

NOTA TÉCNICA

INTERACCIÓN GENOTIPO DE FRIJOL COMUN - CEPA DE *Rhizobium*¹

Luis A. Gómez²; Germán Hernández²; Tamara Sánchez²; Vidalina Toscano²; Mercedes Sánchez²

RESUMEN

Interacción genotipo de frijol común - cepa de *Rhizobium*. Se evaluó la capacidad para fijar nitrógeno de la atmósfera de cinco genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes del banco de germoplasma del CIAT de Colombia; Río Tibaji; APN 18; Carioca; G 14665; G 19441. Se llevó a cabo un experimento en condiciones de solución nutritiva en cajas plásticas de 16 litros de capacidad con solución nutritiva intensamente aerada (400 ml de aire/litro solución/min) libre de N, en la primera caja se inoculó la cepa de *Rhizobium* CIAT 899 y en otra originaria de Costa Rica, la CR 477 ambas procedentes del CIAT, reservando la tercera para la CF1 de origen nacional. El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones. Las plantas se cortaron en la fase de desarrollo R7 para determinar Masa Seca de la Parte Aérea (MSPA); Masa Seca Radicular (MSR) y Masa Seca Nodular (MSN); así como el porcentaje de N en cada una de las partes. El genotipo Carioca y la cepa CF1 fueron estadísticamente superiores al resto ($P < 0,001$) en cuanto a formación de MSN; sin embargo los mayores fijadores de nitrógeno fueron el genotipo G 14665, mejor combinación entre producción de MSN y eficiencia en la fijación, y la cepa CIAT 899 fue 2,4 veces más eficiente (mg de N fijado/g de MSN) que el resto, lo cual muestra que la producción de MSN no es una variable concluyente cuando se seleccionan genotipos o cepas con alta capacidad para fijar nitrógeno de la atmósfera.

ABSTRACT

Common bean genotype interaction - *Rhizobium* strain. The capacity of five common bean genotypes from the germ plasm bank at CIAT, Colombia (Río Tibaji, APN 18, Carioca, G 14665, and G19441) to fix nitrogen from the atmosphere was evaluated. An experiment was carried out with plants grown in 16-liter capacity plastic boxes with a highly aerated and nitrogen-free nutrient solution (400 ml of air/solution liter/min). In the first box the CIAT 899 *Rhizobium* strain was inoculated, and in another box the CR 477 strain from Costa Rica, both from CIAT; a third box was reserved for CF1 of national origin. The experimental design consisted of random blocks with four repetitions. In order to determine the dry mass of the aerial part (DMAP), the radicular dry mass (RDM), and the nodular dry mass (NDM), the plants were cut in the R7 developmental phase. With respect to NDM, the carioca genotype and the CF1 strains were statistically superior to the rest ($P < 0,001$); however, the major nitrogen fixers were the G 14665 genotype - the best combination between NDM and fixation efficiency - and the CIAT 899 strain, which was 2.4 times more efficient (N mg/l NDM g) than the rest. This shows that the NDM production is not a determining variable when genotypes or strains with a high capacity for nitrogen fixation in the atmosphere are being selected.



INTRODUCCION

El nitrógeno es el principal factor nutricional que limita el crecimiento de plantas en los agroecosistemas mundiales (Graham, 1988), en el caso de las leguminosa parte del nutrimento puede ser obtenido por vía de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en simbiosis con

la bacteria *Rhizobium*, lo cual no sólo representa una ventaja económica sino también ecológica (Hardarson, 1993). El frijol común es una de las principales fuentes proteicas para los países de América del Sur, el Caribe, Asia y Africa (Castro; Uribe; Alvarado, 1993) pero es considerado un pobre fijador de nitrógeno de la atmósfera (Hardarson; Danson, 1993), aspecto a tener

¹ Presentado en la XLIII Reunión Anual del PCCMCA, Panamá, 1997.

² Estación Experimental "La Renée". Ap.6. La Habana, Cuba.

en cuenta entre otros que provocan los bajos rendimientos alcanzados en las diferentes áreas de siembra. Una de las soluciones a este importante problema es sin duda la búsqueda de genotipos con más alta capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Bliss, 1993), aunque por otro lado es necesario considerar también la interacción con las diferentes cepas de *Rhizobium*, las cuales pueden influir de manera significativa en la cantidad de nitrógeno fijado (Hardarson, 1993).

