

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL-UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

(Protección y Producción Vegetal)

**“INÓCULOS MULTICEPA SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EN
PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MANUEL FLORES ZÁRATE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA ANGÉLICA BAUTISTA
CRUZ

SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA. JUNIO DEL 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 14:00 horas del día 26 del mes de mayo del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:

Inóculos multicepa solubilizadores de fosfato en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Presentada por el alumno:

Flores
Apellido paterno
Nombre(s) Manuel

Zárate
Apellido materno

Con registro:

A	1	5	0	0	6	5
---	---	---	---	---	---	---

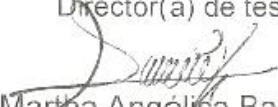
aspirante de:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis


Dra. Martha Angélica Bautista Cruz


Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez



Dr. Teodulfo Aquino Bolaños


Dra. Yolanda Domínguez Ortiz Hernández


Dr. Cirenio Escamirosa Tinoco

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 26 del mes de mayo del año 2017, el (la) que suscribe FLORES ZÁRATE MANUEL alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES, con número de registro A150065, adscrito(a) al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dra. Martha Angélica Bautista Cruz** y cede los derechos del trabajo titulado **Inóculos multicepa solubilizadores de fosfato en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones posgradoox@hotmail.com ó mf_z264@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


FLORES ZÁRATE MANUEL
Nombre y firma del alumno(a)



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme terminar una etapa más en mi vida.

A la Dra. Martha Angélica Bautista Cruz, mi directora de tesis, por su apoyo y guía en mi formación.

A mi comité de tesis, por el apoyo en la revisión y los consejos para mejorar el trabajo de investigación.

A la MC Verónica Martínez Gallegos, por el apoyo y capacitación sobre los procedimientos de laboratorio realizados.

Al MC Flavio Aragón Cuevas, titular del Programa de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valles Centrales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca brindada que me permitió culminar mis estudios.

Al Instituto Politécnico Nacional que, mediante los proyectos SIP 20150735 y 20160846, brindó el apoyo financiero para realizar este trabajo de investigación.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI), por el apoyo brindado.

A los laboratorios de Suelos y de Microbiología y Bioquímica de Suelos, por facilitar los equipos y material necesarios.

A los ingenieros Alfonso Flores Aguilar y Luis Flores Martínez por facilitar algunos de los materiales utilizados.

A mis compañeros, Nely Fernández, Betsy Antonio y Federico Velasco, por el apoyo durante la Maestría.

DEDICATORIA

A mi esposa, Oliva, por todo el apoyo, comprensión y amor que me has dado.

A mi hijo, Caleb, mi inspiración y motivo para seguir avanzando.

A mis padres, Manuel y Hortensia, por los consejos, apoyo, confianza, paciencia y cariño durante toda mi vida.

A mis hermanas, Rosalía, Laura y Judith, por toda la alegría que hemos vivido. Mis compañeras de travesuras.

A mis cuñados, Ricardo y Manuel, por cuidar de mis hermanas y sobrinos.

A mis sobrinos, Ángel, Kenya, Evelyn y Victoria, esperando los motive a llegar más lejos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1.1 Objetivo general.....	6
1.2 Objetivos específicos	6
1.3 Hipótesis.....	7
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 El frijol.....	8
2.2 Fósforo	8
2.2.1 Contenido de fósforo en el suelo	10
2.2.2 Factores determinantes en la disponibilidad de fósforo en el suelo	10
2.2.2.1 pH.....	10
2.2.2.2 Inmovilización	11
2.2.2.3 Los microorganismos del suelo y su eficiencia en la biodisponibilidad de fósforo	11
2.3 Bacterias solubilizadoras de fosfatos	12
2.4 Literatura citada	12
CAPITULO 3. EFECTO DE COINÓCULOS BACTERIANOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLANTAS DE FRIJOL	18
RESUMEN.....	18
3.1 INTRODUCCIÓN	19
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.2.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en la germinación de semillas de frijol.....	22
3.2.2 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.....	24
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.3.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en la germinación de semillas de frijol.....	26
3.3.2 Efecto del tiempo de imbibición en la germinación de semillas de frijol	28
3.3.3 Efecto de la interacción coinóculoxtiempo de imbibición	29
3.3.4 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol bajo condiciones semi-controladas.....	32
3.4 CONCLUSIONES	36
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	37

CAPITULO 4. COINÓCULOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO Y FERTILIZACIÓN MINERAL EN PLANTAS DE FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	42
RESUMEN.....	42
4.1 INTRODUCCIÓN	43
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.3.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.....	49
4.3.2 Efecto de la fertilización mineral en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol	52
4.3.3 Efecto de la interacción coinóculoxfertilización mineral en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.....	52
4.3.4 Correlación entre variables.....	55
4.3.5 Análisis de componentes principales	55
4.4 CONCLUSIONES	60
4.5 BIBLIOGRAFÍA.....	61
CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES	66
CAPITULO 6. ANEXOS	67

