

COMPARACION DE NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO POR
Rhizobium EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. Y SOYA *Glycine max* (L.) Merrill

Rosmira Rivero C. *

César T. Giraldo O.*

Peter H. Graham **

Se hizo un estudio comparativo de la nodulación y fijación de nitrógeno entre una variedad de frijol (*P. vulgaris*) de crecimiento arbustivo indeterminado (Porrillo sintético); otra del tipo indeterminado (Trujillo 3) y la variedad Pelican SM ICA de soya (*G. max*). Los materiales de frijol se inocularon con la cepa CIAT 57 de *Rhizobium phaseoli* y la soya con la cepa CIAT 4 de *Rhizobium japonicum*. Las muestras se tomaron cada 10 días entre los 18 y 78 días después de siembra determinándose la nodulación, fijación de nitrógeno y las características de crecimiento en las diferentes variedades.

La distribución de la nodulación en las tres variedades a lo largo del período vegetativo fué similar, con valores máximos hacia la época de floración. El mayor peso de nódulos se registró en la soya pero en número fueron considerablemente mayores los de los frijoles. Los más altos niveles de fijación se alcanzaron al inicio de la floración, registrando la soya valores apreciablemente mayores que los de frijol.

Los nódulos fueron más eficientes en las primeras semanas, pero al igual que la fijación su actividad específica declinó después de floración. El frijol de crecimiento indeterminado fijó más nitrógeno que la otra variedad.

A comparative study on nodulation and nitrogen fixation was conducted utilizing a non-climbing indeterminate dry bean variety (*P. vulgaris*) (Porrillo sintético) a determinate climbing (Trujillo 3) and a soybean variety (*G. max*) Pelican SM. The first two were inoculated with strain CIAT 57 (*Rhizobium phaseoli*) and the soybean with strain CIAT 4 (*Rhizobium japonicum*). Samples were taken every 10 days between 18 and 78 days after planting and the degree of nodulation, the amount of nitrogen fixed (ethylene produced) and growth analysis were assessed.

The distribution of nodules dry weight & number in the 3 varieties throughout the vegetative period was similar in pattern, with maximum values occurring at the flowering stage. The largest weight of nodules was found in soybean while the largest number of nodules occurred in the bean varieties. The largest levels of ethylene produced were found at flowering, with soybean having appreciably larger levels than the dry bean varieties.

Nodules were more efficient during the first weeks, with their specific activity declining after flowering. The indeterminate climbing bean variety fixed more nitrogen than the non-climbing indeterminate variety.

* Candidatos a Ingeniero Agrónomo

** Líder Programa de Producción de Frijol CIAT- Palmira

Jurado: Renato Cavallo V., I.A., Nelson Castellar P. I.A. y Rubén Darío Zárate I. A.
Extractó: H. Quintero V.

INTRODUCCION

La deficiencia de nitrógeno en los suelos, el carácter intensivo de la explotación agrícola y el alto costo de los fertilizantes nitrogenados, son algunos de los factores que limitan la producción agrícola en las regiones tropicales. Para superar esta situación los investigadores buscan nuevas fuentes de suplementación de este elemento, una de las cuales ha sido el aprovechamiento de la asociación simbiótica que existe entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium*.

Por las razones anteriores y considerando la importancia económica y dietética del fríjol (*P. vulgaris*) y de la soya (*G. max*), se decidió realizar este experimento, con los siguientes objetivos:

1. Comparar la eficiencia de la práctica de inoculación con *Rhizobium* en materiales promisorios de fríjol y soya.
2. Observar el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno a través del ciclo vegetativo de la planta en condiciones de campo y su incidencia en la producción.
3. Estudiar el mecanismo de fijación simbiótica del nitrógeno para conocer e introducir una nueva tecnología, aplicable en nuestro medio para el estudio de este proceso.