Para el estudio de la FBN en leguminosa, el método de dilución isotópica del ^{15}N es el más exacto; pero es una metodología muy cara lo que limita su uso en las evaluaciones frecuentes de materiales para la agricultura (Graceda - Cabrera; Peña Cabriales, 1995); en cambio el cultivo en solución nutritiva intensamente aereada ha sido considerado un excelente medio para cultivar frijol común (Drevon, 1994); pues incluso tiene funciones variadas y adecuada correspondencia con los métodos isotópicos (Vadez; Drevon; Beck, 1996). Por lo tanto, los principales objetivos de este trabajo fueron evaluar la capacidad simbiótica de cinco genotipos de frijol común cultivados en solución nutritiva, calcular el nitrógeno fijado por cada uno de estos y definir la influencia de la cepa en estos procesos.

de la germinación y sistema empleado aparecen descritos en Gómez *et al.*, (1996). En la primera caja se inoculó la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899 y en la segunda la cepa de *Rhizobium phaseoli* CR 477, del CIAT de Colombia, y en la tercera la CFI de origen nacional, la inoculación se realizó en el momento de trasplante de las pequeñas plantas y añadiendo 20 ml de cultivo bacteriano crecido en medio líquido (Vincent, 1970) con títulos superiores a 10^9 células/ml en cada una de las cajas, para permitir la interacción de las plantas y las células la solución no fue reemplazada hasta pasados los 15 días, el déficit de nitrógeno durante esta etapa se cubrió, añadiendo 1 mm de nitrógeno en forma de urea, el diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones. Las plantas se cortaron en la fase de desarrollo R7 para determinar Masa Seca de la Parte Aérea (MSPA); Masa Seca Radicular (MSR) y Masa Seca Nodular (MSN), así como el porcentaje de Nitrógeno de cada una de las partes empleando digestión húmeda de Kjeldahl. El nitrógeno fijado por cada genotipo fue calculado empleando la fórmula: $\text{N fijado} = \text{N Total en planta} - (\text{N semilla} + \text{N añadido } 28 \text{ mg})$ (Ribet; Drevon, 1995). Los datos obtenidos fueron evaluados por ANOVA y por la prueba de DUNCAN.

MATERIALES Y METODOS

Plántulas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con cinco días de edad germinada en arena estéril correspondientes a los genotipos: Río Tibaji; APN 18; Carioca; G 14665 y G 19441 fueron cultivadas en cajas plásticas de 16 L de capacidad en solución nutritiva intensamente aereada (400 ml de aire/l solución (min) libre de nitrógeno) (Drevon *et al.*, 1988). (Los detalles

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 1 muestra los valores de producción de MSPA de los cinco genotipos de frijol común estudiados independientemente de las cepas de *Rhizobium* con quien establecieron la simbiosis. El genotipo G 14665 produjo entre 1,92 y 2,73 veces más masa que los demás genotipos estudiados lo cual resultó ser una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$). En

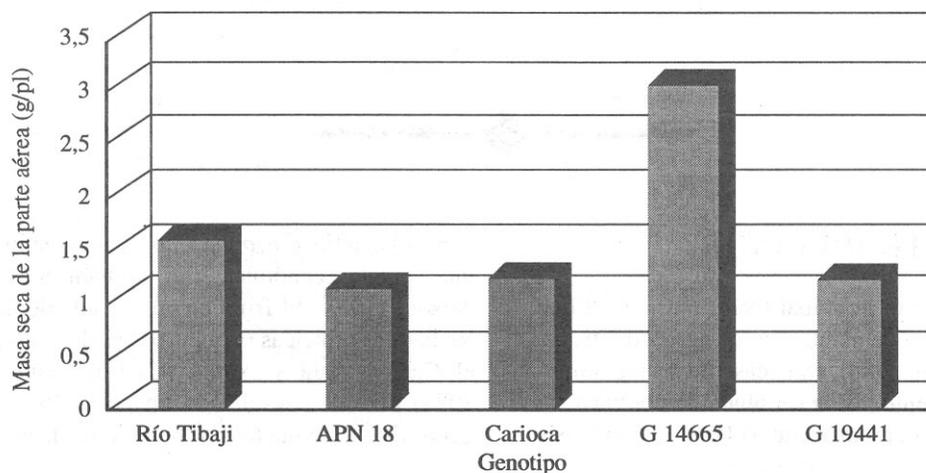


Figura 1. MSPA (g/pl) en cinco genotipos de frijol común crecidos en solución nutritiva e inoculada con *Rhizobium*.

cambio no se observó diferencia entre el resto de los genotipos, ni entre un mismo genotipo inoculado con las diferentes cepas.

