

Evaluación de cuatro cepas de *Rhizobium* en *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro en condiciones de campo.

Mario Núñez, Nery Santillana y Doris Zúñiga Dávila

Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso. Dpto. de Biología.
Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú.
dzuniga@lamolina.edu.pe

Resumen

En el experimento se evaluó el efecto de cuatro inoculantes elaborados con cepas de *Rhizobium* aplicados al cultivo de *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro. El ensayo se realizó en el campo en la localidad de Cajatambo ubicado en la sierra de Lima (Perú), a 3'310 msnm. El ensayo se condujo bajo un diseño en bloques completos al azar, con cinco tratamientos (cuatro cepas de *Rhizobium* y un control sin inocular) y tres repeticiones por tratamiento. Se analizaron las siguientes variables: altura de planta, longitud de vaina, número de granos por vaina, número de vainas por rama, rendimiento de grano verde, contenido de proteína en grano seco y reacción frente a enfermedades. Los tratamientos inoculados con las cepas de *Rhizobium* incrementaron la longitud de vainas, el número de vainas por rama, el rendimiento de vaina verde y dos cepas lo hicieron con el contenido de proteína, frente al control sin inocular, asimismo se observó menor incidencia de patógenos en los tratamientos inoculados.

Palabras clave: fijación biológica, nodulación, rendimiento de vaina verde.

Abstract

The behavior of four rhizobial inoculants in the culture of *Vicia faba* L. cv. Rojo Mantaro was evaluated. An experimental assay was performed in Lima, at Cajatambo, a valley located at 3'310 meters up sea level. The experiment was set in a Complete Randomized Blocks Design with three blocks and five treatments (four *Rhizobium* strains and a control). Analysis of variance and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$) were used on the following plant characters: plant height, pod length, number of grains per pod, number of pods per branch, green pod yield and plant response to diseases. The inoculated treatments with *Rhizobium* showed increases for pod length, number of pods per branch and green pod yield when compared with the control without inoculating. Moreover, less pathogen incidence in inoculated treatments was observed.

Keywords: biological fixation, green pod yield, nodulation.

Introducción

El haba (*Vicia faba* L.) es una especie dicotiledónea anual, que pertenece a la familia de las fabáceas (Papilionáceas). El haba es considerada en la dieta por su calidad nutritiva, ya que aporta cantidades importantes de carbohidratos y proteínas, además de ser rica en minerales (P y Fe) y vitaminas B₁. Su calidad protéica es superior a la del trigo, arroz, quinua y amaranto. En la alimentación humana se consume en forma fresca como legumbre o en grano como menestra. Para consumo industrial se procesa como producto enlatado y como congelado. (Camarena et al; 2003, Horque. 1995).

Como otras leguminosas, el haba tiene la capacidad de fijar el Nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. La cantidad de nitrógeno fijado por el haba varía entre 53 a 330 kg N ha⁻¹ dependiendo de la competitividad bacteriana, genotipo de la planta y tipo de suelo (Dilworth et al. 2001; Odee et al. 2002; O'Hara 2001; Rodríguez-Navarro et al. 2000; Segundo et al; 1999; Shah et al; 2000; Slattery et al. 1999 y 2001). En cuanto a la eficiencia de la fijación del Nitrógeno atmosférico se han observado diferencias entre las cepas de *Rhizobium* según lo reportado por Bernal et al. (2004), Freire (1992), Santillana et al. (1998), Urzúa et al; (2001) y Zúñiga (1997), entre otros. Así mismo, indicaron variabilidad entre genotipos de plantas y condiciones ambientales.

El empleo de *Rhizobium* en el cultivo de haba presenta dificultades debido a su promiscuidad, baja especificidad y nodulación con una amplia gama de cepas de *Rhizobium*. Asimismo, en localidades como Cajatambo, ubicada a 3'310 msnm en la sierra de Lima, se observa un deficiente manejo del cultivo de haba, además de presentar suelos pedregosos con bajo contenido de materia orgánica y otros factores que afectan sus rendimientos. Por ello, es necesario no sólo la introducción de semillas de mayor valor agronómico y comercial, sino también dar a conocer nuevas alternativas de manejo, como el empleo de inoculantes de *Rhizobium*, que al formar una simbiosis efectiva con la leguminosa, será capaz de fijar Nitrógeno y por ende mejorar la producción y calidad de semilla. Esto po-

dría reducir el uso de fertilizantes minerales nitrogenados, propiciando una agricultura sostenible. En el presente trabajo se dan a conocer los resultados de un ensayo que evaluó el efecto de inoculantes de cuatro cepas de *Rhizobium* sobre el cultivo de *Vicia faba* L. en una localidad altoandina.

