidés (2) cita a Gibson (1971) en donde éste propone una serie de factores capaces de influenciar la nodulación y sobrevivencia de Rhizobium entre otros menciona: temperatura diurna y nocturna, intensidad de la luz, oxígeno, temperatura de la rizosfera y a la sombra.

A. El Proceso de Infección:

El proceso sintetizado de infección lo resume Morales y Hubbell (16) diciendo que después o durante la colonización de la raíz el rhizobio se adhiere a la pared celular del pelo radical a través de un puente formado por la proteína denominada LECTINA, la cual se une específicamente al antígeno común Rhizobio-leguminosa.

Una sustancia no difusible causa la distorsión extrema del pelo radical con la formación del cayado del pastor que consiste en un torcimiento del pelo radical en 180° la punta del pelo radical completamente distorsionada encierra al Rhizobio permitiendo el aumento en la concentración de algunos metabolitos entre ellos las enzimas hidrolíticas; que debilitan la pared celular incrementando el paso de las sustancias o sea el establecimiento de una comunicación bioquímica más íntima entre la bacteria y la leguminosa. Este intercambio dará como resultado la relocalización o inversión del crecimiento de la pared celular lo cual causaría la formación del hilo infectivo.

B. Importancia del Hospedero en la Nodulación:

Hasta hace 20 años, Graham (7) menciona que la tendencia era pensar en las leguminosas como socios pasivos en la fijación del Nitrógeno y atribuir al Rhizobio todas las cualidades importantes para tal actividad, aunque ya es conocido que el Rhizobio contiene una Nitrogenasa y que la cepa puede influir en varios aspectos de la simbiosis, como el tiempo que demora en formar los nódulos y la eficiencia con que funcionen, la tendencia moderna es ya, pensar en la leguminosa como factor dominante en la simbiosis, Graham (7) cita que Holl y LaRue, en 1975 sugirieron que por lo menos diez genes del hospedero estaban controlando factores tan importantes como el tiempo hasta la nodulación, selección de ciertas cepas de la Rhizosfera y no otras; y los niveles de fijación que alcanza la simbiosis.

La primera oportunidad de la leguminosa para influir en la nodulación es cuando el Rhizobio se encuentra en la Rhizosfera del hospedero, éste estimula la multiplicación de la bacteria con exudados de la raíz que contienen aminoácidos, azúcares y vitaminas, así promueven que la cepa logre la concentración de células necesarias para efectuar la infección, proceso que también es influido por el hospedante, haciéndolo muy específico.

Otra gran influencia que menciona Graham (7) es la característica que presentan los nódulos y dice que el hospedero influye en el tipo de distribución de los mismos además de su tiempo a formarse, el tiempo en que ya son funcionales y en su número.

Nutman (1966) citado por Graham (7), determinó que el número de nódulos mantenía una correlación positiva con el número de raíces laterales de la variedad y que por lo tanto tal característica era hereditaria, correspondía a cada variedad y además era dominante.

En el mismo documento Graham (7) menciona "La variación natural en la capacidad de fijar Nitrógeno" y se refiere a la variación natural entre líneas de la misma leguminosa en su capacidad de fijar Nitrógeno. Esta ha sido demostrada en varias especies como soya (Hardy et al 1973), vicia (Holl y LaRue, 1976) Phaseolus (Graham y Rosas 1977), aunque sus causas son motivo de gran estudio en la actualidad.

C. Situaciones Negativas en la Simbiosis (Rhizobium phaseolus)

C.1. Problemas del Suelo:

ACIDEZ: Graham (8) considera el problema de la acidez no sólo refiriéndose al pH sino también a otro complejo de factores que limitan la fijación de Nitrógeno en suelos de bajo pH, incluye la toxidez de manganeso y aluminio y la deficiencia de calcio.

La mayoría de las revisiones a este respecto indican rangos tolerantes para frijol desde 5.5 a 6.7, pero en el CIAT Graham (8) cita que se han logrado buenos rendimientos con 4.7 de pH.

Siempre Graham (8) indica que los efectos del aluminio son principalmente contra la planta, produciendo un reducido desarrollo radicular, mientras el pH y el Mn pueden influir en el desarrollo de la simbiosis con la nodulación y fijación de Nitrógeno comunmente muy reducido.

Dobereines 1966, Morales et al 1973, Munns et al 1977 citados por Graham (8) señalan que el encalamiento del suelo reduce los efectos de acidez, manganeso y aluminio sobre la nodulación y el crecimiento del frijol.

El encalado modifica el pH, favoreciendo más el establecimiento de la simbiosis de la bacteria y la planta. Según Hely (1964) citado por Alaidés (2) el encalado aumenta la concentración de CO_2 en el sistema radicular, aumentando la fijación de Nitrógeno, en tanto que Alaidés (2) también menciona que Hardy y Havelka (1973) observan que el aumento de CO_2 favorece la fotosíntesis a consecuencia de la fijación, además el encalado presenta otros efectos como hacer disponible determinados elementos, o eliminando toxicidad producida por otros como Mn. y Al.

C.2. Deficiencia de Fósforo:

Es tan común según Graham (8) en los suelos de las regiones productoras de frijol en América Latina, y es talvez el factor que más limita la fijación de Nitrógeno en fincas pequeñas. La deficiencia de fósforo reduce no solamente

el desarrollo de los nódulos sino también su actividad específica. Normalmente el contenido de fósforo en los nódulos es más que en cualquier otro tejido de la planta, siendo crítico por el suministro de energía de la fijación.

C.3. Molibdeno (Mo.)

El Molibdeno (8) queda inmovilizado y no disponible en suelos ácidos, causando a las plantas un desarrollo de síntomas deficitarios de tal elemento tan necesario para la fijación del Nitrógeno.

C.4. Fertilización Nitrogenada:

Graham (8) menciona que el uso de abonos nitrogenados debe reducirse en el futuro, ya que la interacción entre la inoculación y el abono nitrogenado es completamente negativa. El mismo autor señala que un sistema que permita el uso lógico de los dos insumos debe ser desarrollado dentro de ellas y para fines de este estudio se cita el hecho de que el uso de dosis pequeñas de fertilizantes nitrogenados como ESTARTER para promover el desarrollo de la planta, especialmente en zonas frías donde la nodulación y fijación de Nitrógeno son demoradas y la planta sufre inicialmente de deficiencia de Nitrógeno.

C.5. El Agua:

Algo referente a humedad se menciona en lo que es la Ecología de las Bacterias, pero al analizar este factor, desde el punto de vista simbiótico, según lo menciona Graham (8) es en la floración cuando la tasa de fijación debe hacerse óptima y generalmente en un 60% de la región de producción de frijol en América Latina, la disponibilidad de agua se hace deficitaria, según Sprent (1976) citado por Graham (8) el número y tamaño de los nódulos queda reducido por el déficit de agua, Summerfield y colegas mencionan Graham (8) han demostrado con Caupi que con un tiempo corto de sequía la fijación rápidamente se normaliza cuando las plantas reciben agua, con un período prolongado sin agua, los resultados son contrarios, exceso de agua también es dañino, plantas sumergidas durante 3-4 días pierden muchos de sus nódulos.

C.6. Temperatura:

Graham (8) menciona que P. vulgaris, tiene requerimientos muy específicos en las temperaturas que son toleradas, menciona que un 83% de la producción total de América Latina se establece con un rango de temperatura promedio de 17.5-25.0°C, algunos ejemplos citados por el mismo autor indican que en Colombia con temperatura promedio de 24°C, la fijación de Nitrógeno se inicia alrededor de los 45 días logrando sus valores máximos a los 30 y a los 40 días ya ha bajado de nuevo, en cambio a los 17°C, la fijación se ha iniciado a los 30 días, y alcanza su máximo alrededor de los 50 días y dura probablemente hasta los 60 días.

Otra cita interesante del mismo autor, Graham (8) y por tratarse de una cepa evaluada en el presente trabajo se refiere a cierta interacción entre cepa / huésped en tolerancia a temperaturas altas o bajas.

Y se refiere a la cepa Ciat 57 e indica que la misma no logra tasas altas de fijación bajo condiciones de temperaturas altas.

C.7. Cepas Nativas en el Suelo:

Estas, según Graham (8) establecen una competencia con las cepas inoculadas, este autor señala que el problema se hace más serio en aquellas regiones en donde se originó el frijol (América Central) no es sorprendente entonces que en estos suelos hayan altas concentraciones de R. phaseoli; cita que por ejemplo en México es difícil conseguir respuesta a la inoculación; - porque las plantas sin inocular alcanzan de 150 a 300 nódulos/planta y con poblaciones bacteriales de hasta 10^9 células/gramo de suelo, en Colombia se mencionan poblaciones de 10^2 a 5.8×10^4 células/gramo de suelo.

Lo anterior hace necesario que todo trabajo sobre inoculantes tome en cuenta las poblaciones nativas de Rhizobios.

C.8. Pesticidas Agrícolas:

Graham (8) dice que en general los herbicidas, insecticidas y las hormonas de la planta, usadas según las recomendaciones, no hacen mayor daño a los Rhizobios o a la nodulación, no así los fungicidas, pues muchos de éstos son tóxicos para la bacteria y pueden causar fallas en la nodulación.

C.9. Otros Factores:

Alaides (2) menciona como otros factores en la ecología de Rhizobio, la presencia de Nitratos, deficiencias de Co. y Mo., pueden modificar las características de nodulación e influencias a la bacteria.

V.3. Parámetros Utilizados en la Evaluación de una Cepa:

Alaides (3) enumera tres aspectos principales que están ligados directamente con las técnicas adoptadas en la evaluación de una cepa, estos aspectos son los siguientes:

1. Capacidad de nodulación de estirpes (cepas) inoculadas.
2. Eficiencia de la estirpe en su capacidad de fijar Nitrógeno.
3. Utilización del Nitrógeno fijado por la planta.

Basado en ello el experimentador deberá cercar sus condiciones de trabajo de acuerdo a sus objetivos, procurando un modo más viable y rápido para obtener resultados.