La interacción entre genotipos y cepas de *Rhizobium* para formación de MSN (Cuadro 1), mostró que existieron al menos tres tipos de genotipos en relación a esta variable: 1) alta especificidad por una cepa determinada (APN 18 y G 14665); 2) baja o media especificidad con las tres cepas estudiadas (G 19441 y Río Tibaji) y 3) alta capacidad de formación de MSN con las tres cepas inoculadas (Carioca). El reconocimiento o interacción entre genotipo y su simbionte es un proceso complejo en el que intervienen numerosos factores genéticos y ambientales, durante el cual deben cumplirse todas las fases para que resulte una simbiosis exitosa (Trunchet, 1992), diferencias en la formación de MSN dentro del género *Phaseolus vulgaris* L. relacionadas a este fenómeno han sido reconocidos por otros autores (Pacovsky, Bayre; Bethlenfalvay., 1984; Beurnad; Michellon, 1986; Moxley; Hume; Smith, 1986; Abidoo *et al.*, 1990). El análisis de los datos de MSN arrojó también que el genotipo Carioca y la cepa CFI fueron estadísticamente superiores al resto ($P < 0,00$) al evaluar la respuesta media sin tener en cuenta con quien interactúan. Carioca ha sido indicada anteriormente (Henson, 1993) como un genotipo con alta capacidad para formar nodulación y la cepa CFI es la recomendada en Cuba para la inoculación de frijol común cuando se cultiva en suelo Ferralítico Rojo (Oxisol).

El cálculo del nitrógeno total fijado por cada uno de los cinco genotipos en simbiosis con tres cepas incluidas en el estudio (Figura 2) indica que el genotipo

Cuadro 1. Masa seca nodular (mg/pl) de cinco genotipos de frijol común crecidos en solución nutritiva e inoculada con tres cepas de *Rhizobium*.

Genotipos	CR 477	CF1	CIAT 899
Río Tibaji	70,2 bcd	52,8 cd	44,4 cd
APN 18	15,1 d	109,7 ab	20,2 d
Carioca	166,5 a	84,3 bc	134,6 ab
G 14665	57,0 cd	150,0 a	35,8 cd
G 19441	30,7 cd	30,0 d	16,9 d

Valor seguido de una misma letra no son diferentes a $P < 0,00$.

G 14665 es el mayor fijador de nitrógeno de la atmósfera. Existen grandes diferencias entre genotipos en relación a su habilidad para este carácter (Bliss, 1993), lo cual es mostrado en este trabajo donde G14665 fijó como promedio entre 2,22 - 1,58 veces más nitrógeno que el resto de los genotipos estudiados, APN 18 resultó ser el más pobre fijador lo que coincide con lo encontrado por Vadez; Drevon; Beck, 1996.

De las cepas inoculadas la CIAT 899 fue la mayor fijadora de nitrógeno (Figura 2), fenómeno más relacionado a la alta eficiencia mostrada en este proceso (Figura 3) que a la producción media de MSN provocada por su inoculación con valor de 50 mg/pl lo cual es significativamente más bajo ($P < 0,001$) si se compara con lo obtenido con la CFI (90 mg/pl). Las diferencias en la eficiencia en la FBN entre cepas de *Rhizobium* son