MATERIALES Y METODOS

Para los ensayos, realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT, se eligieron 2 variedades de fríjol (*P. vulgaris*) de semillas de color negro y de diferente tipo de crecimiento, una de mayor utilización en cultivos comerciales (Tipo II), y la otra preferida por el pequeño agricultor y los consumidores (Tipo IV). La variedad Porrillo sintético de crecimiento arbustivo indeterminado (Tipo II) florece a los 43 días y madura fisiológicamente alrededor de los 83 días. El ciclo vegetativo de la variedad Trepadora Trujillo -3 (Tipo IV) es de 100 d. Estas variedades se inocularon con la cepa CIAT-57 de *R. phaseoli* con la cual se han obtenido los mejores resultados en ensayos anteriores. La variedad de soya Pelican SM ICA, de un período vegetativo de 120 días, se inoculó con la cepa CIAT-4 de *R. japonicum*.

Las semillas inoculadas y peletizadas se sembraron a 0.0075 x 0.45 m. en una era prefabricada que contenía una mezcla de 4 partes de arena lavada por una parte de suelo, proporcionando al ensayo una condición artificial de deficiencia de N (0.5 o/o de M.O) que favorece la nodulación y consecuente fijación del elemento (Bezdicek, 2).

Se tomaron muestras al azar cada 10 días entre los 18 y 78 días después de la siembra y al momento de la maduración. En los primeros 7 muestreos se registraron los siguientes datos:

1. Reducción de acetileno. De acuerdo al procedimiento diseñado por Dart (3), utilizando el cromatógrafo de gases.
2. Número de nódulos.
3. Peso seco de nódulos. Los nódulos permanecieron 48 horas en una estufa de 55°C.
4. Índice de área foliar. Se determinó electrónicamente el área de una muestra de 40 hojas.
5. Número de vainas por planta.
6. Peso seco de vainas y de la parte aérea.
7. Porcentaje de N total de la parte aérea.

En el muestreo de maduración se tomaron los siguientes datos:

1. Número de vainas por planta y de granos por vaina
2. Peso seco de la semilla
3. Rendimiento por unidad de superficie
4. Porcentaje de N total en semillas y tejidos

RESULTADOS Y DISCUSION

El máximo número de nódulos se registró 48 días después de la siembra, que corresponde a la floración en frijol y el comienzo de ésta en soya. Sus valores más bajos ocurrieron hacia el final del ciclo vegetativo, lo cual se explica por que los nódulos entran en estado de senescencia que se manifiesta por la ausencia de leghemoglobina y por el color verde que adquieren (Tabla I).

El mayor peso seco de nódulos se registró hacia el final de la floración para las tres variedades, declinando hacia la época de maduración, como consecuencia de la razón anotada anteriormente (Fig. 1, Tabla I).

Aunque a lo largo de todo el periodo vegetativo el número de nódulos fué mucho mayor en las variedades de frijol que en la de soya. El peso seco de los nódulos de la soya fué siempre considerablemente superior; esto se debe al mayor volumen de tejido activo que les dá un mayor tamaño.

En soya la nodulación y la actividad de la nitrogenasa fueron lentas inicialmente, y como sólo contaba con las reservas cotiledonales, se presentó un estado de deficiencia de nitrógeno que se manifestó con amarillamiento de las hojas alrededor de los días 15 y 20 después de siembra, en tanto que en las variedades de frijol ésta deficiencia no fué notoria.

TABLA I

Número de nódulos, peso seco de nódulos, niveles de reducción de acetileno, peso seco de la parte aérea e índice de área foliar en plantas de dos variedades de frijol (*P. vulgaris*) y una de soya (*G. max*) inoculadas con *Rhizobium*