RESUMEN

Existen microorganismos que pueden hacer disponible el fósforo (P) del suelo y mejorar el aprovechamiento de fertilizantes fosforados. En el presente trabajo se evaluó el potencial de tres coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfatos con la finalidad de aumentar la cantidad de P disponible en el suelo, mejorar el vigor de plántulas y el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en comparación con fertilización mineral. Se utilizaron los coinóculos PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*), PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*), PSB3 (*P. luteola* + *Aeromonas hydrophila*). El efecto en la germinación *in vitro*, se determinó mediante un ensayo en laboratorio con los tres coinóculos y dos controles (SSE, solución salina estéril; ADE, agua destilada estéril), combinados con tres tiempos de imbibición de las semillas: 30, 60 y 120 min. El efecto de los coinóculos en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol, así como en la biodisponibilidad de P en el suelo, se determinó sembrando semillas en macetas con suelo sin esterilizar bajo condiciones semi-controladas, se aplicaron cuatro tratamientos (PSB1, PSB2, PSB3 y ADE). Además, se estableció un ensayo bajo condiciones semi-controladas en el que se utilizó una fertilización de fondo con la dosis N11-P30-K00, para comparar el efecto de los coinóculos con el de la fertilización mineral. Se evaluaron dos factores, los coinóculos (PSB1, PSB2, PSB3, *P. putida* y ADE) y la fertilización mineral (30P y 00P). Con respecto al control (SSE), las semillas imbibidas en el PSB3 durante 120 min presentaron la mayor longitud de radícula e índice de vigor. El peso de 100 semillas de las plantas bajo condiciones semi-controladas incrementó 3.5% y 4.6% con PSB2 y PSB3. Al comparar los coinóculos con la fertilización mineral, se encontró que la aplicación de fertilizantes minerales no tuvo un efecto significativo en las variables biométricas evaluadas. La aplicación de los diferentes coinóculos demostró tener efecto principalmente en la materia seca acumulada por las plantas y en el contenido de P foliar

y disponible en el suelo. Las plantas con el coinóculo PSB3 presentaron 21.1% más P foliar que el control (ADE) y, junto con la cepa control (*P. putida*) presentaron la mayor cantidad de P disponible en el suelo. PSB2 y PSB3 parecen favorecer la germinación y algunos parámetros biométricos del frijol. Sin embargo, se sugiere una evaluación mayor a un ciclo de cultivo para confirmar los efectos positivos de estos coinóculos.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., bacterias solubilizadoras de fosfato, germinación, fertilización fosfórica.

ABSTRACT

There are microorganisms that can make phosphorus (P) available in the soil and improve the use of phosphorus fertilizers. In the present work, the potential of three co-inocula of phosphate solubilizing bacteria was evaluated in order to increase the amount of available P in the soil, to improve seedling vigor and yield of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.), as well as compare them with fertilization mineral. The PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*), PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*) and PSB3 (*P. luteola* + *Aeromonas hydrophila*) were used. The effect on *in vitro* germination was determined by a laboratory test with three co-inocula and two controls (SSE, sterile saline; ADE, sterile distilled water), combined with three seed imbibition times: 30, 60 and 120 min. The effect of co-inocula on the growth and development of bean plants, as well as the bioavailability of P in the soil, was determined by sowing seeds in pots with unsterilized soil under semi-controlled conditions, in which four treatments were applied (PSB1, PSB2, PSB3 and ADE). In addition, a trial under semi-controlled conditions was established in which a background fertilization with the dose N11-P30-K00 was used to compare the effect of co-inocula with the one of the mineral fertilization. Two factors, the co-inocula (PSB1, PSB2, PSB3, *P. putida*, ADE) and fertilization mineral (30P and 00P) were assessed. It was found that, with respect to the control (SSE), the seeds imbibed in PSB3 during 120 min presented the highest radicle length and vigor index. The weight of 100 seeds of the plants under semi-controlled conditions increased 3.5% and 4.6% with PSB2 and PSB3, respectively, compared to the control (ADE). When comparing the co-inocula with fertilization, it was found that the application of mineral fertilizers did not have a significant effect on the biometric variables evaluated. The application of the different co-inocula showed to have effect mainly in the dry matter accumulated by the plants and in foliar P content and available in the soil. Plants with the PSB3 presented 21.1% more foliar

P than the control (ADE) and, along with the control strain (*P. putida*), presented the highest amount of available P in the soil. PSB2 and PSB3 seem to favor germination and some biometric parameters of the bean. A larger evaluation of a crop cycle is suggested to confirm the positive effects of these co-inocula.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., phosphate solubilizing bacteria, germination, phosphoric fertilization.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las células vegetales, forma parte de su estructura y participa en muchos procesos de crecimiento y desarrollo. Es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre (Cadahia, 2000); sin embargo, sólo una pequeña parte se encuentra en la solución del suelo (Cordero *et al.*, 2008) por consiguiente es frecuente encontrar algún grado de deficiencia de este nutrimento en las plantas (Bernal *et al.*, 2007). Diferentes investigaciones se han realizado para intentar mitigar esta problemática, optando por la utilización de fuentes modificadas de P (Sequera y Ramírez, 2013), la búsqueda de variedades con uso eficiente del P (Gómez *et al.*, 1996), determinar la concentración óptima de P para las plantas (Hernández *et al.*, 1996) o cuantificar el efecto de su deficiencia en la producción (Bernal *et al.*, 2007).

Por otro lado, diferentes estudios se han enfocado en la búsqueda de microorganismos, tanto bacterias como hongos, con la capacidad de volver disponibles las reservas de P en el suelo (Kucey, 1983; Fernández *et al.*, 2005) y mejorar su asimilación y el aprovechamiento de los fertilizantes aplicados a los cultivos, tanto industriales (Afzal *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2012) como básicos (Elkoca *et al.*, 2008; Rojas y Moreno-Sarmiento, 2008; Qureshi *et al.*, 2011; Rugheim y Abdelgani, 2012).