Vincent (20) menciona que los experimentos de campo comparados con aquellas condiciones de laboratorio e invernaderos, difieren entre sí, debido a:

- a) Mayor número de Rhizobios por semilla en plántos en campo.
- b) Ineficiencia de terminadas estirpes seleccionadas en condiciones de laboratorio e inoculadas para condiciones de campo.

Muchas situaciones están ligadas a problemas de competición con estirpes nativas y exigencias de factores externos propios al desenvolvimiento de simbiosis con la planta.

Alaides (3) de un modo general, dice que el parámetro final a ser observado sería el enriquecimiento de Nitrógeno, debido a la asociación planta-Rhizobium, pudiendo realizar esta evaluación de forma directa o indirecta. Los métodos más comúnmente utilizados son los indirectos que se resumen a continuación:

A. Reducción de Acetileno:

La Nitrogenasa es la enzima responsable de la fijación de Nitrógeno en todos los sistemas biológicos. Schollhorn y Burris (1966) en los Estados Unidos y Dilworth (1966) en Australia describieron la reducción del Acetileno ($C_2H_2 \longrightarrow C_2H_4$), estableciendo una conversión de moles de C_2H_4 reducido para N_2 fijado y ésta igual a 3; todo esto expresado en actividad de enzima.

B. Determinación Colorimétrica del Etileno:

Este resulta ser un método semi-cuantitativo, analiza la transformación del acetileno en aldehído por oxidación con $NaIO_4$ más $KMnO_4$ y determinado por reacción colorimétrica.

C. Aspectos Generales de la Nodulación:

Tanto el número de nódulos como la distribución en el sistema radicular son importantes, algunas especies como soya distribuyen nódulos en la raíz principal, mientras que el frijol lo hace en sus raíces secundarias.

Observaciones periódicas, menciona Alaides (3), nos pueden indicar, época de apareamiento de los nódulos, coloración de los mismos la cual es indicadora de eficiencia en los mismos; un color rosa intenso indica gran actividad por la presencia de leg-hemoglobina, la cual participa en el equilibrio de O_2 necesario para el bacteroide en el nódulo, la coloración clara indica ineffectividad y la coloración oscura deterioro, aunque existen algunas estirpes que presentan nodulación de color oscuro, por la presencia de melaninas siendo estos de buena efectividad.

D. Peso y Coloración de las Plantas:

El peso y la coloración de la planta pueden indicar la presencia de Nitrógeno en el sistema. Plantas con deficiencia presentarán una coloración verde-amarillenta y un menor peso con respecto a las que no presentan la deficiencia del mismo.

Killing (11) establece lo siguiente en relación a los criterios para evaluar la eficiencia en la fijación y utilización por parte de la planta. El criterio principal y muchas veces suficiente para la medición de eficiencia en la fijación de Nitrógeno es la determinación de "materia seca en peso" de la parte aérea, a la época de corte obien 45 a 60 días después de la siembra del inoculante; esta se realiza en horno a una temperatura de $60^{\circ}C$. durante 4-5 días.

Otro criterio de mucha validez, según el mismo autor, es la determinación de Nitrógeno total siempre en el vegetal medidas auxiliares como: número y peso de nódulos, la posición de los nódulos en relación con la raíz principal, siendo éste último un buen indicador de rapidez de formación después de la germinación, nodulación próxima a la raíz principal es característica de buenas estirpes.

El mismo Kölling (11) señala que un criterio complementario es número de nódulos y peso de los mismos en materia seca, determinándose éstos en dos épocas, siendo la primera 30-40 días después de la germinación y la segunda al momento del llenado de la vaina.

E. Evaluación de la Nodulación:

Existe una cierta correlación inversa entre el número y tamaño de nódulos, según indica Kölling (10), cuando la estirpe (cepa) es eficiente y no existe limitación ambiental ni nutricional, no hay formación de un número muy elevado de nódulos, pero éstos mejoran su crecimiento. Si los nódulos formados están supliendo suficientemente Nitrógeno a la planta, ésta no va a formar más nódulos, pues no hay necesidad.

El aspecto que deben presentar los nódulos de estirpes eficientes y que fijan Nitrógeno activamente, según Kölling (10) es superficie más o menos rugosa y con estrías claras o blancas más acentuadas, por otro lado, los nódulos de estirpes ineficientes o eficientes que presentan alguna limitación en cuanto a su fijación presentarán superficie lisa y su tamaño será reducido.

Un pigmento de color rosado denominado leg-hemoglobina tiene gran importancia en el funcionamiento del mecanismo de fijación de Nitrógeno de acuerdo a Kölling (10). Luego un color rosado intenso indica una alta actividad fijadora. Siempre Kölling (10) señala que una coloración blanca o amarilla antes de finalizar el ciclo o sea en plena formación de vaina y llenado de la misma indica que la planta ha almacenado suficiente Nitrógeno por lo que la exigencia en la fijación se ve disminuida y como consecuencia de ello los nódulos entran en degeneración tomando una coloración interna un tanto castaña.

Otro buen indicador señala Kölling (10) es la dimensión de la zona fijadora dentro del nódulo, siendo los nódulos con actividad máximo de un color bermejo en su interior, excepto en el cortex y ectodermo.

V.4. Epoca de Evaluación:

Kölling (10) recomienda como mejor época de muestreo para la evaluación de una estirpe, la época de floración plena para aquellas leguminosas forrajeras y el inicio de formación de vainas para el caso de las leguminosas productoras de grano, tal es el caso del frijol.

V.5. Técnicas de Inoculación de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno sobre Semillas de Leguminosas

Técnicas de inoculación sobre semillas de leguminosas existen varias, desde hacer aplicaciones directas de inoculante en turba a la semilla fijándola con un adhesivo como solución azucarada hasta la técnica de PELETIZACION, que según Kolling (10), es la técnica indicada cuando se trata de experimentación agrícola y esta consiste en revestir las semillas con un producto que favorezca y proteja a los Rhizobios de los factores desfavorables de tipo ambiental, el mismo autor menciona entre otros factores falta de humedad, altas temperaturas, pH ácido, los cuales afectan su sobrevivencia, así como su capacidad multiplicativa en la rhizosfera.

Dentro de los materiales que se recomiendan para peletizar, Kolling (12) menciona roca fosfatada finamente molida; Vincent (20) indica que el carbonato de calcio, en proporción de 25 gr. por 5 gr. de turba-inoculada es aconsejable.

La semilla una vez peletizada de acuerdo con Vincent (20) puede permanecer almacenada de una hasta trece semanas de acuerdo a la calidad del inoculante original, temperatura del almacén y naturaleza del adhesivo usado.

VI.1. Localización:

La evaluación de las cepas de la bacteria Rhizobium phaseoli se llevó a cabo en los campos experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicados en la Ciudad Universitaria, Zona 12, ciudad capital.

VI.2. Material Experimental:

- a) Las cepas evaluadas de la bacteria Rhizobium phaseoli fueron proporcionadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) de Cali, Colombia; las cuales pertenecen a las CEPAS IBIT (International Bean Inoculation Trial), traducido, responde a: "Pruebas Internacionales de Inoculación en Frijol" (6).
- b) Semillas de Frijol negro, variedad ICTA-81, proporcionada ésta por el Instituto de Capacitación y Tecnología Agrícola (ICTA), variedad recomendada por la Institución como altamente rendidora para la zona del Centro de Guatemala.

VI.3. Metodología:

La metodología de investigación conlleva una serie de pasos que condujeron a la obtención, por un lado de un adecuado material experimental y por el otro, la correcta preparación del terreno, basada ésta en un minucioso análisis del mismo; por lo tanto, la metodología a seguir se dividió en dos partes:

- a) Metodología de Laboratorio; y,
- b) Metodología de Campo.

A. Metodología de Laboratorio:A.1. Recuperación de Bacterias Liofilizadas:

La metodología empleada para lograr la multiplicación de la bacteria, partiendo de ampollas con Rhizobios liofilizados fue la que recomienda Vincent (20), aunque para abrir las mismas se modificó brevemente la técnica, haciendo lo siguiente: Con una lima se hizo una marca a la altura de la mitad de la ampolla sobre el tampón de algodón para poder romperla, se eliminó el tampón que cubría las bacterias liofilizadas y se agregó con una pipeta estéril, 0.1 cc de caldo de extracto de levadura con manitol estéril, se mezcló la bacteria con caldo y luego se trasladó cada cepa a 3 placas con medio de cultivo a base de agar, extracto de levadura y manitol. Las placas (cajas de petri) se incubaron a 26°C; en posición invertida y se observó cuidadosamente para registrar la formación de las colonias características de la cepa de Rhizobium.

A.2. Preparación de los Inoculantes:

Después de realizado lo anterior y para multiplicar abundantemente las bacterias de cada cepa se necesitó de un caldo nutritivo, que de acuerdo con

Vincent (20), lleva lo siguiente:

K ₂ HPO ₄	0.5 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 gr.
NaCl	0.1 gr.
Manitol	10.0 gr.
Extracto de levadura	100.0 ml.
Agua destilada	Llevar a 1000 ml. de medio
pH	7.0

Para esterilizar el medio, se autoclaveó a 120°C, durante 20 minutos.

Se inocularon en el caldo las diferentes cepas a evaluarse y luego se colocaron en un agitador de tipo horizontal durante cuatro días de acuerdo con Chonay (5), luego de éste tiempo se hicieron conteos de la población bacteriana en los caldos utilizando para el efecto el método de diluciones y la cámara de conteo bacteriano de PETROFF, una población adecuada en el caldo es por lo menos 500×10^6 células por mililitro de caldo según Vincent (20). Después de esto y de acuerdo a lo que recomienda Vincent (20), para preparar inoculantes cuya base de transporte sea la turba se hizo lo siguiente: la cantidad de caldo necesario para impregnar la turba se calculó en base a la densidad aparente de la misma, determinando el volumen necesario de agua que moja la totalidad del material.