Materiales y métodos

Ubicación

El experimento se realizó en el campo experimental del Instituto Superior Tecnológico Público Santa María Magdalena de la Provincia de Cajatambo, Departamento de Lima (Perú), ubicado a 3'310 msnm. El suelo es de textura franco limosa con alto porcentaje de cascajo (>50%) y pobre en nutrientes el cual estuvo en descanso por dos años luego de una siembra con cultivo de papa.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro, procedente de Huancayo (Perú).

Microorganismos

Se emplearon cuatro cepas de *Rhizobium*. Las cepas 1, 2 y 3 fueron aisladas de nódulos de *Vicia faba* L. de la zona de Huancavelica, ubicada a 3'500 msnm y la cepa 4 fue aislada de nódulos de *Pisum sativum macrocarpum* de la zona de Cañete-Lima, ubicada a 39 msnm. Estas cepas fueron seleccionadas por su efectividad en el cultivo de haba en ensayos de laboratorio e invernadero (datos de los autores, no publicados).

Preparación de los inoculantes

Cada una de las cepas de *Rhizobium* fue desarrollada en el medio LM (Levadura Manitol) líquido durante 3 días a 28 °C. Luego de este tiempo, el inóculo obtenido se mezcló con el soporte tierra/composta (2:3) previamente esterilizado, obteniéndose así los inoculantes que se usaron en el experimento (Ormeño y Zúñiga 1998, Ormeño y Zúñiga 1999a y 1999b).

Inoculación de semillas

La inoculación se realizó al momento de la siembra, siguiendo las recomendaciones del Laboratorio de Rhizobiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho (Mackie y García-Blásquez, 1988; Santillana, 2000).

Siembra y conducción del experimento

La siembra se hizo por matas, utilizando tres semillas por golpe. La distancia entre surcos fue de 80 cm y entre golpes de 40 cm. La siembra se realizó el 21 de noviembre de 2003.

El experimento fue conducido bajo riego antes del inicio del periodo de lluvia. Durante los meses de enero y parte de febrero se tuvo ausencia de lluvias y fuertes heladas. En las primeras etapas del cultivo se aplicó Mancozeb contra el ataque de hongos que producen la “mancha chocolate”. La cosecha se realizó el 17 de abril de 2004.

Parámetros evaluados

Se evaluaron altura de planta (m), longitud de vaina (cm), número de granos por vaina, número de vainas por rama, rendimiento de vaina verde (kg ha⁻¹ a la cosecha del cultivo), contenido de proteínas de grano seco (método micro Kjeldhal) y reacción frente a enfermedades (“mancha chocolate”) evaluada en la es-

cala arbitraria de 1 (menor incidencia) a 10 (mayor incidencia). Cada evaluación se realizó utilizando 10 plantas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento incluyó cinco tratamientos (cuatro cepas de *Rhizobium* y un control sin inocular) con tres repeticiones por tratamiento en un diseño de bloques completos al azar. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza para probar la hipótesis de igualdad de medias, la prueba de significancia de Duncan ($p < 0.05$) para realizar las comparaciones múltiples, coeficiente de correlación simple de Pearson ($p < 0.05$) y el análisis de componentes principales para analizar simultáneamente todas las variables evaluadas (McGarigal et al., 2000; Anderson, 2003).

Resultados y discusión

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de altura de planta, longitud de vaina, número de grano por vaina, número de vainas por rama, rendimiento de vaina verde y contenido de proteína de granos secos de plantas de *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro inoculadas con cuatro cepas de *Rhizobium* y la prueba de significación de Duncan ($p < 0.05$). La altura de planta no presentó diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo se observaron valores mayores en los tratamientos inoculados (1.510 a 1.556 m) que en el tratamiento control (1.490 m). En cuanto al número de

Cuadro 1. Valores promedio de las variables evaluadas en plantas de *Vicia faba* L. var. Rojo Mantaro inoculadas con cuatro cepas de *Rhizobium*, en condiciones campo.