Dentro de los trabajos realizados en cultivos básicos de importancia económica se encuentra el de Kucey (1987) en frijol con la implementación de hongos solubilizadores de fosfato, así como el de El-Tarabily *et al.* (2008) que incluyó la inoculación de actinomicetos en este cultivo. Sin embargo, las bacterias han despertado mayor interés como solubilizadoras de P en el cultivo de frijol, enfocándose en los géneros *Burkholderia* (Peix *et al.*, 2001; Collavino *et al.*, 2010), *Pseudomonas* (Valverde *et al.*, 2007; Collavino

et al., 2010), *Rhizobium* (Abril *et al.*, 2007), *Sinorhizobium* (Ormeño *et al.*, 2007), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Exiguobacterium* (Collavino *et al.*, 2010).

Pese a lo anterior, la evaluación de inóculos bacterianos multicepa ha sido escasamente probada en frijol, pues los trabajos citados se enfocaron principalmente en evaluar cepas microbianas individuales.

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de tres coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato para aumentar la cantidad de P disponible en el suelo, el vigor de plántulas y el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en comparación con fertilización mineral bajo condiciones semi-controladas.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de tres coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato sobre la germinación de semillas en laboratorio y la asimilación de fósforo, desarrollo y calidad de semillas de plantas de frijol bajo condiciones semi-controladas.
- Comparar la respuesta de las plantas de frijol inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato con la producida mediante la aplicación de fertilización mineral.

1.3 Hipótesis.

La aplicación de coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en plantas de frijol mejora su crecimiento y desarrollo, así como la biodisponibilidad de fósforo en el suelo.

CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El frijol

El frijol común es uno de los cultivos más importantes en el mundo debido a que se produce y se consume en todos los continentes, lo que la vuelve la leguminosa más importante utilizada como alimento principalmente en Latinoamérica, Asia y África (Collavino *et al.*, 2010, Lépiz y Ramírez, 2010). Durante el 2013 fueron producidas más de 20 millones de toneladas a nivel mundial, siendo los principales países productores Myanmar, India, Brasil, México y Estados Unidos de América (FAO, 2017).

Esta especie es originaria de México, donde es el segundo cultivo más importante para consumo humano, sólo superado por el maíz, y del cual fueron establecidas durante el año 2016 una superficie de 1.63 millones de hectáreas (SIAP, 2017). Se estima que en México se consumen 11 kg del grano de esta leguminosa por persona al año, lo que la convierte en una de las principales fuentes de proteína al ser complementaria al consumo de maíz (Lépiz y Ramírez, 2010).

Como la mayoría de las leguminosas, el frijol es uno de los cultivos con alta dependencia a la disponibilidad de P en el suelo, a la vez de ser sensible a su deficiencia, lo que lo vuelve la principal limitante durante su cultivo (Hernández *et al.*, 1996).

2.2 Fósforo

El P es un macronutriente esencial para todos los seres vivos, se encuentra tanto en células de origen animal como vegetal, formando parte estructural de las mismas y

participando en muchos procesos de crecimiento y desarrollo (Bernal *et al.*, 2007). Es un elemento que, junto con el nitrógeno (N) y el potasio (K), es absorbido en grandes cantidades por las plantas, a la vez que no puede ser sustituido por ningún otro (Bonilla, 2013).

La deficiencia de P en el suelo es uno de los principales problemas en América Latina y África, donde 50% de los suelos presentan niveles bajos de P inorgánico, siendo frecuente que los cultivos presenten algún grado de deficiencia (Bernal *et al.*, 2007). El primer síntoma de la deficiencia de P en la planta es un crecimiento atrofiado, con la aparición de un color púrpura en las hojas y tallos a consecuencia de la acumulación de antocianinas, en un principio en las hojas basales, pues el P se trasloca de estas a las hojas jóvenes (Barceló *et al.*, 1987). Otros efectos son la disminución del crecimiento del sistema radicular y trastornos fisiológicos en la degradación eficiente de carbohidratos, traduciéndose en la acumulación de almidón, glucosa y fructosa en las hojas y raíces (Bernal *et al.*, 2007).

Los fertilizantes utilizados para corregir o prevenir la deficiencia de P son costosos (Ramírez, 1984; Sequera y Ramírez, 2013), pues, para su producción es necesaria la utilización de recursos no renovables, como el petróleo y minerales fosfatados, suponiendo esto un consumo de alrededor del 2% de los combustibles fósiles en el mundo, lo que incide directamente en el calentamiento global (Cadahia, 2000). Al mismo tiempo, existen zonas donde no existe o es difícil el acceso a este tipo de fertilizantes (Kucey, 1987), lo cual remarca la importancia de realizar un uso racional y óptimo de estos insumos.

2.2.1 Contenido de fósforo en el suelo

El P es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre (Cadahia, 2000), ya que es el noveno elemento dominante en ella y forma parte de más de 220 minerales estables, de los cuales el principal es la apatita (Pansu y Gautheyrou, 2006). De igual manera, este elemento se puede encontrar tanto en compuestos inorgánicos como orgánicos, ambos estables o insolubles, por lo que sólo una pequeña parte se encuentra en la solución del suelo (Schachtman *et al.*, 1998; Cordero *et al.*, 2008). Aunado a esto, una gran porción de los fertilizantes fosfatados agregados al suelo, para complementar la nutrición del cultivo, son inmovilizados y dejan de estar disponibles para las plantas (Navarro y Navarro, 2010).