La turba a utilizar fue esterilizada mediante radiación gamma y fue enviada de la Universidad de Hawai (EUA). Una vez realizada la mezcla se dejó un período de maduración, para disipar el calor y obtener un humedecimiento más íntimo de la misma.

A.3. Peleteado de la Semilla:

Esta consistió en un recubrimiento de la semilla con un material cementante, cuyo objetivo fue poner en íntimo contacto el inoculante con la semilla, además de brindar protección a los Rhizobios de los factores negativos en la simbiosis. Se utilizó el procedimiento indicado por Vincent (20), que lleva los siguientes pasos:

1. Preparación del adhesivo: Consistió en preparar una solución al 45% de goma arábica con agua potable.
2. Mezcla del adhesivo con el inóculo e inoculación: La turba se mezcló con el adhesivo e inmediatamente se peleteó la semilla.
3. Recubrimiento con material cementante: Para esto se agregó carbonato de calcio en cantidad suficiente para recubrir la semilla.

Cada uno de los inoculantes (uno por cada cepa) se trabajó individualmente, hasta obtener nueve lotes de semilla peleteada, debidamente inoculada y lista para la siembra.

B. Metodología de Campo:

B.1. Análisis y Preparación del Terreno:

Se realizó un muestreo al azar dentro del área experimental a una profundidad de 30 cms., considerando que ésta es donde se logra el mayor desarrollo radicular del cultivo del frijol, se enviaron al laboratorio del ICTA, solicitando la siguiente información:

- a) Análisis de rutina,
- b) Cationes
- c) Materia orgánica
- d) Nitrógeno
- e) Elementos menores.

El análisis mostró un nivel bajo de calcio y pH por lo que fue necesario encalar el terreno para mejorar las condiciones del mismo y establecer una mejor relación calcio/magnesio. Se utilizó cal dolomítica en cantidad suficiente para llevar la relación Ca/Mg. a 6/1. La cal se incorporó al suelo luego de un paso de arado y 2 subsecuentes pasos de rastra.

B.2. Desinfección y Desinfestación:

Al momento de la siembra se incorporó al suelo, Volatón, en una proporción de 100 lbs. por manzana, aplicados al fondo del surco en hileras, para el control de plagas del suelo como:

- Gallina ciega (Phyllphaga sp)
- Gusano alambre (Agriotes sp),
- Gusano nocheros (Prodenia, Agriotis)

También se aplicó Furadan al momento de la siembra para controlar el daño de larvas de una mosca que manifiesta el Ingeniero Rolando Aguilera (Consultas personales a lo largo de la asesoría), que causa daños a la nodulación.

B.3. Triple superfosfato:

Con éste se logró la incorporación del fertilizante fosfatado al suelo, en un nivel de 50 Kg. de fósforo por hectárea, teniendo en cuenta que comercialmente viene con una concentración del 45%. Se agregó al fondo del surco y al momento de la siembra, de acuerdo a lo recomendado por Tobías (18).

Todos los tratamientos anteriores, cal, Volatón, Furadan y triple superfosfato fueron proporcionados a todas las parcelas experimentales a fin de que éstos no constituyan fuentes de variación en el experimento.

B.4. Urea:

Esta fue la fuente de Nitrógeno utilizada en los tratamientos-testigo en niveles de 0, 50 y 100 Kg./ha. de Nitrógeno, teniendo en cuenta que la Urea representa concentraciones del 46%, en ninguno de los tratamientos con inoculante se aplicó Urea como fuente de Nitrógeno, pues el objeto de los mismos es evaluar la capacidad fijadora de las cepas de Nitrógeno Atmosférico. Esta aplicación se efectuó al momento de la siembra, con un 25% del Nitrógeno total de acuerdo a lo recomendado por Tobías (18).

Se establecieron doce tratamientos en total, constituidos de la manera siguiente: Testigos o tratamientos comparadores, 3, uno con un nivel de cero kilogramos de Nitrógeno por hectárea y sin inoculante, y los otros con niveles de 50 y 100 kilogramos por hectárea respectivamente y sin inoculante, los restantes tratamientos corresponden a nueve cepas de Rhizobium phaseoli procedentes de la colección del Centro Internacional de Agricultura Tropical, (CIAT) en Cali, Colombia. Recomendadas todas como las mejores en experimentos internacionales recientes; éstas cepas son las siguientes: CIAT 166, 127, 904, 57, 255, 407, 727, 952, 390.

Todas pertenecientes a la colección IBIT, a continuación se describen en el siguiente cuadro: Extracto del Documento (6).

CEPA	CARACTERISTICAS
CIAT 57:	Se obtuvo en la Universidad de Sidney (Australia) como CC 511 en 1971. Se probó repetidamente a la respuesta simbiótica entre los años 1972 y 1979. Se incluyó en las cepas IBIT entre 1979 y 1980.
CIAT 127:	Aislada como Cepa Z 65, en Tenerife, Colombia en 1978, últimamente probada para infectividad en 1979 siendo altamente efectiva, incluida en las IBIT en 1980.
CIAT 166:	Aislada como Z 151, en Buga, Colombia en 1972, probada para infectividad en 1979, siendo altamente efectiva, incluida en las IBIT en 1980. También se le aprovecha como mutante.
CIAT 255	Aislada como Z 272, en Danlí, Honduras en 1972, probada en la respuesta simbiótica de 1972 a 1979. Es altamente efectiva. Sin embargo, responde erráticamente en plantaciones de campo. Incluida en las IBIT entre 1979 y 1980.
CIAT 390:	Aislada como Z 723, en Popayán, Colombia en 1975, probada para infectividad en 1979. Siendo altamente efectiva. Incluida en las IBIT en 1980
CIAT 407:	Aislada como CIAT DE CAMPO, en Cali, Colombia en 1974 probada para infectividad en 1979 y es altamente efectiva. Incluida en las IBIT, en el año 1980.
CIAT 727:	No incluida en el documento (6) a la fecha de edición.
CIAT 904:	Obtenida en S.M.T., Saído, Brasil como C88 en 1979, 6 487 RGS Porto Alegre. Probada para infectividad en 1979, es efectiva. Se incluyó en las IBIT entre 1979 y 1980.
CIAT 952:	No incluida en el documento (6) a la fecha de edición.

Bloques la Azar:

Constó de doce unidades experimentales por bloque y un total de cuatro bloques o repeticiones y se trabajó con 33 grados de libertad en el error, considerando esto como aceptable de acuerdo a Reyes Castañeda (17), utilizando la fórmula, GLE es igual o mayor de 12 y éstos se determinan de la siguiente forma: $(T-1)(r-1)$ en donde: GLE: grados de libertad en el error, T: tratamientos, r: repeticiones o bloques.

Se trabajó con una parcela experimental de 18 Mts.² y 48 parcelas en total, lo que representa un área neta del experimento de 1080 Mts.², tomando en cuenta las calles de 1 Mts. de ancho dentro de cada bloque, los cuales estuvieron en forma perpendicular a la pendiente que en este caso no sobrepasa el 3%, los surcos dentro de cada parcela también fueron colocados de forma perpendicular a la pendiente, estableciéndose de acuerdo a esto la longitud de los bloques de 72 mts. por 3 mts. de ancho.

Modelo Estadístico:

De acuerdo a Melgar (14), el modelo usado fue el siguiente:

$$\bar{Y}_{ij} = M + B_i + t_j + E_{ij}$$

Dondé: $\bar{Y}_{ij}$: Variable respuesta observada en el bloque i con tratamiento j
 M: Efecto de la media general
 B_i : Efecto del bloque i.
 t_j : Efecto del tratamiento j.
 E_{ij} : Efecto debido a factores no incluidos en el modelo (error experimental)

Análisis Estadístico:

Se efectuó análisis de varianza para cada uno de los parámetros estudiados y luego se sometieron a la prueba de TUCKEY con significancia del 5% para establecer los tratamientos más favorables.

CROQUIS DE CAMPO

12	10	6	11	1	9	7	4	3	2	8	5
9	7	10	8	4	1	5	2	6	3	12	11
10	12	6	11	8	5	7	3	4	1	2	9
9	6	7	10	4	2	1	12	3	11	5	8

N

1. CIAT 166
2. CIAT 127
3. CIAT 904
4. CIAT 57
5. CIAT 255
6. CIAT 407

7. CIAT 727
8. CIAT 952
9. CIAT 390
10. NITROGENO 00 Kg./ha.
11. NITROGENO 50 Kg./ha.
12. NITROGENO 100 Kg./ha.

La importancia de cada uno de los parámetros estudiados, se menciona en la revisión de bibliografía en este mismo trabajo. Los datos que se tomaron son los siguientes:

- Número de nódulos
- Peso de nódulos y peso por nódulo
- Color de los nódulos (eficiencia de los mismos)
- Distribución de los nódulos en la raíz
- Peso en materia seca de la parte aérea del vegetal.

Todos los parámetros anteriores fueron evaluados al momento de la floración.

- Rendimiento en grano (peso) seco estandarizado al 12% de humedad.
- Porcentaje de humedad del grano.

Y estos últimos determinados y evaluados luego de observar la maduración total de la plantación; color amarillo, cierta defoliación, vainas secas pero no abierta. (9).

Toma de Muestras:

Se efectuó un único muestreo al momento de la floración, en donde se procedió a tomar diez plantas por parcela, cinco de cada surco, utilizando los surcos centrales y dejando 0.5 M, a partir del borde de la parcela y el inicio de la toma de la muestra, esto para evitar el efecto de borde que se establece; aquí es importante señalar que cada parcela tenía seis surcos a 0.5 M, entre cada uno y un largo de 6 M.

El material muestreado fue trasladado al laboratorio en donde se separó la parte aérea para su determinación en materia seca y la parte subterránea para determinar nodulación: número, color, peso y forma de distribución dentro del sistema radicular.

El área a utilizar en la determinación del rendimiento en grano para cada parcela se estableció de la siguiente manera: Se eliminaron los dos surcos terminales por constituir efecto de borde y se cosecharon los cuatro centrales a partir de 0.5M., después de donde se efectuó el muestreo a la floración, quedando por lo consiguiente un área de cosecha de 8 metros cuadrados por parcela.