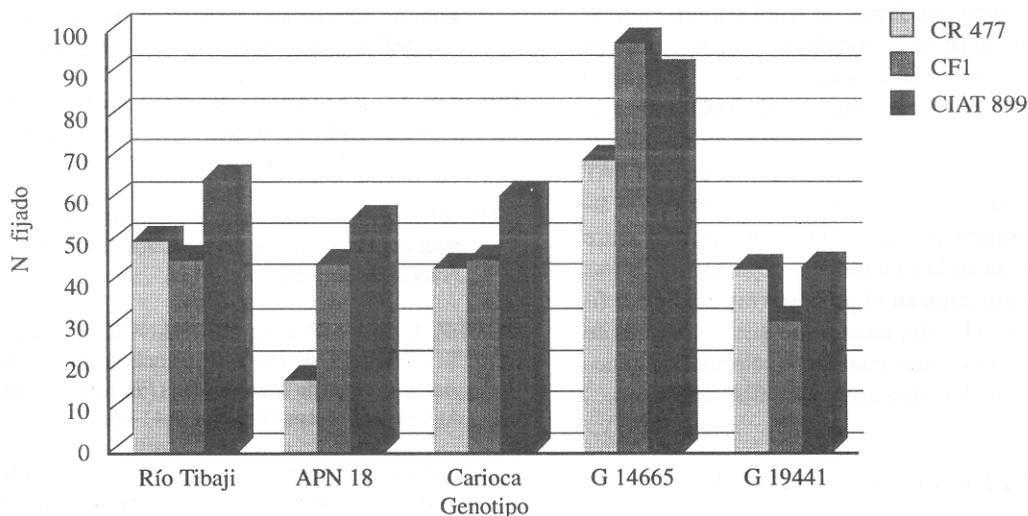


Figura 2. Nitrógeno fijado (mg/pl) en cinco genotipos de frijol común crecidos en solución nutritiva e inoculada con tres cepas de *Rhizobium*.

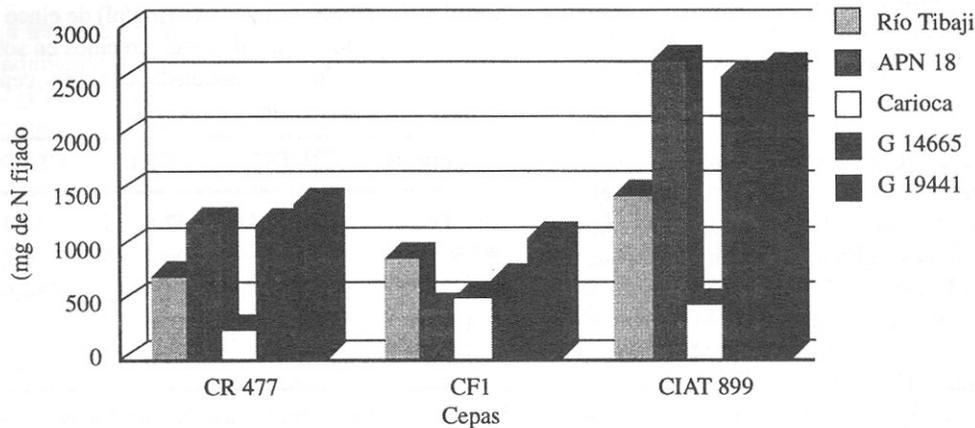


Figura 3. Eficiencia nodular de tres cepas de *Rhizobium* en simbiosis con cinco genotipos de frijol común.

consecuencia al menos de dos causas: a) estabilidad en el material genético involucrado en la fijación, el cual está sometido a frecuentes pérdidas por reordenamiento del mismo (Martínez *et al.*, 1988) y b) relación entre la capacidad para formar MSN, fijar nitrógeno y transferir este (Dobereigner, 1988). La cepa CIAT 899 es un caso típico de estabilidad en los genes NIF involucrados en la fijación (Martínez *et al.*, 1988) y aunque formó menos MSN que la demás cepa como se había planteado anteriormente, fijó y transformó más nitrógeno que las otras dos cepas estudiadas como lo muestra la relación nitrógeno (MSPA)/nitrógeno (MSN) donde se encontraron los siguientes valores promedios: CIAT 899 (18,56); CR 477 (15,51); CFI (6,38); esto indica que existen cepas que tienen una alta capacidad para formar MSN; pero dificultad para fijar nitrógeno o transferir el nitrógeno fijado (Dobereigner, 1988).