2.2.2 Factores determinantes en la disponibilidad de fósforo en el suelo

La disponibilidad de P en el suelo está determinada principalmente por el pH, los procesos redox y los fenómenos bioquímicos, que a su vez son afectados por el clima (Pansu y Gautheyrou, 2006).

2.2.2.1 pH

El pH del suelo es determinado inicialmente por el tipo de material parental a partir del cual se originó el suelo y los procesos edafogénicos específicos de cada suelo más otros factores como el clima, la fertilización implementada, el tipo de cultivo establecido, el agua de riego y la actividad microbiana (Boul *et al.*, 1990; Ankerman y Large, 1998).

Las plantas sólo pueden absorber el P cuando se encuentra como ortofosfato (Pansu y Gautheyrou, 2006), el cual varía en su solubilidad de acuerdo a los valores de pH del suelo, siendo más asimilable el ortofosfato divalente (HPO_4^{2-}) (Navarro y Navarro, 2003). En suelos con pH entre 3.5 y 10 el ortofosfato se encuentra en las formas H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , de las cuales la primera predomina en el extremo ácido y la segunda en el alcalino, llegando al equilibrio a pH 7.2; la forma PO_4^{3-} se encuentra en pH superior a 11 y 12, mientras que H_3PO_4 en pH menor a 3.5 (Pansu y Gautheyrou, 2006).

2.2.2.2 Inmovilización

Las moléculas de ortofosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) son muy reactivas, por lo que forman complejos metálicos con el calcio (Ca^{2+}) en suelos calcáreos y con el hierro (Fe^{3+}) y aluminio (Al^{3+}) en suelos ácidos, lo que inmoviliza alrededor del 80% de los fertilizantes aplicados (Qureshi *et al.*, 2012). Estos fosfatos son insolubles, por lo que precipitan y forman una delgada capa sobre las arcillas, muy estable a pH ácido (Navarro y Navarro, 2003).

2.2.2.3 Los microorganismos del suelo y su eficiencia en la biodisponibilidad de fósforo

Diferentes estudios han demostrado la existencia de microorganismos capaces de volver disponibles las reservas de P en el suelo (Kucey, 1983; Fernández *et al.*, 2005), así como de mejorar el aprovechamiento de los fertilizantes aplicados a los cultivos (Kucey, 1987), entre ellos el frijol (Collavino *et al.*, 2010). De esta manera desempeñan una función importante en el metabolismo de las plantas y en su productividad (Rugheim y Abdelgani, 2012). La principal manera en que estos microorganismos logran la solubilización del P del suelo es a través de la secreción de varios tipos de ácidos orgánicos (Chen *et al.*,

2006; Giles *et al.*, 2014), aminoácidos (Güneş *et al.*, 2014) fitasas (Giles *et al.*, 2014) y fosfatasa (Rodríguez y Fraga, 1999).

2.3 Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfatos en el suelo, las bacterias pueden llegar a representar más del 90% de la diversidad de estos, desempeñando una función importante en el flujo de nutrientes en el suelo (Vazquez *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, bajo ciertas condiciones, presentan una mayor capacidad solubilizadora de fosfato en comparación con los hongos (Mwajita *et al.*, 2013).

Diferentes investigaciones han demostrado la existencia de especies solubilizadoras en los géneros *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia*, *Phyllobacterium* (Chen *et al.*, 2006), *Rhizobium* (Rugheim y Abdelgani, 2012), *Bradyrhizobium* (Afzal *et al.*, 2009), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Variovorax* (Collavino *et al.*, 2010).

2.4 Literatura citada

Abril, A., J. L. Zurdo-Piñero, A. Peix, R. Rivas, and E. Velázquez. 2007. Solubilization of phosphate by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolated from *Phaseolus vulgaris* in El Chaco Arido soil (Argentina). *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 135-138 pp.

- Afzal, A., A. Bano, and M. Fatima. 2009. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 487-495.
- Ankerman, D. y R. Large (eds.). 1998. *Manual de Agronomía*. Michel F., R., H. Chirinos U., y A.G. Lagos B. Laboratorios AL de México. Jalisco, México. 132 p.
- Barceló C., J., G. Nicolás R., B. Sabater G., y R. Sánchez T. 1987. *Fisiología Vegetal*. Cuarta Edición. Ediciones Pirámide. pp. 202-204.
- Bernal, L., P. Coello, J. Acosta y E. Martínez-Barajas. 2007. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia* 41:417-423.
- Bonilla, I. 2013. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. *In*. Azcón-Bieto, J., y M. Talón. (Coordinadores). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Segunda Edición. McGraw-Hill – Interamericana. Publicacions I Edicions. Madrid, España. pp. 103-121.
- Boul, S. W., F. D. Hole, R. j. McCracken. 1990. *Génesis y Clasificación de Suelos*. Segunda edición en español. Traducción de *Soil Genesis and Classification*. Editorila Trillas. México. pp. 44-45 y 85-87.
- Cadahia L., C. 2000. *Fertirrigación. Cultivos Hortícolas y Ornamentales*. Segunda edición. Ediciones Mundi-Persa. España. pp. 25-62.
- Chen Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W.-A. Lai, and C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Collavino, M.M., P.A. Sansberro, L.A. Mroginski, y O.M. Aguilar. 2010. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46:727-738.