VARIABLES	VARIEDADES	EPOCA DE DESARROLLO (DIAS)						
		18	28	38	48	58	68	78
Número nódulos por planta	Trujillo-3	64,1	94,4	120,7	139,6	78,3	55,9	26,4
	Porrillo	39,5	50,9	67,0	156,0	113,8	54,3	32,2
	Pelican	7,7	13,7	48,3	80,4	43,4	56,0	48,3
Peso seco nódulos por planta (g)	Trujillo-3	0,0359	0,1097	0,1356	0,1440	0,0949	0,0645	0,0413
	Porrillo	0,0243	0,0829	0,1825	0,1861	0,2065	0,0896	0,0553
	Pelican	0,0138	0,0834	0,3677	0,5382	0,5431	0,4565	0,3512
Niveles reducción de acetileno (uMC ₂ H ₄ /planta/hora)	Trujillo-3	4,6524	7,0602	0,0890	1,5806	0,4988	1,3112	1,3990
	Porrillo	1,8865	3,2539	6,1161	8,5262	3,4409	2,3464	0,6380
	Pelican	0,9627	11,2426	19,1664	8,7978	14,1019	4,2548	4,1777
Peso seco parte aérea por planta (g)	Trujillo-3	0,4597	1,3999	3,5777	7,0222	9,9555	15,7777	13,7110
	Porrillo	0,3524	1,0888	2,9333	5,3999	8,8666	6,0888	3,3777
	Pelican	0,3353	1,0222	3,7110	6,8880	10,6444	11,4221	9,0888
Índice área foliar (IAF)	Trujillo-3	0,5750	1,1571	3,4576	5,4103	5,0443	7,3003	7,7860
	Porrillo	0,3364	0,6545	2,5096	2,3436	2,9780	2,9180	1,1343
	Pelican	0,1948	0,8140	2,4583	5,0690	5,6870	3,7736	3,1913