Entre los cinco genotipos de frijol común cultivados en solución nutritiva e inoculados con tres cepas de *Rhizobium* diferentes, el genotipo Carioca y la cepa CFI fueron los mayores productores de MSN independientemente de con quien establecieron la simbiosis; por el contrario el genotipo G 14665 y la cepa CIAT 899 fueron los mayores fijadores de nitrógeno de la atmósfera, el primero por aceptable combinación entre MSN y eficiencia en la fijación y la cepa por mostrarse 2,4 veces más eficiente en el proceso (mg nitrógeno fijado/g MSN) que el resto, mostrando que los valores de MSN no son concluyentes cuando se seleccionan genotipos y cepas con alta capacidad para fijar nitrógeno.

LITERATURA CITADA

ABIDOO, R. c.; GEORGE I; BOHLOOL B. B.; SINGLETON P. W. 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for

nodule occupancy by different rhizobial strain on field-grown soybean and common bean. Canadian Journal of Microbiology. 36: 92-96.

- BEURNARD, P.; MICHELLON, R. 1986. Effect de l' inoculation der haricot par deux souche de *Rhizobium phaseoli*. Agronomie Tropicale 41: 128-131.
- BLISS, EA. 1993. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. Plant and Soil 152:71-79.
- CASTRO, L.; URIBE L.; ALVARADO A, 1993. Efecto del enriquecimiento del inoculante de *Rhizobium* con dosis crecientes de P sobre el crecimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Agronomía Costarricense 17: 55-59.
- DOBEREIGNER, J. 1988. Biotechnology: Recent advances in biological nitrogen fixation. VI Japan-Brazil Symposium on Science and Technology. Editado por Academia de Ciencias de Estado de Sao Paulo (4): 145-160.
- DREVON, J.J.; KALIA U.P.; HECKMANN M.O.; PEDELAHORE P. 1988. *In situ* open - flow assay of acetylene and oxygen. Plant Physiology and Biochemistry 26:73-78.
- DREVON, J.J. 1994. Resumen de los resultados en frijol común del Programa de Cooperación Colombia - Cuba - Francia. Mimeografiado. 84 p.
- GÓMEZ, L.A.; VADEZ V.; HERNÁNDEZ G.; SÁNCHEZ T.; TOSCANO V. 1996. Eficiencia de uso al fósforo en diez genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Agronomía Mesoamericana 7:41-46

GRACEDA-CABRERA, O.A.; J.J. PEÑA-CABRIOLA. 1995. Use of different indicators for measuring fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field conditions in Nuclear Technique in Soil - Plant Study for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation

- (Proceeding of a Symposium, Vienna 17-21 October) pp 712-714. Printed IAEA in Austria. 735 p.
- GRAHAM, P. 1988. The contribution of biological nitrogen fixation to plant production. An overview of the symposium and its implications. *Plant and Soil* 108: 1-6.
- HAROARSON, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152: 1-17.
- HAROARSON, G.; OANSON S.K.A. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 152:19-23.
- HANSON, R.A. 1993. Measurements of N₂ fixation by common bean in central Brazil as affected by different reference crops. *Plant and Soil* 152:53-58.
- MARTINEZ, E.; FLORES M.; BROM S.; ROMERO D.; DAVILA G.; PALACIOS R 1988. *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. *Plant and Soil* 108: 179-184.
- MOXLEY, J.c.; HUME O.J.; SMITH O.L. 1986. N₂ fixation and competitiveness of *Rhizobium phaseoli* strains isolated from Ontario soils. *Canadian Journal of Plant Science* 66: 825-836.
- RIBET, J.; OREYON, J.J . 1995. Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiology Plantarum*. 94:1-7.
- PACOVSKY, RS.; BAYRE H.G.; G.I. BETHLENFALVAY. 1984. Symbiotic interactions between strain of *Rhizobium phaseoli* and cultivates of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Science* 24:101-105.
- TRUCHET, M. 1992. A Joint genetic and cytological, approach of the development biology of the *R. Meliloti* - *M. Sativa* symbiosis. 6to Curso Internacional sobre fijación del nitrógeno. INRA, Montpellier, Francia. Mi-meografía. Tomo 1.
- VAOEZ, V.; J.J. DREVON y O. BECK. 1996. Pattern of growth N accumulation and P use efficiency related 10 N nutrition and genotype variability in common bean (en prensa).