- Cordero E., J., P. Ortega-Rodés, y E. Ortega. 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de forfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1): 111-121.
- Elkoca, E., F. Kantar, and F. Sahin. 2008. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition* 31: 157-171.
- El-Tarabily, K. A., A. H. Nassar, and K. Sivasithamparam. 2008. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolitica*. *Applied Soil Ecology* 39: 161-171.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. FAOSTAT. Web (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>). Consultada en abril del 2017.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M.A. Gómez, y M. A. Sagardoy. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región Sojera. *Ciencia del Suelo* 23(1):31-37.
- Giles, C. D., P.C. (L.) Hsu, A.E. Richardson, and M. R. H. Hurst. 2014. Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp. *Soil Biology & Biochemistry* 68:263-269.
- Gómez, L. A., V. Vadez, G. Hernández, T. Sánchez, V. Toscano. 1996. Eficiencia del uso del fósforo en diez genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 41-46.
- Güneş, A., M. Turan, M. Güllüce, and F. Şahin. 2014. Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *European Journal of Soil Biology* 60: 88-97.

- Hernández, G., V. Toscano, N. Méndez, L. Gómez, y M. Mullings. 1996. Efecto de la concentración de fósforo sobre la asimilación de tres genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana*. 7(1): 80-85.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science* 63: 671-678.
- Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 53(12): 2699-2703.
- López I., R., y R. Ramírez D. 2010. Parientes Silvestres del Frijol Común en el Occidente de México. Universidad de Guadalajara. SINAREFI. 64 p.
- Mwajita, M. R., H. Murage, A. Tani, and E. M. Kahangi. 2013. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. SpringerPlus. Web (<http://www.springerplus.com/content/2/1/606>).
- Navarro B., S., y G. Navarro G. 2003. Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida. Segunda edición. Ediciones Mundi Persa. España. pp. 219-250.
- Ormeño, E., R. Torres, J. Mayo, R. Rivas, A. Peix, E. Velázquez and D. Zúñiga. 2007. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 143-147 pp.
- Pansu, M., and J. Gautheyrou. 2006. Handbook of Soil Analysis. Mineralogical, Organic and Inorganic Methods. Springer. Netherlands. pp. 793-795.
- Peix, A., P. F. Mateos, C. Rodríguez-Barrueco, E. Martínez-Molina, and E. Velázquez. 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of

- Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1927-1935.
- Qureshi, M.A., A. Ahmad, N. Akhtar, A. Iqbal, F. Mujeeb, and A. Shakir. 2012. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 22 (1): 204-210.
- Qureshi, M.A., M. A. Shakir, A. Iqbal, N. Akhtar, and A. Khan. 2011. Co-inoculation of phosphae solubilizing bacteria and rhizobia for improving growth and yield of mungbean (*Vigna radiata* L.). *The Journal of Animal & Plant Sciences* 21(3): 491-497.
- Ramírez, G. 1984. Efecto de la fertilización con nitrógeno y fósforo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en un suelo de Upala. *Agronomía Costarricense* 8 (1):69-73.
- Rodríguez, H., y R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.
- Rojas S., J., y N. Moreno-Sarmiento. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 10 (2): 50-62.
- Rugheim, A. M. E., and M. E. Abdelgani. 2012. Effects of microbial and chemical fertilization on yeild and seed quality of faba bean (*Vicia faba*). *International Food Research Journal* 19 (2): 417-422.
- Schachtman, D. P., R. J. Reid, and S. M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.
- Sequera, O., y R. Ramírez. 2013. Roca fosfórica acidulada con ácido sulfúrico y tiosulfato de amonio como fuente de fósforo para frijol en dos tipos de suelo. *Bioagro* 25 (1): 39-46.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Cierre de la producción agrícola por estado. Página web (http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp). Consultada en mayo del 2017.
- Valverde, A., J.M. Igual and E. Cervantes. 2007. Polyphasic characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from rhizospheric soil of the north-eastern region of Portugal. *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 243-276 pp.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30: 460-468.

CAPITULO 3. EFECTO DE COINÓCULOS BACTERIANOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLANTAS DE FRIJOL

RESUMEN

Se evaluó el efecto de tres coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato (PSB) en la germinación *in vitro* y en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), así como en la biodisponibilidad de P en el suelo, bajo condiciones semi-controladas. El efecto en la germinación se determinó en laboratorio, donde se evaluaron tres coinóculos PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*), PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*), PSB3 (*P. luteola* + *Aeromonas hydrophila*) y dos controles: solución salina estéril (SSE) y agua destilada estéril (ADE), combinados con tres tiempos de imbibición de las semillas: 30, 60 y 120 min. El efecto de los PSB en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol, así como en la biodisponibilidad de P en el suelo, se determinó en plantas cultivadas en macetas con suelo sin esterilizar, en el que se aplicaron cuatro tratamientos (PSB1, PSB2, PSB3 y ADE). Se encontró que, con respecto al control (SSE), las semillas imbibidas en el PSB3 durante 120 min presentaron la mayor longitud de radícula e índice de vigor. El peso de 100 semillas de las plantas bajo condiciones semi-controladas incrementó 3.5% y 4.6 % con PSB2 y PSB3, respectivamente respecto al control. PSB2 y PSB3 favorecen la germinación y algunos parámetros biométricos del frijol, sin embargo, se sugiere la evaluación por más de un ciclo de cultivo para confirmar los efectos positivos de estos coinóculos.