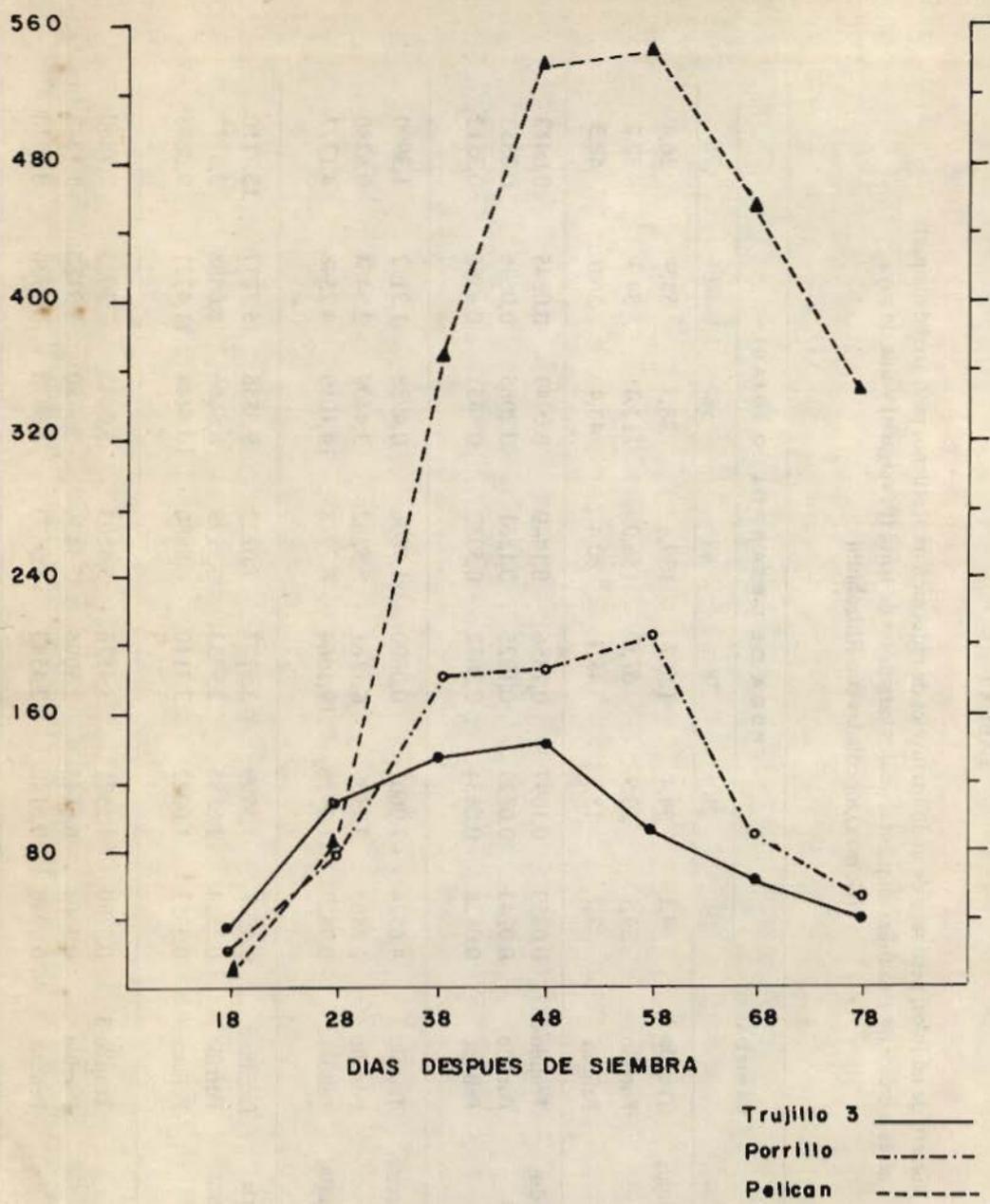


FIG. I.— Peso seco de nódulos por planta, durante diferentes épocas del período de crecimiento.

Este estado llamado "hambre de nitrógeno" por Dart et al (4), es consecuencia de el tipo de ensayo, en el cual las plantas dependen casi exclusivamente del nitrógeno fijado por la bacteria, dado que está en un suelo arenoso, pobre en este elemento. En soya el nivel máximo de fijación de nitrógeno se obtuvo antes de la floración y durante ésta, los niveles decrecieron para incrementarse al final de ella; de ahí en adelante la fijación declinó drásticamente sin lograr una posterior recuperación.

En la variedad Porrillo el nivel de fijación de nitrógeno fué en aumento hasta lograr el máximo en plena floración, mientras que en la variedad Trujillo-3 alcanzó su máximo nivel antes de ésta. Posteriormente la fijación disminuyó hacia el final del período del crecimiento (Fig. 2, Tabla I).

Los anteriores resultados, en cuanto a fluctuaciones de la curva se refiere, se ajustan a los reportados por Lawn y Brum (8) y Graham y Rosas (6) mientras que, en cuanto a valores obtenidos en el ensayo, se presentaron por debajo de los registrados por los mismos investigadores; esto se explica por qué en las épocas críticas del cultivo, tales como floración, formación y llenado de vainas, la temperatura del suelo alcanzó los 35°C considerado como límite máximo para la fijación de nitrógeno.

La disminución en la fijación de nitrógeno, está asociada con una declinación en la actividad específica de nódulos ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{peso seco de nódulos/planta/hora}$), la cual presenta los valores más altos para todas las variedades al comienzo del período vegetativo, decreciendo paulatinamente hacia el final de dicho período; los valores máximos de actividad específica de nódulos en soya son mayores que los obtenidos por Dart et al (4), mientras que en fríjol los valores coincidieron con los reportados por Graham y Rosas (6), (Fig. 3).

La reducción de acetileno con relación al peso seco de la parte aérea registró los máximos valores entre los 18 y 28 días después de la siembra declinando posteriormente. Los valores más altos de reducción de acetileno se registraron entre los 28 y 48 días para todas las variedades (Fig. 2), en tanto que el peso seco de la parte aérea es mayor entre los días 58 y 68 después de siembra (Tabla I), lo cual trae como consecuencia una relación inversa (Fig. 4).

Los valores obtenidos de Índice de Area Foliar (Tabla I) son semejantes a los obtenidos por Laing (7) para estas variedades de fríjol. Es frecuente encontrar en el campo, cultivos de soya con un índice de área foliar alrededor de 9, que aunque es alto no es el más adecuado, ya que en la misma planta se presenta una competencia por luz entre las hojas superiores y las bajas. En consecuencia, estos valores se pueden considerar adecuados para una conveniente actividad fotosintética.