Tratamientos	Altura de plantas (cm)	Longitud de vaina (cm)	Número de granos/vaina	Número de vainas/rama	Rendimiento vaina verde (kg ha ⁻¹)	Proteína grano seco (%)
Cepa 1	1526 a	12566 a	2.01 a	8,28 b	4306,3 a	22,38 e
Cepa 2	1400 a	12290 a	2.01 a	8,26 b	4107,7 a	23,26 b
Cepa 3	1556 a	11606 ab	2.00 a	9,21 ab	4306,0 a	23,30 a
Cepa 4	1510 a	11256 b	2.04 a	10,59 a	4048,3 a	22,75 d
Control	1540 a	10150 c	2.00 a	5,76 c	2721,7 b	23,12 c

- Letras distintas indican diferencias significativas para la prueba de Duncan ($p < 0.05$)

granos por vaina, este fue casi constante (entre 2 a 2.04) en todos los tratamientos, no existiendo diferencias estadísticas. Por el contrario, la longitud de vaina sí evidenció diferencias significativas entre los tratamientos. Los inoculados con las cepas 1 y 2 presentaron los mayores valores (12.56 y 12.29 cm respectivamente), superando significativamente al tratamiento inoculado con la cepa 4 (11.25 cm) y al control (10.15 cm).

En el número de vainas por rama se observó que todos los tratamientos inoculados con las diferentes cepas superaron significativamente al control. La cepa 4 presentó el mayor número de vainas por rama (10.59), resultado que fue similar al de la cepa 3 (9.21), los cuales a su vez superaron significativamente a los inoculados con las cepas 1 (8.28) y 2 (8.26). El tratamiento control presentó sólo 5.75 vainas por rama.

Por otro lado, el comportamiento del rendimiento de vaina verde fue similar a la variable anterior, es decir que los tratamientos inoculados fueron significativamente mejores que el control sin inocular, los rendimientos encontrados fueron entre 4048.3 a 4306.3 kg ha⁻¹, mientras que el tratamiento control sin inocular sólo presentó un rendimiento de 2721.7 kg ha⁻¹.

En cuanto al contenido de proteína, varió entre 22.38 a 23.38 %. Estos valores concuerdan con lo reportado por autores como Camarena et al; (2003) y Moreno (1983), quienes indican un contenido protéico de 20 a 25%. Los tratamientos inoculados con las cepas 2 y 3 superaron numéricamente al control sin inocular; mientras que los tratamientos 1 y 4 presentaron contenidos ligeramente menores de proteína (Cuadro 1).

Se demostró que los inóculos de las cepas evaluadas proporcionan mayor longitud de vaina, número de vainas por rama y rendimiento de vaina verde. Por el contrario, las variables altura de planta, número de granos por vaina y contenido de proteína en el grano seco, no fueron influenciadas por estos tratamientos.

El empleo de *Rhizobium* en la agricultura es una realidad en muchos países, sin embargo en Perú es aún limitado, debido principalmente al desconocimiento de las ventajas que ofrece esta tecnología, como dismi-

nución de la contaminación ambiental, conservación de la fertilidad del suelo y menores costos de producción (Hungria et al., 1994). Sin embargo, para que el Nitrógeno proveniente de la fijación biológica pueda suplir en gran medida los requerimientos de la planta, el proceso necesita ser eficiente, lo cual se conseguiría principalmente con más estudios de laboratorio y campo destinados a encontrar nuevas cepas de *Rhizobium*, más eficientes y competitivas, y genotipos de plantas que respondan mejor al microsimbionte (Dilworth et al., 2001; Odee et al., 2002; O'Hara, 2001; Rodríguez-Navarro et al., 2000; Segundo et al., 1999; Shah et al., 2000; Slattery et al., 1999, 2001).

En el presente trabajo se demostró la eficiencia de la interacción entre ambos simbiontes mediante los incrementos en longitud de vainas, número de vainas por rama y rendimiento de vaina verde.

Pero no se evidenció la presencia de *Rhizobium* nativos eficientes para el cultivo de haba evaluado, a pesar que esta característica es frecuente en diferentes suelos, así como su infectividad para determinados cultivares (Moawad, 1999; Rodríguez-Navarro et al., 2000). Sólo se encontraron correlaciones significativas entre el rendimiento en vaina verde y la longitud de vainas y el número de vainas por rama ($r = 0.863$ y 0.782 respectivamente) (Cuadro 2), que indican una relación directa entre esas variables.