La cosecha se realizó a mano lo mismo que la extracción del grano colocandola producción de cada parcela en recipientes individuales, fueron pesados y evaluados en cada uno de ellos su porcentaje de humedad.

X.

MANEJO DEL EXPERIMENTO

X.1. Siembra:

Esta coincidió con el inicio de las lluvias en un terreno preparado con anterioridad, tal y como ya se mencionó de acuerdo a ciertos análisis efectuados.

Las distancias de siembra fueron las siguientes: 0.05 metros entre surcos y a 0.5 metros entre plantas, ésta última se hizo así para luego efectuar un raleo y que la densidad de población fuera la óptima. Junto a la siembra se aplicaron como ya se mencionó: Volatón, Furadan triple, superfosfato y urea, ésta última sólo en las parcelas, con tratamientos de Nitrógeno.

X.2. Raleo:

Se efectuó un raleo a 10 días después de la germinación lográndose con éste un distanciamiento entre plantas de 0.10 metros.

X.3. Limpias:

Se efectuaron de forma manual con azadón, realizándose la primera a una semana después del raleo y la segunda, luego de la floración.

X.4. Control de Plagas y Enfermedades:

Fue necesario hacer aplicaciones de insecticida "Metasistox", tomando en cuenta el efecto residual del FURADAN que fue aplicado al momento de la siembra y éste es aproximadamente de 30 días. Las plagas problema en el área fueron:

- Mosca blanca (Aleirodidae); y,
- Tortuguillas (Crisomelidae y Coccinellidae).

La misma situación se presentó en cuanto al uso de fungicidas, fue necesario hacer aplicaciones de "poliran-combi", combatiendo la incidencia de las enfermedades fungosas más comunes en el cultivo del frijol, siendo éstas las siguientes:

- Roya del frijol (Uromycis phaseoli); y,
- Mancha angular (Tsariopsis griseola).

X.5. Fertilizaciones:

Se aplicó Nitrógeno en forma de urea, días antes de la floración, de acuerdo a Tobías (18) ésta se realizó en bandas laterales al cultivo y únicamente en aquellos tratamientos que contemplaron niveles de Nitrógeno (50 y 100 Kg./Ha.), en ésta aplicación se proporcionó el 75% de la dosis total de Nitrógeno, pues al momento de la siembra se suministró la primera parte (25%).

XI.

RESULTADOS Y DISCUSION

CUADROS DE RESULTADOS

PORCENTAJE DE NODULOS EFICIENTES					
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	86	87	84	87	86.0
127	89	86	86	85	86.5
904	88	90	87	86	87.75
57	87	88	88	88	87.75
255	89	89	87	87	88.0
407	91	93	92	89	91.25
727	90	90	90	90	90.0
952	92	95	93	93	93.25
390	95	95	92	96	94.5
N 00	69	69	64	57	64.75
N 50	84	83	84	86	84.25
N 100	81	85	89	83	84.25

NUMERO DE NODULOS A LA FLORACION					
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	160	122	146	153	145.25
127	148	134	152	154	147.00
904	143	141	107	140	132.75
57	158	133	146	149	146.50
255	149	109	142	104	126.00
407	103	125	130	141	124.75
727	105	154	123	138	130.00
952	124	130	140	122	129.00
390	96	105	108	114	105.75
N 00	126	133	140	136	133.75
N 50	76	71	83	70	75.00
N 100	63	74	81	77	73.75

PESO POR NODULO A LA FLORACION (Gr.)					
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	0.0074	0.0174	0.0127	0.0156	0.0133
127	0.0107	0.0168	0.0093	0.0135	0.0126
904	0.0126	0.0149	0.0138	0.0103	0.0129
57	0.0127	0.0167	0.0140	0.0236	0.0168
255	0.0141	0.0207	0.0091	0.0285	0.0181
407	0.0382	0.0221	0.0187	0.0270	0.0265
727	0.0234	0.0181	0.0155	0.0148	0.0180
952	0.0318	0.0303	0.0156	0.0240	0.0254
390	0.0370	0.0273	0.0273	0.0349	0.0316
N 00	0.0122	0.0076	0.0083	0.0178	0.0115
N 50	0.0270	0.0268	0.0122	0.0220	0.0220
N 100	0.0303	0.0287	0.0166	0.0352	0.0277

PESO DE NODULOS A LA FLORACION (Gr.)					
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	1.1886	2.1300	1.8489	2.3795	1.8867
127	1.5799	2.2561	1.4138	2.0743	1.8310
904	1.7982	2.1054	1.4746	1.4366	1.7037
57	2.0085	2.2191	2.0521	3.5190	2.4497
255	2.1075	2.2602	1.2988	2.9665	2.1582
407	3.9326	2.7575	2.4259	3.8065	3.2306
727	2.4561	2.7889	1.9026	2.0450	2.2981
952	3.9432	2.5870	2.1833	2.9347	2.9120
390	3.5481	2.8681	2.9449	3.9779	3.3322
N 00	1.5321	1.0045	1.1577	2.4210	1.5288
N 50	2.0486	1.8999	1.0139	1.5406	1.6257
N 100	1.9086	2.1263	1.3429	2.7066	2.0211

MATERIA SECA DE LA PARTE AEREA A LA FLORACION (Gr.)					
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	27.0	29.2	18.1	21.4	23.9
127	35.1	19.8	22.3	20.9	24.5
904	22.9	26.4	28.1	24.9	25.6
57	31.2	28.4	26.1	26.9	28.2
255	29.9	29.6	33.9	21.1	28.6
407	34.9	29.9	34.1	34.7	33.3
727	33.3	34.4	31.1	29.2	32.0
952	28.9	32.9	40.7	31.0	33.4
390	38.6	35.9	42.2	36.7	38.4
N 00	20.4	20.6	21.6	21.8	21.1
N 50	38.9	35.4	40.9	39.9	38.8
N 100	40.2	32.6	39.3	35.9	37.0

RENDIMIENTO DE GRANO (12% Hum.) (Gr.)					
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	$\bar{x}$
CIAT 166	573.3	743.4	711.2	750.7	694.6
127	907.7	480.1	665.6	844.9	724.6
904	636.8	724.0	817.1	827.2	751.3
57	760.4	797.7	796.0	928.2	820.6
255	849.0	893.3	860.1	750.7	838.5
407	1091.7	854.4	882.0	924.6	940.70
727	920.8	1087.1	767.4	760.5	884.0
952	791.7	1033.1	898.8	869.8	898.4
390	866.7	1027.0	1162.2	921.2	994.2
N 00	818.1	634.7	683.8	636.8	693.4
N 50	1271.1	938.2	1222.1	947.0	1094.6
N 100	1321.6	1000.1	1032.0	1004.1	1089.4

ANALISIS DE VARIANZA

F.V.	G. LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F. CALCULADA
Bloques	3	4.9521		
Tratamientos	11	16.7605	1.5237	7.1221 g
Error	33	7.0599	0.2139	
Total	47	28.7725		

% Nódulos eficientes a la floración.

C.V. = 2.57%

Bloques	3	1554.08		
Tratamientos	11	28801.75	2618.34	6.96 g
Error	33	12409.42	376.04	
Total	47	42765.25		

No. de nódulos a la floración.

C.V. = 16.11%

Bloques	3	0.000460		
Tratamientos	11	0.002043	0.0001857	7.4311 g
Error	33	0.000825	0.0000250	
Total	47	0.003328		

Peso por nódulo a la floración.

C.V. = 25.00%

Bloques	3	4.9521		
Tratamientos	11	16.7605	1.5237	7.1221 g
Error	33	7.0599	0.2139	
Total	47	28.7725		

Peso de Nódulos a la floración.

C.V. = 16.11%

Bloques	3	80.7422		
Tratamientos	11	1567.1836	142.4712	10.2977 g
Errores	33	456.5625	13.8352	
Total	47	2104.4883		

Materia seca parte aérea de la floración.

C.V. = 12.20%

Bloques	3	21712.00		
Tratamientos	11	882672.00	80242.8750	4.9493 g
Error	33	535024.00	16212.8477	
Total	47	1439408.00		

Rendimiento de grano (12% humedad)

C.V. = 14.6%

g Se rechaza la hipótesis nula (H_0 .)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Biblioteca Central

Sección de Tesis

CUADRO N° 1

I			II			III			IV			V			VI		
% Nódulos eficientes			N° de nódulos a la floración			Peso por nódulo a la floración			Peso de nódulos a la floración			Mat. seca Plant. a la Flor.			Rend. de grano seco **		
Trat.	Media	Diferencia	Trat.	Media	Dif.	Trat.*	Media	Dif.	Trat.	Media*	Dif.	Trat.	media*	Dif.	Trat.	media *	Dif.
CIAT 390	94.50	A	CIAT 127	147.00	A	CIAT 390	0.0312	A	CIAT 390	3.3322	A	N 50	38.775	A	N 50	1094.5996	A
952	93.25	AB	57	146.50	A	N 100	0.0277	AB	407	3.2306	AB	CIAT 390	38.350	A	N100	1089.4492	A
407	91.25	ABC	166	145.25	A	CIAT 407	0.0265	AB	952	2.9120	ABC	N 100	37.000	AB	CIAT 390	994.2749	AB
727	90.00	ABCD	N 00	133.75	A	952	0.0254	ABC	57	2.4497	ABCD	CIAT 407	33.400	ABC	407	940.6748	AB
255	88.00	BCDE	CIAT 904	132.75	AB	N 50	0.0220	ABCD	727	2.2981	ABCD	952	33.375	ABC	952	898.3490	AB
57	87.75	BCDE	727	130.00	AB	CIAT 255	0.0181	BCD	255	2.1582	BCD	727	32.000	ABCD	727	883.9497	AB
904	87.75	BCDE	952	129.00	AB	727	0.0180	BCD	N 100	2.0211	CD	255	28.625	ABCDE	255	838.5249	AB
127	86.50	C DE	255	126.00	AB	57	0.0168	BCD	CIAT 166	1.8867	CD	57	28.150	BCDE	57	820.5750	AB
166	86.00	C DE	407	124.75	AB	166	0.0133	CD	127	1.8310	CD	904	25.575	BCDE	904	751.2749	B
N 100	84.50	DE	390	105.75	BC	904	0.0129	CD	904	1.7037	D	127	24.525	CDE	127	724.5747	B
N 50	84.25	E	N 50	75.00	C	127	0.0126	D	N 50	1.6257	D	166	23.125	DE	166	694.6499	B
N 00	64.75	F	N 100	73.75	C	N 00	0.0115	D	N 00	1.5288	D	N 00	21.100	E	N 00	693.3499	B