Los rendimientos obtenidos bajo las condiciones en que se realizó este experimento (Tablas II y III), muestran que la inoculación con *Rhizobium* puede ser una alternativa para suplir las necesidades de nitrógeno en un suelo pobre en este elemento y que por el alto costo no se puede fertilizar. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que para obtener una asociación simbiótica satisfactoria, se requieren ciertas condiciones ecológicas que limitarían el uso de esta práctica.

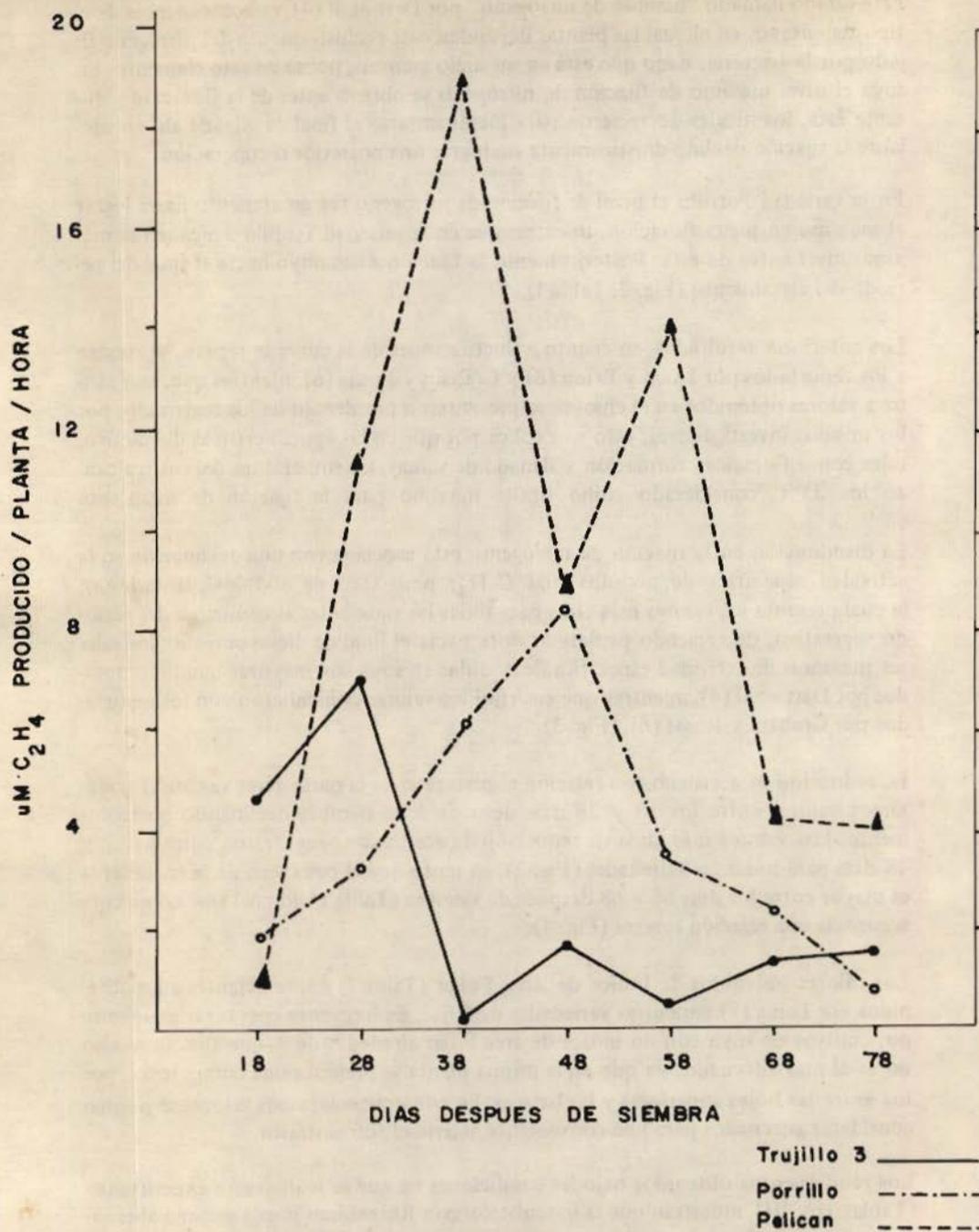


FIG. 2.— Niveles de reducción de acetileno en diferentes épocas del período de crecimiento.