Se ha encontrado evidencia que una simbiosis eficiente, además de participar en la fijación biológica del Nitrógeno, también protege a la planta del ataque de patógenos. Con relación a la reacción de las plantas frente al ataque del hongo de "la mancha chocolate", los tratamientos inoculados con las cepas de *Rhizobium* mostraron valores entre 6 a 7, mientras que en el control sin inocular fue de 8 a 9, es decir, mayor incidencia de infección fúngica.

El análisis de componentes principales mostró que el 87% de la variación de todos los tratamientos fue explicada por las variables: contenido de proteína y rendimiento de vaina verde (primer componente), altura de planta y longitud de vainas (segundo componente)

Cuadro 2 Correlación entre las diferentes variables evaluadas en plantas de *Vicia faba* L.: altura de planta (AP), longitud de vaina (LV), número de granos por vaina (NGV), número de vainas por rama (NVR), rendimiento de vaina verde (R).

	AP	LV	NGV	NVR	R
LV	-0.442				
NV	-0.178	0.070			
NVR	-0.064	0.427	0.723		
R	-0.200	0.863	0.278	0.782	
%P	-0.225	-0.343	-0.440	-0.210	-0.244

En la Figura 1 se presenta la distribución de los tratamientos de acuerdo a los componentes principales. Se verificó amplia variación entre los tratamientos, sin embargo, los efectos de los inóculos de las cepas 1 (aislada de *V. faba* L.) y 4 (aislada de *P. sativum macrocarpum*) se asemejan más, resultados que confirman la promiscuidad de dicho cultivo, ya que las plantas de haba han sido infectadas tanto por *Rhizobium* aislados de plantas de la misma especie como por *Rhizobium* aislados de plantas de *P. sativum macrocarpum*. Asimismo, se observó similitud de efecto de los inóculos de las cepas 2 y 3. El control sin inocular fue totalmente diferente al resto de tratamientos.

En este estudio se demostró que la inoculación mejoró el rendimiento en vaina verde del cultivo de haba, y disminuyó el grado de infección por hongos.

Agradecimientos

Al Programa de leguminosas de la UNALM, al proyecto de investigación de simbiosis-leguminosa del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso de la UNALM y al laboratorio de Rhizobiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Ayacucho-Perú), por proporcionar las cepas *Rhizobium* de *Vicia faba* L. A Ethel Palomino Z. por la revisión del inglés.

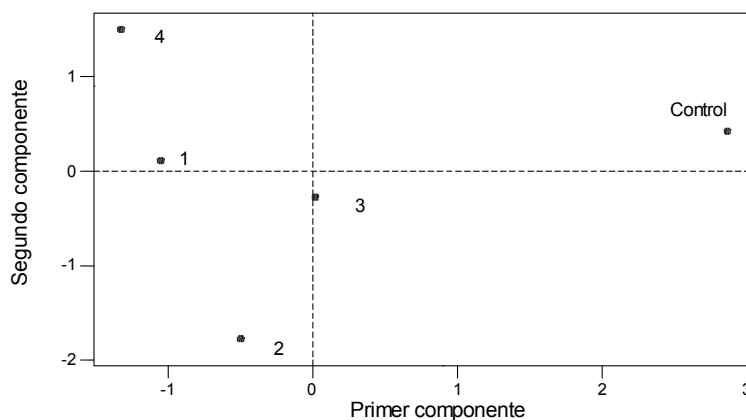


Figura 1: Agrupamiento de las cepas de *Rhizobium* considerando componentes principales