* Peso en gramos

** (Standardizado a 12% de humedad)

CORRELACIONES (CUADRO No. 2)

1. A mayor % de nódulos eficientes, mayor peso en materia seca (s.t.n.)
2. A mayor % de nódulos eficientes, mayor rendimiento en grano (s.t.n.)
3. A mayor % de nódulos eficientes, mayor peso de nódulos (s.t.n.)
4. A mayor % de nódulos eficientes, menor número de nódulos (s.t.n.)
5. A mayor número de nódulos, menor peso en materia seca (s.t.n.)
6. A mayor número de nódulos, menor rendimiento en grano (s.t.n.)
7. A mayor número de nódulos, menor peso de nódulos (s.t.n.)
8. A mayor número de nódulos, menor peso por nódulo (c.t.n.)
9. A mayor peso por nódulo, mayor peso en materia seca (s.t.n.)
10. A mayor peso por nódulo, mayor rendimiento en grano (s.t.n.)
11. A mayor peso de nódulos, mayor peso en materia seca (s.t.n.)
12. A mayor peso de nódulos, mayor rendimiento en grano (s.t.n.)
13. A mayor peso en materia seca, mayor rendimiento en grano (c.t.n.)

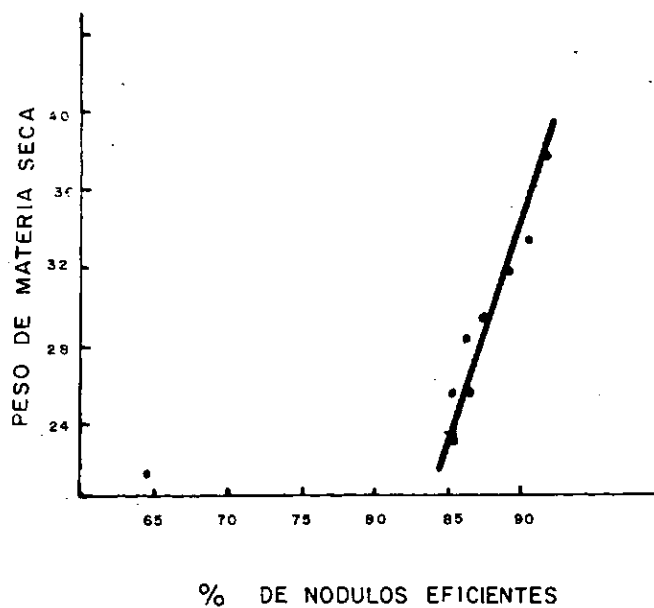
s.t.n. = Sin tratamiento 50 y 100 Kg/A de Nitrógeno.

c.t.n. = Con tratamientos nitrogenados.