Palabras clave: Bacterias solubilizadoras de fosfato; germinación; fósforo disponible; *Phaseolus vulgaris* L.

3.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de la diversidad de microorganismos edáficos, las bacterias forman parte del grupo más abundante, con una población que oscila alrededor de 5.5×10^5 UFC g^{-1} de suelo, la cual varía de acuerdo con el tipo, el manejo y el contenido de materia orgánica del suelo (Utria *et al.*, 2008). De la población bacteriana total, 0.5% posee la capacidad de solubilizar fosfatos (Kucey, 1983). Estos microorganismos pueden secretar al mismo tiempo diferentes reguladores de crecimiento y mostrar un efecto sinérgico al ser aplicados en conjunto con otros microorganismos (Afzal *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2011).

El P es un macronutriente esencial para las células vegetales, forma parte de su estructura y participa en muchos procesos de crecimiento y desarrollo. Es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre (Cadahia, 2000), sin embargo, sólo una pequeña parte se encuentra en la solución del suelo (Cordero *et al.*, 2008) por consiguiente es frecuente encontrar algún grado de deficiencia de este nutrimento en las plantas (Bernal *et al.*, 2007).

Para la producción de fertilizantes minerales fosfatados es necesaria la utilización de recursos no renovables, principalmente roca fosfórica (Mar y Okasaki, 2012), lo cual eleva su costo (Sequera y Ramírez, 2013). Al mismo tiempo, durante su fabricación se emiten gases con altos contenidos de ácido clorhídrico y fluorhídrico, además de metales pesados como Cd (Glasser, 2002). Aunado a lo anterior, el uso inadecuado de fertilizantes es una de las principales causas de la salinización del suelo, emisión de gases con efecto invernadero, eutrofización del agua (Savci, 2012) y la acumulación de metales pesados como Cd (Mar y Okasaki, 2012), As, Ni, Pb, Tl y U en los suelos agrícolas (Kratz *et al.*, 2016).

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es uno de los cultivos más importantes en México y el mundo al ser la principal leguminosa utilizada como alimento en Latinoamérica, Asia y África (Collavino *et al.*, 2010, Lépiz y Ramírez, 2010). En términos nutricionales, el frijol es una importante fuente de proteínas, minerales y vitaminas (Lépiz y Ramírez, 2010). Este cultivo presenta alta dependencia de la disponibilidad de P soluble en el suelo y es muy sensible a la deficiencia de P, lo que puede ser la principal limitante en su desarrollo y producción (Hernández *et al.*, 1996). Por esta razón, el uso de microorganismos que sean capaces de mejorar los procesos esenciales en la nutrición de este cultivo representa un componente vital en un sistema agrícola sustentable, en el cual se puedan reducir los costos de producción sin demeritar la calidad y rendimiento de los cultivos, propiciando el desarrollo del sector agrícola, tanto en la agricultura de supervivencia como en la comercial (Kaur y Reddy, 2014).

Diferentes estudios se han enfocado en la búsqueda de microorganismos, tanto bacterias como hongos, con la capacidad de volver disponibles las reservas de P en el suelo (Kucey, 1983; Fernández *et al.*, 2005), sin embargo, las bacterias han despertado mayor interés como solubilizadoras de fosfato en el cultivo de frijol, enfocándose principalmente en los géneros *Burkholderia* (Peix *et al.*, 2001), *Pseudomonas* (Valverde *et al.*, 2007), *Rhizobium* (Abril *et al.*, 2007), *Sinorhizobium* (Ormeño *et al.*, 2007), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter* y *Exiguobacterium* (Collavino *et al.*, 2010). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en la germinación *in vitro*; en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); y en la biodisponibilidad de P en el suelo bajo condiciones semi-controladas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato usados en este estudio se seleccionaron por su efecto positivo en el desarrollo y crecimiento de *Agave angustifolia* Haw. (datos no publicados). Las cepas bacterianas empleadas en la preparación de estos coinóculos se aislaron de suelos semiáridos cultivados con *A. angustifolia* en el distrito de Tlacolula, Oaxaca, México (Bautista-Cruz *et al.*, 2015).

Para la obtención del pre-coinóculo se tomó 1 mL de cultivo bacteriano de cada cepa solubilizadora de fosfato y se inoculó conjuntamente en caldo nutritivo. De cada pre-coinóculo se tomaron 5 mL y se inocularon en caldo nutritivo para posteriormente incubarse a 30°C y 150 opm durante 48 h en una incubadora-oscilatoria. Transcurrido el tiempo de incubación, el pre-coinóculo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. El pellet celular obtenido se diluyó a una concentración aproximada de 15×10^8 UFC mL⁻¹ de acuerdo con la escala de McFarland. Los coinóculos utilizados se describen en el (Cuadro 1).

Se utilizó la variedad mejorada de frijol “Negro INIFAP”, la cual fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de Especies Nativas de Oaxaca (BAGENO) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valles Centrales, Oaxaca, México. Antes de iniciar el trabajo experimental se eliminaron las semillas rotas o con daños por insectos o patógenos, después se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 min, para después lavarse repetidamente con agua destilada estéril.

Cuadro 1. Características de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato empleados en el experimento.