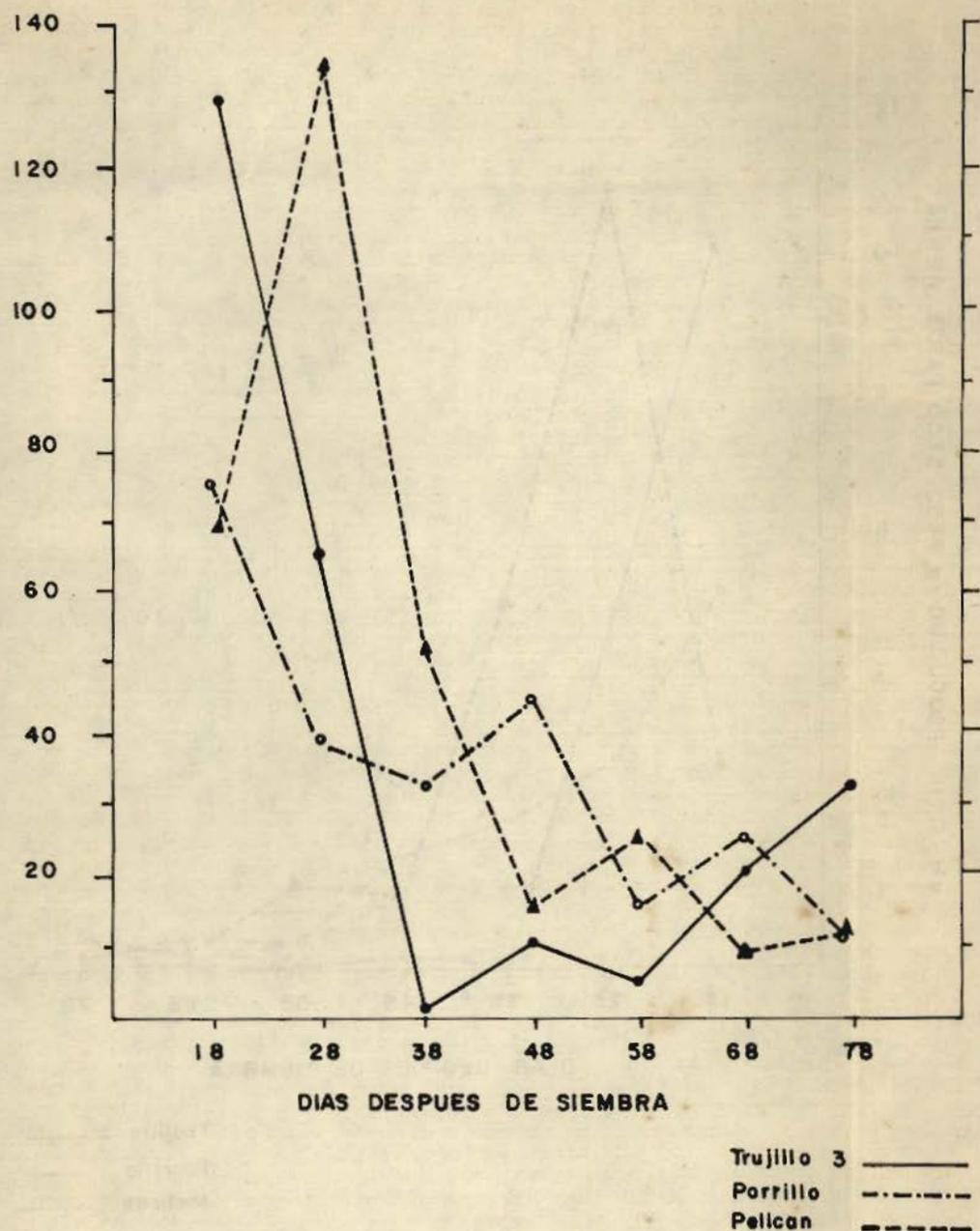


FIG. 3.— Cambios en actividad específica de nódulos ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4$ producidos / g. peso seco nódulos / hora), durante el período de crecimiento.