Literatura Citada

- Anderson, M. 2003. Principal Coordinate Anlysis. Department of Statistics, University of Auckland. New Zealand. 14p
- Bernal, G.R.; B. Tlustý; C. Estévez de Jensen; P. van Berkum y P.H. Graham. 2004. Characteristics of rhizobia nodulating beans in the central region of Minnesota. *Canadian Journal Microbiology*. 50: 1023-31.
- Camarena, F.M.; V.L. Chiape; J.A. Huaranga y N.E. Mostacero. 2003. Manual del cultivo de haba. Universidad Nacional Agraria La Molina - Cáritas Diocesana. Huancavelica. 29 pp.
- Dilworth, M.; J. Howieson; W. Reeve; R. Tiwari y A. Glenn. 2001. Acid tolerance in legume root nodule bacteria and selecting for it. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41: 435-446.
- Freire, J.R.J. 1992. Fixacao do nitrogenio per la simbiose rizóbio – leguminosa. En: E.J. Cardoso; M.T. Siu y M.C. Neves (eds.). *Microbiologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo. Campinas*. pp. 121-136.
- Horque, R. 1995. Cultivo de haba. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Serie Manual No. 2-95. Lima. 64 p.
- Hungria, M.; M. Vargas; A. Suhet y J.R Peres. 1994. Fixacao biologica do nitrogenio em soja. En: R. Araujo y M. Hungria (eds.). *Microorganismos de importancia agrícola*. EMBRAPA-SPI, Brasilia. pp. 9-90.
- Mackie, F. y C. García-Blasquez. 1988. Inoculantes RIZOMACK para Leguminosas. Boletín Informativo. Convenio COTESU-UNSCH. 40pp.
- McGarigal, K.; S. Cushman y S. Stanfford. 2000. *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. Springer. USA. 283pp.
- Moawad, H.; S.M.S. Bad El Din y M.A. Khalafallah. 1991. Assessment of faba bean (*Vicia faba*) response to inoculation with *Rhizobium leguminosarum* in clay loam Nile delta soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 191-195.
- Moreno, M.T. 1983. Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: J.I. Cubero y M.T. Moreno (eds.). *Leguminosas de grano*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 15-34.
- Odee, D.W.; K. Haukka; S.G. McInroy; J.L. Sprent; J.M. Sutherland y J.P.W. Young. 2002. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 801-811.
- O'Hara, G.W. 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 41: 417-433.
- Ormeño, E. y D. Zúñiga. 1998. Modification of YEM broth for medium scale production of legume inoculants. *Revista Peruana de Biología*. 5: 83-89.
- Ormeño-Orrillo, E. y D. Zúñiga-Dávila. 1999a. Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost para la producción de inoculantes para leguminosas. *Revista Peruana de Biología*. 6: 181-184.
- Ormeño-Orrillo, E. y D. Zúñiga-Dávila. 1999 b. Supervivencia y características simbióticas de *Bradyrhizobium* sp. inoculado en una mezcla de suelo y compost. *Biota*. 17: 41 - 49.
- Rodríguez-Navarro, D.N.; A.M. Buendía; M.M. Camacho; M.M. Lucas, y C. Santamaría. 2000. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 1601 – 1613.
- Santillana, N.; J.R.J. Freire; E.L.S. Sá y M. Sato. 1998. Avaliação de estirpes de rizóbio para a produção de inoculantes para trevo vermelho. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 22: 131 –137.

- Santillana, N. 2000. Producción de biofertilizantes. En: Memorias XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y Defensa del Medio Ambiente. J. Cornejo, J. Córdova, G. Cornejo, G. Zvietcovich. (eds.) pp 289-292.
- Segundo, E.; F. Martínez-Abarca; P. van Dillewijn; M. Fernández-López; A. Lagares; G. Martínez-Drets; K. Niehaus; A. Puhler y N. Toro. 1999. Characterization of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. FEMS Microbiology Ecology. 28: 169 – 176.
- Shah, N.H.; F.Y. Haffeez; M. Arshad y K.A. Malick. 2000. Response of lentil to *Rhizobium leguminosarum* *bv* *viciae* strains at different levels of nitrogen and phosphorus. Australian Journal of Agricultural Research. 40: 93-98.
- Slattery, J.F. y D.R. Coventry. 1999. Persistence of introduced strains of *Rhizobium leguminosarum* *bv* *trifolii* in acidic soils of North-East Victoria. Australian Journal of Agricultural Research. 39: 829-837.
- Slattery, J.F.; D.R. Coventry y W.J. Slattery. 2001. Rhizobial ecology as affected by the soil environment. Australian Journal of Experimental Agriculture. 41: 289-298.
- Urzúa, H.; J.M. Urzúa y R. Pizarro. 2001. Preselección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv* *viciae* en vicia forrajera para abonos verdes. Cien. Inv. Agr. 28: 3-6.
- Zúñiga, D. 1997. Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. 228pp.