Coinóculo	Cepas bacterianas	pH final del cultivo <i>in vitro</i>	Acidez titulable (mL de NaOH 0.01 N consumido)	Fósforo solubilizado (mg·L ⁻¹)
PSB1	<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Burkholderia gladioli</i>	4.76	11.03	445.77
PSB2	<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas luteola</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i>	5.14	11.43	270.42
PSB3	<i>luteola</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i>	5.18	4.03	443.66

3.2.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en la germinación de semillas de frijol

Los coinóculos se diluyeron en solución salina estéril (SSE) 0.1454 M. Las semillas inoculadas por imbibición se colocaron dentro de una caja Petri estéril con algodón y papel filtro humedecidos con 5 mL de agua destilada estéril (ADE). Las cajas se sellaron con parafilm y se mantuvieron dentro de una cámara de germinación a una temperatura de 25 °C ± 5° (Ellis *et al.*, 1985). El hipocótilo y la radícula se midieron después de siete días.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con submuestreo y arreglo bifactorial, donde los factores fueron: (a) los tres coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato (PSB1, PSB2 y PSB3) más dos controles (ADE y SSE) y (b) el tiempo de

imbibición (30, 60 y 120 min), con un total de 15 tratamientos y seis repeticiones (Cuadro 2). La unidad experimental constó de cinco semillas.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Factor A	Factor B	
Coinóculo bacteriano solubilizador de fosfato	Tiempo de imbibición (min)	Tratamiento
	30	PSB1 30
PSB1	60	PSB1 60
	120	PSB1 120
	30	PSB2 30
PSB2	60	PSB2 60
	120	PSB2 120
	30	PSB3 30
PSB3	60	PSB3 60
	120	PSB3 120
	30	SSE 30
SSE	60	SSE 60
	120	SSE 120
	30	ADE 30
ADE	60	ADE 60
	120	ADE 120

PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); SSE, solución salina estéril; ADE, agua destilada estéril.

Se consideró germinada la semilla cuando la radícula emergió de la testa. Con la cantidad de semillas germinadas se calculó el porcentaje de germinación (PG) mediante la siguiente ecuación:

$$PG = \left(\frac{\text{No. de semillas germinadas}}{\text{No. total de semillas}} \right) * 100$$

Con la longitud promedio de radícula e hipocótilo se calculó el índice de vigor (IV) mediante la siguiente ecuación (Van Staden *et al.*, 2006):

$$IV = (\text{longitud de hipocótilo} + \text{longitud de radícula}) * PG$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, prueba de comparación de medias (Tukey0.05), correlación de Pearson y análisis de componentes principales utilizando el software SAS 9.2®. Previo al análisis de varianza se determinó la homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos a través de las pruebas de Hartley y Shapiro-Wilk, respectivamente.

3.2.2 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol

Este experimento se realizó bajo condiciones semi-controladas dentro de un macro túnel, como macetas se utilizaron vasos de poliestireno expandido con capacidad de 1 kg, los cuáles se llenaron con suelo sin esterilizar previamente tamizado con una malla de 2 mm de abertura. Algunas propiedades químicas y físicas de este suelo se enlistan en el Cuadro 3.

Cuadro 3 Características físicas y químicas del suelo utilizado en el experimento.

Característica	Valor	Valor de referencia*
pH	7.65	7.4 – 8.5 medianamente alcalino
Densidad aparente**	1.21 g·cm ⁻³	1.20 - 1.32 g·cm ⁻³ suelos francosos
Materia orgánica	2.38%	1.6 - 3.5 contenido medio
Fosforo extraíble	2.6 mg kg ⁻¹ de suelo	< 5.5 mg kg ⁻¹ baja disponibilidad
Nitrógeno total	0.612%	> 0.25% contenido muy alto
Textura (arena, limo y arcilla)	48.6%-25.12%-26.28%	Franco Arcilloso Arenoso

*Fuente: Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

**Método de la probeta.

Se sembraron cuatro semillas de frijol por maceta a una profundidad de 2 cm y se regaron hasta el punto de saturación utilizando agua corriente. Cuando las plántulas alcanzaron la etapa V3 (despliegue de la primera hoja trifoliada) (Fernández *et al.*, 1986) se realizó el raleo a una plántula por maceta y se agregaron 5 mL de cada coinóculo. Después de la inoculación se aplicaron semanalmente 25 mL de solución nutritiva Hoagland, con el P disminuido a la décima parte, hasta la madurez fisiológica de las plantas. Se realizaron riegos periódicos de acuerdo con las necesidades del cultivo.

Las variables medidas fueron floración media, madurez fisiológica, vainas por planta, P foliar por el método vanadato-molibdato amarillo (Cottenie, 1980), semillas producidas, rendimiento, peso de cien semillas y contenido de proteína utilizando el método Micro

Kjeldahl. Así mismo, se determinaron en el suelo, al inicio y al final del experimento, el pH y el contenido de P disponible (Olsen).