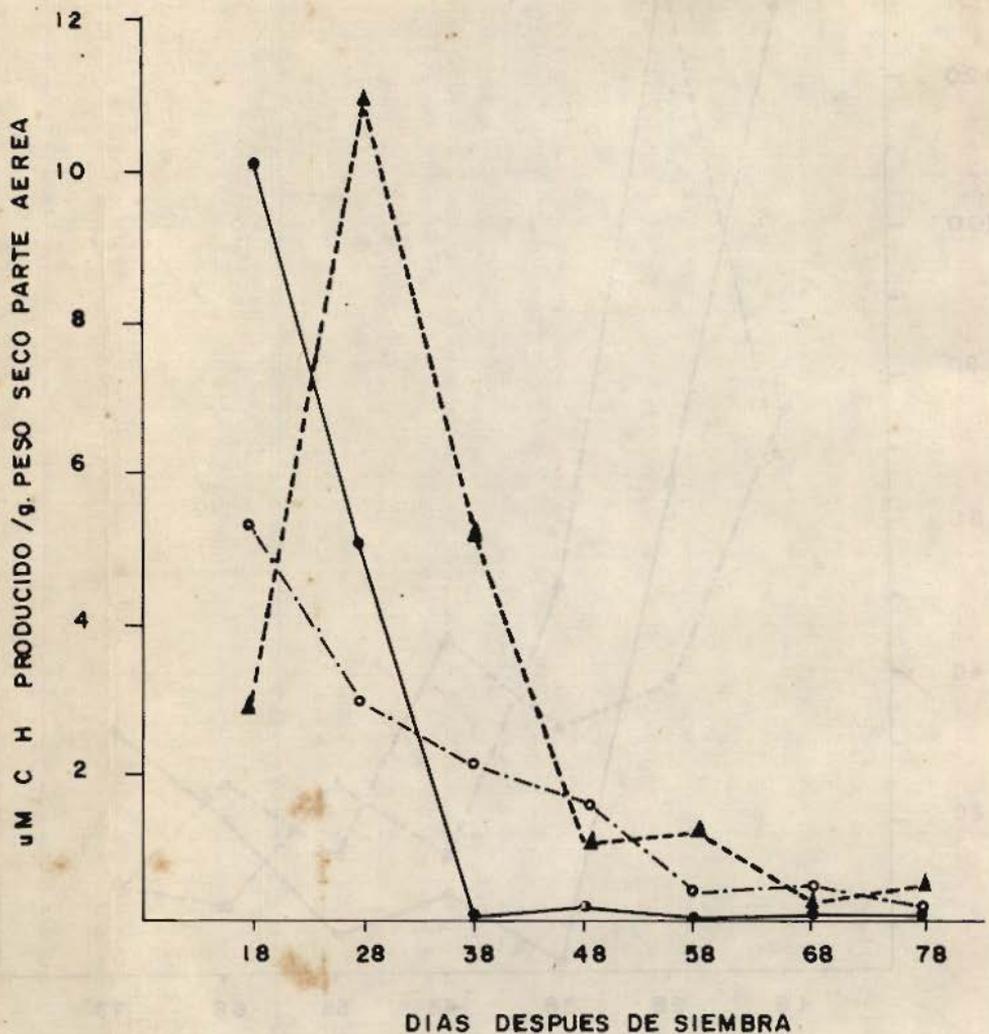


FIG. 4.— Reducción de acetileno por unidad de peso se de la parte aérea.