①

$$Y = 0.49 X - 13.93$$

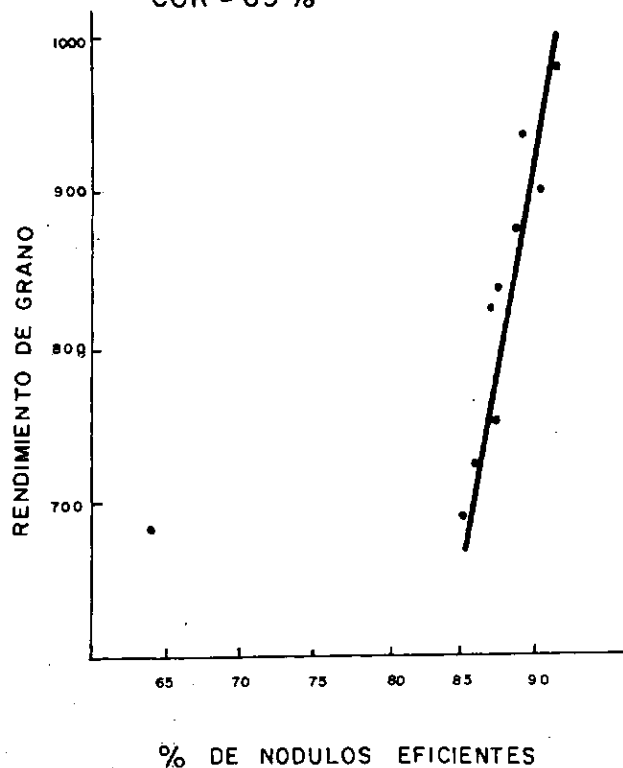
COR = 75 %



②

$$Y = 88 X + 59.0$$

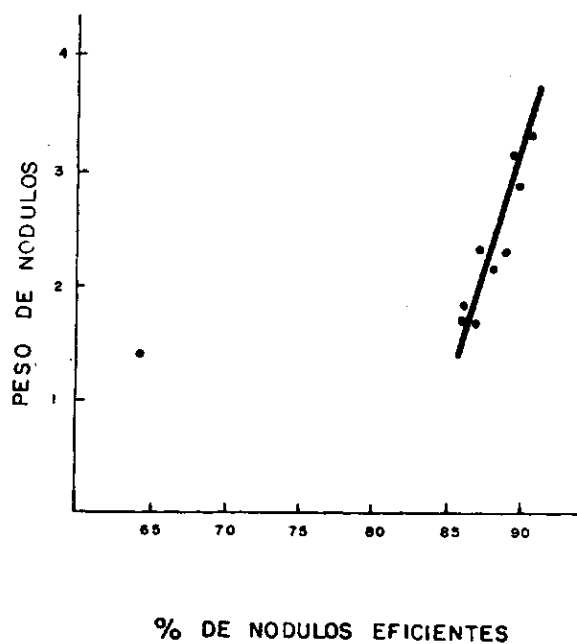
COR = 69 %



③

$$Y = 0.05 X - 2.26$$

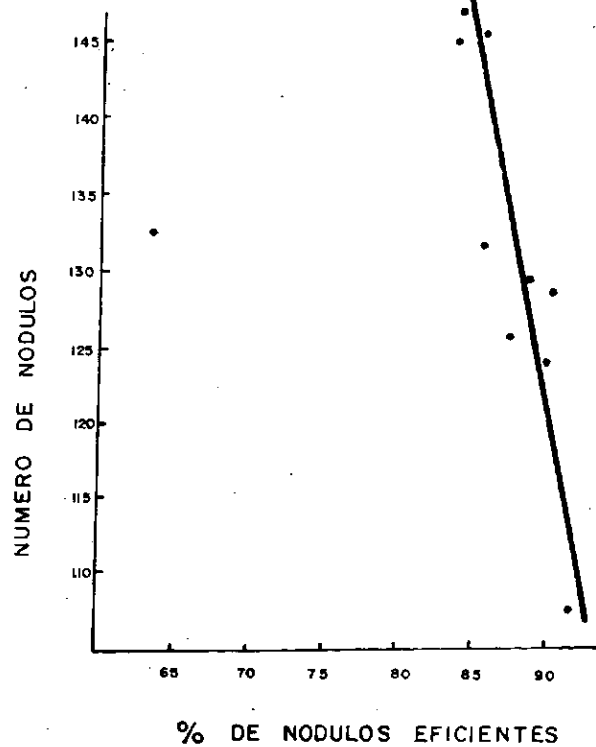
COR = 69 %



④

$$Y = 0.49 X + 179.04$$

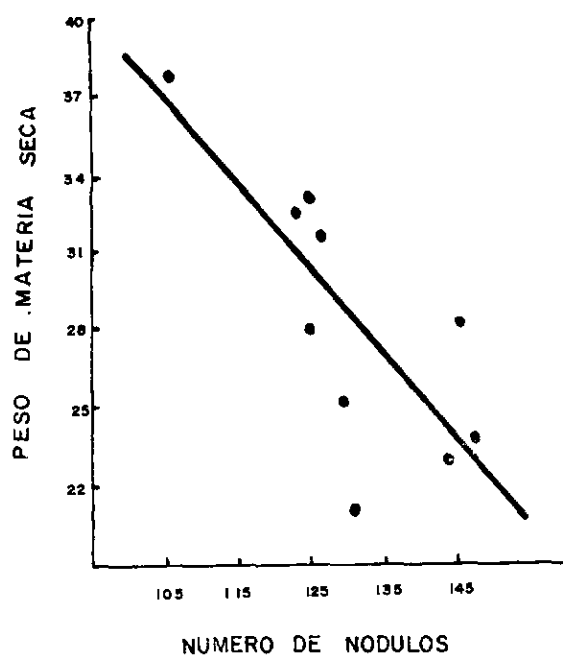
COR = - 33 %



5

$$Y = -0.33 X + 73.02$$

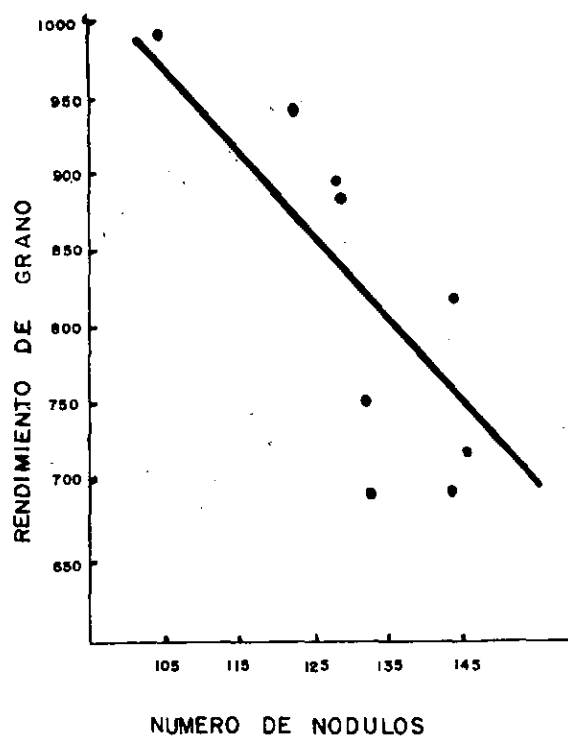
$$\text{COR} = -77\%$$



6

$$Y = -6.62 X + 1698.62$$

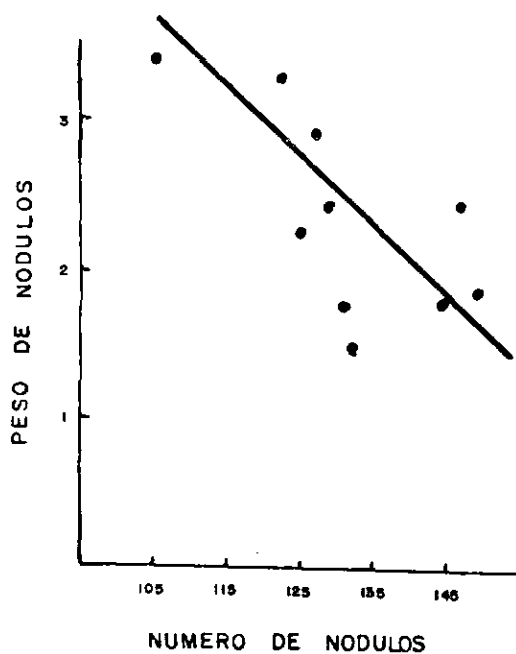
$$\text{COR} = -78\%$$



7

$$Y = -0.03 X + 6.75$$

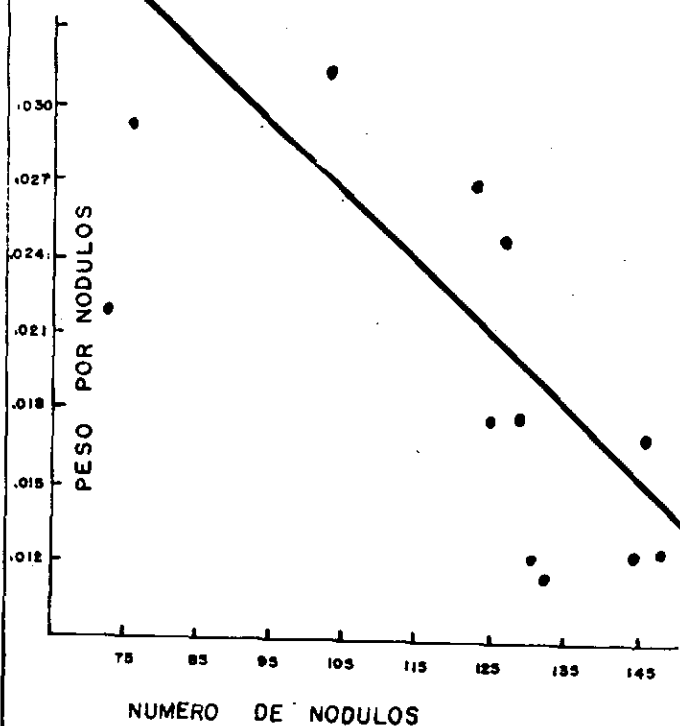
$$\text{COR} = -65\%$$



8

$$Y = -0.00018 X + 0.041$$

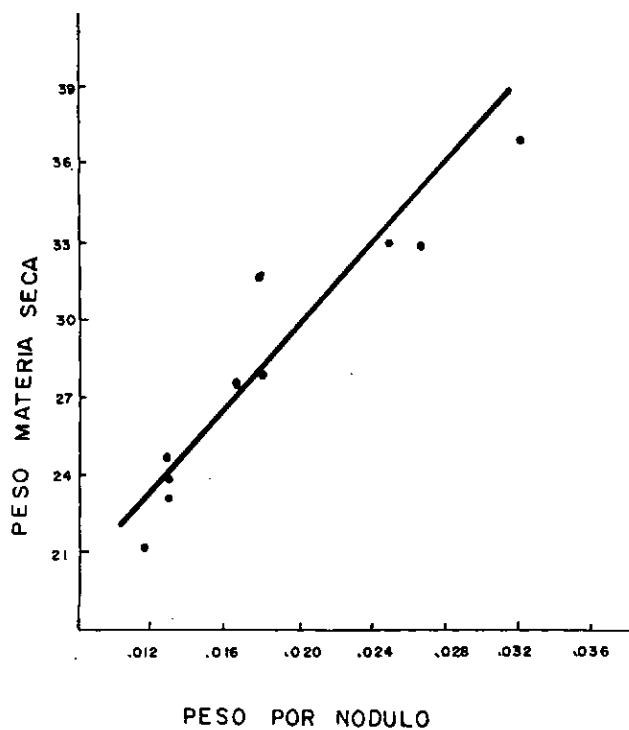
$$\text{COR} = -65\%$$



9

$$Y = 742.72 X + 14.87$$

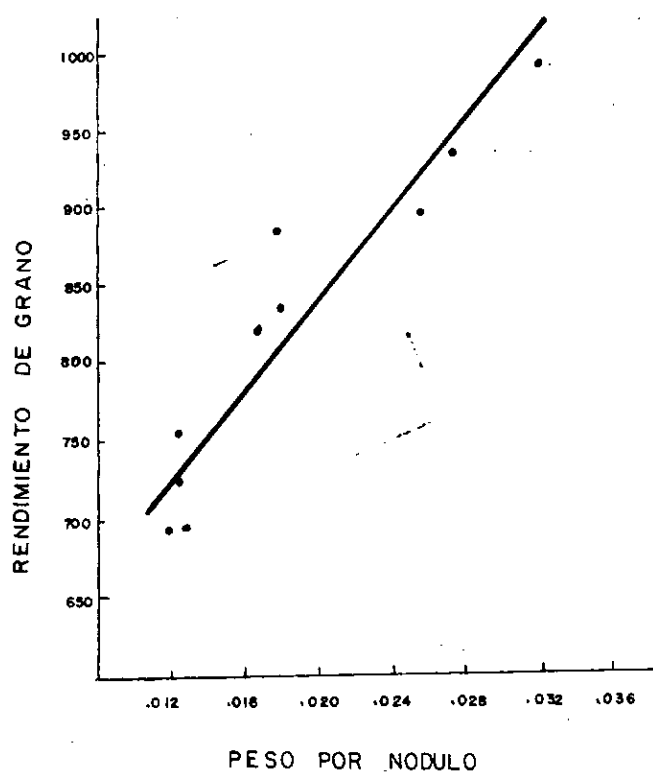
COR = 95%



10

$$Y = 1448.12 X + 551.78$$

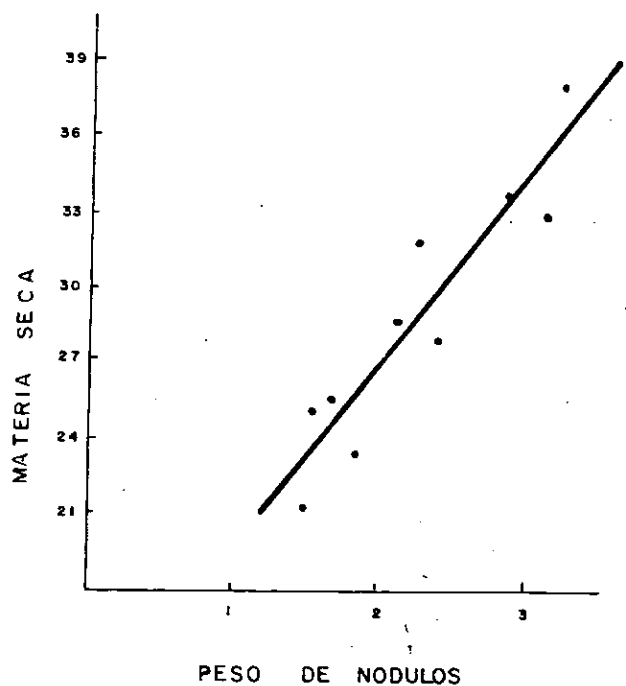
COR = 95%



11

$$Y = 7.8 X + 10.7$$

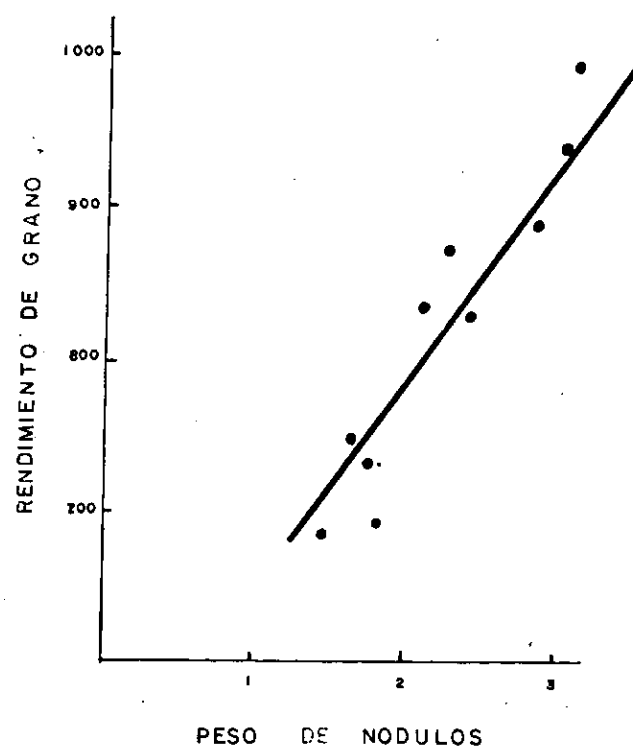
COR = 94 %



12

$$Y = 155.32 X + 461.65$$

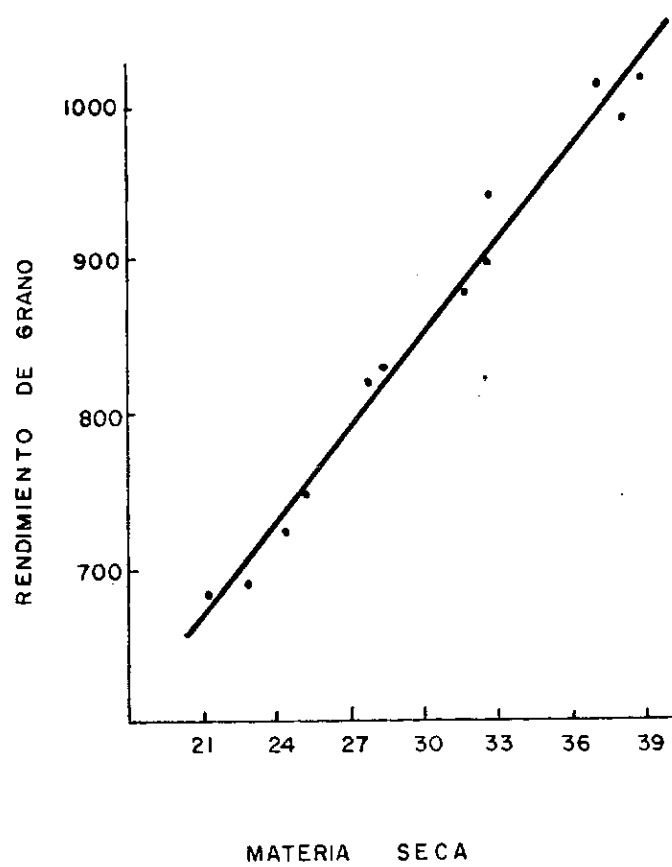
COR = 94 %



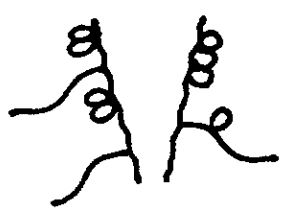
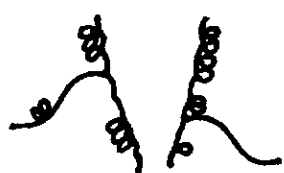
13

$$Y = 24.3 X + 125.0$$

COR = 97 %



CUADRO N° 3
DISTRIBUCION DE LA NODULACION

1	2	3					
							
TRATAMIENTO	I	II	III	IV	FRECUENCIAS		
					1	2	3
CIAT 390	1	1	2	1	3	1	0
407	2	1	1	1	3	1	0
952	1	2	1	2	2	2	0
57	3	2	2	1	1	2	1
255	1	2	3	3	1	1	2
166	2	3	1	3	1	1	2
727	1	3	3	2	1	1	2
904	3	2	2	2	0	3	1
127	2	3	3	2	0	2	2
N 50	3	2	3	2	0	2	2
N 100	2	2	3	3	0	2	2
N 00	2	3	3	3	0	1	3

Arriba aparecen los tres distintos patrones de distribución nodular en la raíz de la planta, identificados como patrones: 1-2-3; la columna de la derecha (frecuencias) representa el número de veces que se repite cada uno de los patrones de distribución dentro de las cuatro repeticiones del ensayo.

Para discutir los resultados obtenidos partiremos de dos puntos base; ellos son:

- a) El análisis global de comportamiento de las cepas; y,
- b) El análisis individual de comportamientos de las mismas.

A. Análisis Global de Comportamiento de las Cepas:

Iniciaremos esta discusión con un análisis global de los resultados, es decir, tratando de enlazar cada uno de los parámetros de medición tomados, que en un resumen son: porciento de nódulos eficientes, peso unitario por nódulo, peso total y número de ellos así como el peso de materia seca de la planta a la floración y el rendimiento por grano. Para esto será necesario observar las gráficas de correlación (No. 1, 2,12 y 13) y el Cuadro No. 2, que resume ésta información.

Como el objetivo de éste trabajo es estudiar la eficiencia o ineficiencia en la fijación de Nitrógeno Atmosférico por parte de las cepas inoculadas, será necesario ir relacionando los diferentes parámetros de medición hasta obtener una interpretación total de los resultados.

Siguiendo el orden planteado de los parámetros a medición, analizaremos primero el porcentaje de nódulos eficientes. Al comparar éste contra los otros parámetros (gráfica y cuadro No. 2) se puede observar que cuando el porcentaje de nódulos eficientes es mayor existe también un mayor peso de materia seca por parte de la planta, un mayor rendimiento de grano y un mayor peso de nódulos (correlaciones y gráficas 1, 2 y 3 respectivamente) pero se verifica una disminución en el número de los mismos (correlación y gráfica No. 4). Las primeras dos correlaciones son fácilmente explicables ya que es comprensible que si un número mayor de nódulos está fijando Nitrógeno, éste redundará en beneficio del crecimiento de la planta y de la producción de grano, máxime si sucede que el peso de los nódulos también aumenta con el porcentaje de nódulos eficientes, como se aprecia en la tercera correlación, que puede explicarse si se analizan conjuntamente las correlaciones 4 y 7. Se había dicho que al aumentar el porcentaje de nódulos eficientes disminuye el número de los mismos, ahora bien, la correlación 7 nos dice que el número de los nódulos al aumentar hace disminuir el peso total de los mismos o lo contrario, al disminuir aumenta el peso total de los nódulos. Con este hecho se explica claramente que si disminuye el número de nódulos se aumenta el porcentaje de nódulos eficientes y en consecuencia se aumenta también el peso de nódulos, caso de la correlación No. 3.