TABLA II

Número y peso seco de vainas en plantas de dos variedades de fríjol (*P. vulgaris*)
y una de soya (*G. max*) inoculadas con *Rhizobium*

VARIABLES	VARIETADES	EPOCA DE DESARROLLO (DIAS)			
		48	58	68	78
Número vainas por planta	Trujillo-3	1,688	6,844	21,000	17,155
	Porrillo	7,200	19,370	8,644	6,977
	Pelican	2,355	27,933	40,844	35,755
Peso seco vainas por planta (g)	Trujillo-3	0,3008	0,2888	4,0222	6,9555
	Porrillo	0,2075	6,1000	8,9777	8,8444
	Pelican	0,0123	0,9555	6,4000	8,3333

TABLA III

Parámetros de rendimiento en dos variedades de frijol (*P. vulgaris*)
y una de soya (*G. max*) inoculadas con *Rhizobium*

	VARIETADES		
	Trujillo-3	Porriño	Pelican
Vainas/Planta	16,288	9,377	53,399
Granas/Vaina	6,599	6,092	1,625
o/o N Semilla	3,850	3,400	6,980
o/o N Parte Aérea	1,230	1,310	1,300
Producción (Kg/Ha)	3.782	2.619	2.993

De acuerdo a los resultados, se puede observar que la fijación de nitrógeno declina considerablemente durante el período de formación y llenado de vainas, ya que este proceso compite por asimilados fotosintéticos con los nódulos, haciendo que la formación de tejido activo de éstos disminuya notoriamente. Por tal razón puede pensarse que la suplementación de nitrógeno a la planta disminuye también, motivo por el cual Ham y Hera citados por Dart et al (4) consideran que un suministro de nitrógeno en esta época puede aumentar ligeramente los rendimientos. En base a lo anterior, se puede experimentar con una fertilización foliar que contribuya a normalizar la suplementación de este elemento.

Como todavía existen aspectos de nodulación y fijación en frijol en el trópico que sólo se conocen superficialmente, es conveniente enfatizar en la necesidad de orientar la investigación hacia el estudio de los factores que contribuyen a elevar estos niveles de fijación, particularmente en las variedades de crecimiento indeterminado preferidas por el pequeño agricultor y por los consumidores.

CONCLUSIONES

1. El número de nódulos en frijol es mayor que en soya, pero en esta son de mayor tamaño y peso.
2. La fijación de N en soya comienza un poco más tarde que en frijol. En todas las variedades la fijación de N es mayor hacia el inicio de la floración y declina marcadamente al comenzar el llenado de vainas.
3. Las variedades de frijol de crecimiento indeterminado tienen mayor potencial de fijación de N debido a su mayor período de desarrollo.
4. La eficiencia de los nódulos, medida a través de su actividad específica, es mayor en las primeras semanas del cultivo.

BIBLIOGRAFIA

1. BERGERSEN, F.J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 1015-1025. 1970.
2. BEŽDICEK, D.F., MULFORD, R.F. and MAGEE, B., H. Influence of organic nitrogen on soil nitrogen, nodulation, nitrogen fixation and yield of soybeans. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 38: 268-273. 1974.
3. DART, F.J., DAY, J.M. and HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. *Inst. Atom. Energy. Publ.* 149: 85-100. 1972.
4. _____ et al. Symbiosis in tropical grain legumes; some effects of temperature and the composition of the rooting medium. Nitrogen fixation in the Biosphere. I. B. P. Synthesis Meeting. Edinburgh, 1973, 39p.
5. DILWORTH, M. J. The acetylene reduction method for measuring biological nitrogen fixation. *Rhizobium Newsletter.* 15(1): 7-15. 1970.
6. GRAHAM, P. H. and ROSAS, J. C. Response of varieties of *Phaseolus vulgaris* to Rhizobium inoculation. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1975. 19p. (sin publicar).
7. LAING, D. Desarrollo de la planta de frijol. Curso sobre producción de frijol. Julio 1975. 10p. (mimeografiado).
8. LAWN, R. J. and BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. *Crop Science.* 14: 11-16. 1974.
9. NUTMAN, P. S. The influence of physical environmental factors on the activity of Rhizobium in soil and in symbiosis. *Inst. Atom. Energy Agency. Publ.* 149: 55-84. 1972.