Otro de los parámetros medibles que sirven para evaluar el nivel de fijación de Nitrógeno por parte de la bacteria y tal como lo manifiesta Kolling (10) es el número de nódulos, sobre éste aspecto en cuestión y después de analizar algunas correlaciones se encuentra que en todos los casos (correlaciones y gráficas 5, 6, 7 y 8) el número de los nódulos es directamente inverso al peso de materia seca de la planta, rendimiento de grano, peso total de nódulos y peso por cada nódulo; lo que indica que aquellas cepas que presentan un número elevado de nódulos manifiestan ba

ja eficiencia en la fijación de Nitrógeno Atmosférico, ésto se debe indudablemente, a que cuando los nódulos son muchos, su tamaño es menor y consecuentemente, su peso es menor, características de los tipos de nódulos ineficientes para la fijación de Nitrógeno. Esta última aseveración se confirma al analizar el peso promedio por nódulo y correlacionarlo con el número total de los mismos en la planta (correlación y gráfica No. 8).

Aclarando el aspecto relativo al número de nódulos se pueden observar las correlaciones y gráficas 9, 10, 11 y 12; en las que tanto el peso por nódulo como el peso total de nódulos, tienen una influencia clara sobre el rendimiento de materia seca como sobre el rendimiento de grano, o sea que cuando los nódulos son grandes y eficientes fijadores de Nitrógeno van a reflejar un buen peso total de los mismos en la planta y consecuentemente un buen rendimiento en materia seca y rendimiento de grano. Estos dos últimos parámetros se explican por sí mismos al observar el resultado de la correlación No. 13, que indica que a mayor peso de materia seca, hay mayor rendimiento de grano en la planta.

Es importante indicar que en todas las correlaciones discutidas con excepción de la 8 y la 13, no se tomaron en cuenta los tratamientos N. 50 y N. 100 (50 y 100 Kg. de Nitrógeno por hectárea), lo anterior por la no coincidencia de los resultados, manifestando una falta de correlación debida a que la fertilización nitrogenada afecta el desarrollo nodular tal como ha sido demostrado por Graham (8) y otros investigadores.

B. Análisis Individual de Comportamiento de las Cepas:

Después del análisis global de comportamiento de todos los parámetros, pasamos al análisis de las respuestas directas de comportamiento de cada uno de los tratamientos, lo que indudablemente podrán ser mejor explicados bajo la base inicial que se efectuó en ésta discusión; en resumen, los resultados mostraron para cada parámetro de medición el siguiente comportamiento:

a) Porcentaje de Nódulos Eficientes:

1. Las tres cepas que obtuvieron un porcentaje de nódulos eficientes fueron CIAT 390, 952 y 407.
2. Los tres tratamientos que manifestaron los más bajos porcentajes de nódulos eficientes fueron N 00, N 50 y N 100, que dicho de otra manera, corresponden a los tratamientos sin inoculante o sea, la cepa nativa del suelo.

b) Número de Nódulos a la Floración:

1. Las tres cepas con mayor número de nódulos corresponden a: CIAT 127, 57, 166 y al tratamiento N 00 (cepa nativa).
2. Los tratamientos con menor número de nódulos son: N 100, N 50 y la cepa CIAT 390.

c) Peso por Nódulo:

1. Los tratamientos CIAT 390, 407, así como los tratamientos N 50 y N 100, obtuvieron los pesos más altos.
2. Los pesos más bajos se obtuvieron con los tratamientos N 00, CIAT 127 y 904.

d) Peso Total de Nódulos:

1. Las cepas CIAT 390, 407, y 952, manifestaron los mejores pesos totales de nódulos.
2. Los tratamientos N 100, N 50 (sin inoculante) y CIAT 904 tuvieron los pesos promedio de nódulos totales más bajos.

e) Materia Seca de la Planta a la Floración:

1. Los pesos más altos corresponden a los tratamientos N 50 y N 100 así como las cepas CIAT 390 y 407.
2. Los que presentan menor peso de materia seca fueron N 00, CIAT 166 y 127

f) Rendimiento de Grano:

1. Los tratamientos N 50, N 100 y CIAT 390 y 407 manifestaron los mejores rendimientos.
2. Los más bajos rendimientos correspondieron a N 00, CIAT 166 y 127.

Los resultados que se observan en el resumen anterior son respuestas lógicas a las distintas interacciones de los parámetros medidos, sólo en algunas ocasiones, éstas respuestas serán explicadas con posibles causas de acuerdo a lo revisado en éste trabajo.

El porcentaje de nódulos eficientes alto, es prueba de que la bacteria inoculada es eficiente en la fijación de Nitrógeno, tal y como lo demuestran las cepas CIAT 390 952 y 407 (inciso a, numeral 1), ésto se demuestra con el hecho de que estos tratamientos manifestaron bajo número de nódulos corroborando lo indicado por Kolling (10), cuando señala que las cepas eficientes al no existir limitación ambiental, ni nutricional, no hay formación de un número elevado de los mismos, pero éstos mejoran su crecimiento.

El mejor crecimiento de los nódulos también explica que las cepas CIAT 390 y 407 tengan los más altos pesos por nódulo (inciso c, numeral 1). Podría ser discutido que en los incisos b y c, numerales 2 y 1, que se refieren como ya dijimos a número y peso por nódulo respectivamente, aparezcan con menor número y buen peso por nódulo los tratamientos con Nitrógeno (N 50 y N 100), pero ésto es explicable, si tomamos en consideración lo observado por Kolling (10) y Graham (8) que indican en forma separada dos cosas: Kolling dice que el Nitrógeno aplicado tiene un efecto negativo en el número de nódulos y Graham cita que un nivel mínimo de Nitrógeno aplicado a la siembra funciona como un ESTARTER para el desarrollo de la planta,

así como para el desarrollo nodular de la misma, tal y como ocurre en el presente caso, ya que si se revisa la metodología experimental, se observa que los niveles de fertilizante nitrogenado se aplicaron en dosis fraccionadas, siendolas iniciales de 12.5 y 25.0 Kilogramos por hectárea a la siembra, lo cual pudo presuponer que la dosis inicial no fue muy alta pero tampoco baja, actuó en parte en forma negativa disminuyendo la colonización de bacterias en la raíz, caso contrario al tratamiento N 00. Y que conforme el Nitrógeno aplicado fue utilizado por la planta y/o se perdió por otras causas ambientales los nódulos colonizados pudieron crecer y obtener buen peso por nódulo más no un buen peso total (inciso d, numeral 2).

En el inciso d, numeral 1 se resume lo relacionado al peso total de nódulos y nuevamente las cepas CIAT 390, 407 y 952 manifestaron los pesos más altos. Para definir su eficiencia sólo resta observar que tanto en el peso de materia seca de la planta como en el rendimiento de grano (inciso e y f, numerales 1 y 1 respectivamente), las cepas CIAT 390 y 407 principalmente aparecen compitiendo con los rendimientos de materia seca y grano de la planta con los tratamientos que llevan Nitrógeno. Como es indiscutible, el Nitrógeno sólo puede llegar a la planta en este experimento por:

- a) El que proviene de la fertilización nitrogenada y esto ocurre en los tratamientos N 50 y N 100;
- b) El que proviene de la atmósfera y es fijado simbióticamente por parte de las cepas inoculadas.

Esto demuestra que las cepas CIAT 390 y 407 principalmente resultan ser tan eficientes en la fijación de Nitrógeno, que es comparable estadísticamente al suministro artificial de Nitrógeno en niveles de 50 y 100 kilogramos por hectárea para este suelo y esta variedad de frijol ICTA-81 con el que se trabajó.

Por último y para terminar se hará referencia al patrón de nodulación que de acuerdo a lo anotado por Kolling (11) indica que el patrón de distribución de los nódulos que crecen en la raíz principal y cuello de la misma, corresponden a aquellas cepas más eficientes en cuanto a la fijación de Nitrógeno Atmosférico. El análisis de los patrones de nodulación en las raíces de las plantas de frijol inoculado con las diferentes cepas así como también las no inoculadas (N 00, N 50 y N 100), que representan a la cepa nativa del suelo, mostró tal como lo cita la literatura, que las cepas más eficientes como son la CIAT 390 y 407, obedecieron a un patrón de nodulación ya mencionado como el mejor ya que en tres de las repeticiones del ensayo, este patrón se manifestó igual número de veces mientras que en el resto de las cepas presentaron otros patrones de distribución (ver Cuadro No. 3).

Después de discutir los resultados se concluye lo siguiente:

1. Las cepas que manifestaron un comportamiento con mayor eficiencia en la fijación de Nitrógeno Atmosférico en la variedad de frijol ICTA-81 y en la localidad estudiada fueron: CIAT 390 y 407, ya que sus rendimientos de grano por parte de la planta son similares a los rendimientos obtenidos con fertilización nitrogenada en niveles de 50 y 100 kilogramos por hectárea.
2. La cepa nativa del suelo demostró en este ensayo ineficiencia en la fijación simbiótica de Nitrógeno Atmosférico.
3. El porcentaje de nódulos eficientes (nódulos rosados) es un parámetro de medición, que puede ayudar en la evaluación de cepas de Rhizobium inoculadas, pues establece la capacidad fijadora de la bacteria.
4. El peso alto por nódulo indica buen desarrollo y eficiencia en la fijación de Nitrógeno por parte de él y es característico de una cepa con alta capacidad fijadora.
5. El rendimiento de grano es producto del nivel de Nitrógeno en el sistema (al ser optimizados los restantes elementos) y es un parámetro determinante en la evaluación de cepas Rhizobium inoculadas.
6. El peso de materia seca de la parte aérea de la planta a la floración es un parámetro de medición determinante en la evaluación de cepas de Rhizobium inoculadas.
7. El patrón de distribución de nódulos en la raíz, No. 1 (concentración de nódulos en la parte superior de la pivotante bien desarrollados) es el que manifiesta mayor eficiencia en la fijación de Nitrógeno en este ensayo.

Basándose en las conclusiones y la discusión de resultados, se recomienda:

1. Evaluar el comportamiento de las cepas CIAT 390 y 407 inoculándolas en otras variedades de frijol.
2. Evaluar el comportamiento de las cepas CIAT 390 y 407, en la variedad ICTA-81 en diferentes localidades (zonas de producción).
3. Realizar ensayos similares (con las mismas cepas) a éste, con la misma variedad de frijol y con otras en distintas localidades (zonas de producción).
4. Investigar en nuestro medio sobre niveles de fertilización nitrogenada máxima, al inicio del ciclo vegetativo del frijol que constituyan en dosis ESTARTER al buen desarrollo de la planta de frijol en sus inicios y que a la vez no interfiera con el buen desarrollo nodular por parte de la bacteria Rhizobium phaseoli.

1. AGUILERA, R. Problemas de fertilidad y fertilización en el cultivo del frijol en Guatemala. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, 1976. s.p.
2. ALAIDES, P. R. Curso sobre leguminosas y Rhizobium. Brasil, Centro de Energía Nuclear de Agricultura, 1980. s.p.
3. _____. Técnicas experimentales en investigación, invernadero y campo. Brasil, MIRCEN, s.f. 25 p.
4. BANCO DE GUATEMALA. Investigaciones agropecuarias e industriales. Guatemala, INDECA, 1980. 4p.
- 5) CHONAY, J. J. Efectos de la fertilización foliar sobre la compensación de la fijación biológica de nitrógeno por Rhizobium phaseoli en frijol (Phaseolus vulgaris). Tesis Mag. sc. Chapingo, México, Colegio de Post-graduados, 1981. 106 p.
- 7) GRAHAM, P. H. Importancia del hospedante en la nodulación y fijación del nitrógeno, por leguminosas con algunas sugerencias para mejorarlo. Cali, Colombia, CIAT s.f. 26 p.
- 8) _____. Problemas de la nodulación y fijación de nitrógeno en la simbiosis Rhizobium-Phaseolus. Cali, Colombia CIAT s.f. 26 p.
- 9) GUDIEL, V. Manual Agrícola SUPERB. Guatemala SUPERB, 1978. 385 p.
- 10) KOLLING, J. Avalcao da nodulcao en leguminosas. Porto Allegre, Brasil, Secretaría de Agricultura, s.f. 12 p.
- 11) _____. Selección de estirpes Rhizobium. Porto Allegre, Brasil, Secretaría de Agricultura, s.f. 12 p.
- 12) _____. Técnicas de inoculcao e avaliacao de nodulacao. Porto Allegre, Brasil, Secretaría de Agricultura, 1980. s.p.
- 13) LEGUME-RHIZOBIUM. Brasil. Curso sobre Rhizobium. Nardi y Niftal. Brasil, 1980. 100 p.
- 14) MELGAR, M. Curso de diseños experimentales. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, 1980. 100 p.
- 15) MICROBIOLOGICAL RESOURCES CENTER. Brasil, Boletín especial sobre Rhizobium. Porto Allegre, Brasil, 1978. 26 p.
- 16) MORALES, V. M. y HUBELL, D. H. Avances recientes en el proceso de infección de las leguminosas por Rhizobium. Brasil, e. e., 1978. 30 p.
- 17) REYES, P. Diseño de experimentos agrícolas. México, Editorial Trillas, 1978. 410 p.
- 18) TOBIAS, H. Curso de fertilidad y fertilización. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, 1981. 100 p.

- 19) UNIDAD DE PROGRAMACION ECONOMICA - SECRETARIA GENERAL DE INTEGRACION ECONOMICA CENTRO AMERICA. Estadísticas de investigación de mercados. Guatemala, INDECA, 1980. 4 p.
- 20) VINCENT, J. Manual práctico de rizobiología. Buenos Aires, Argentina, AID, 1975 325 p.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apertado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia	_____
Asunto	_____

"IMPRIMASE"

Dr. Antonio A. Sandoval, S.
DECANO

A circular stamp from the Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. The text 'UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA' is around the top, 'FACULTAD DE AGRONOMIA' around the bottom, and 'DECANO' in the center.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central
Sección de Tesis