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con cuatro tratamientos (PSB1, PSB2, PSB3, control sin inocular) y cinco repeticiones. Las unidades experimentales constaron de cinco macetas. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, prueba de comparación de medias (Tukey0.05), correlación de Pearson y análisis de componentes principales utilizando el software SAS 9.2®. Previo al análisis de varianza se determinó la homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos a través de las pruebas de Hartley y Shapiro-Wilk, respectivamente.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en la germinación de semillas de frijol

La longitud de radícula e índice de vigor fueron significativamente diferentes entre los tratamientos evaluados. La longitud de radícula de las semillas tratadas con los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato fue similar a la de las tratadas con ADE, pero fue mayor que en las semillas imbibidas en SSE (Cuadro 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bayuelo-Jiménez *et al.* (2002) quienes reportaron que al aumentar la salinidad del medio la materia seca acumulada disminuyó en plántulas de cinco especies del género *Phaseolus*, principalmente en las plántulas de *P. vulgaris* desarrolladas en NaCl 0.06 M, las cuáles presentaron 17.7% menos materia seca que el control.

Cuadro 4. Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamiento	Longitud de radícula (cm)	Longitud de hipocótilo (cm)	Índice de vigor	Germinación (%)
PSB2	10.70 ± 1.21 a	3.68 ± 0.9 a	1396.15 ± 218a	96.92 ± 7.51 a
PSB3	10.45 ± 2.95 a	3.45 ± 1.20 a	1364.40 ± 382a	98.67 ± 5.16 a
PSB1	9.53 ± 1.17 a	3.51 ± 0.65 a	1262.31 ± 159ab	96.92 ± 7.51 a
SSE	6.90 ± 2.76 b	4.22 ± 1.25 a	1057.82 ± 300b	94.54 ± 9.34 a
ADE	10.63 ± 1.6 a	4.11 ± 0.56 a	1437.87 ± 214a	97.33 ± 7.04 a

Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey $_{0.05}$). PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); SSE, solución salina estéril; ADE, agua destilada estéril.

Las semillas imbibidas en el PSB2 y en el PSB3, así como las imbibidas en ADE, desarrollaron plántulas con mayor vigor que las imbibidas en SSE. Esto podría deberse a que la cantidad de agua absorbida fue mayor con menor toxicidad por Na en las semillas tratadas con los coinóculos y con ADE que en aquellas tratadas con SSE. Kaymakanova (2009) mostró que la cantidad de agua absorbida por semillas de *P. vulgaris* durante su germinación en condiciones salinas disminuyó hasta en un 32% en comparación con las tratadas con agua desionizada. Younesi y Moradi (2014) encontraron que las plántulas de *P. vulgaris* inoculadas con *P. fluorescens* o *Glomus mosseae* presentaron 38.3% menos Na asimilado y 21.5% más de agua en la plántula que aquellas sin inocular.

El mayor índice de vigor de las plántulas de frijol provenientes de semillas tratadas con los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato con relación a las imbibidas en SSE podría sugerir un efecto protector de estos coinóculos ante la salinidad. Al respecto, Patel *et al.* (2015) indicaron que la inoculación de semillas de *Vigna radiata* L. con cepas de *Bacillus* aisladas de suelos salinos, redujo el estrés provocado por la salinidad al obtener plántulas con un peso seco 11.7% mayor que el obtenido en plántulas provenientes de semillas sin inocular. Younesi y Moradi (2014) evaluaron el efecto de la inoculación con *P. fluorescens* y *Glomus mosseae* en plantas de frijol sometidas a estrés salino y encontraron que, independientemente del tratamiento biológico o el nivel de salinidad, las plantas disminuyeron su crecimiento hasta en un 48.8% en comparación con los tratamientos sin NaCl. Dodd y Pérez-Alfocea (2012) explicaron que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal exudan compuestos específicos que mejoran la asimilación de nutrientes y agua, a la par de disminuir la absorción de elementos tóxicos como el Na.

3.3.2 Efecto del tiempo de imbibición en la germinación de semillas de frijol

Las semillas de frijol imbibidas durante 60 min mostraron un índice de vigor más alto en comparación con las imbibidas por 30 min (Cuadro 5), lo que se traduce en plántulas de mayor tamaño. Es posible que las semillas imbibidas durante un mayor tiempo tengan un mayor periodo para iniciar su metabolismo pre-germinativo y, con ello aumentar su vigor en comparación con aquellas con un menor tiempo de imbibición (Rajjou *et al.*, 2012). Sánchez *et al.* (2005) encontraron que a mayor tiempo de imbibición de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham en agua destilada durante tratamientos pre-germinativos, la cantidad de materia seca acumulada por las plántulas aumentó 24.2%.

Cuadro 5. Variables evaluadas en la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con diferentes tiempos de imbibición utilizando coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato.

Tiempo de imbibición (min)	Longitud de raíz (cm)	Longitud de hipocótilo (cm)	Índice de Vigor	Germinación (%)
120	9.88 ± 2.94 a	4.21 ± 0.87 a	1328.48 ± 343 ab	94.29 ± 9.26 a
60	10.21 ± 2.24 a	3.99 ± 0.87 a	1398.70 ± 220 a	98.26 ± 5.7 6a
30	9.25 ± 2.07 a	3.18 ± 0.87 b	1224.43 ± 286 b	98.26 ± 5.76 a

Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey $_{0.05}$).

3.3.3 Efecto de la interacción coinóculoxtiempo de imbibición

La interacción coinóculoxtiempo de imbibición reveló que las semillas imbibidas durante más tiempo en los coinóculos y ADE, desarrollaron plántulas más vigorosas, mientras que en el control (SSE) se observó el efecto opuesto. El tratamiento PSB3 con imbibición durante 120 min presentó la mayor longitud de radícula e índice de vigor con respecto al control (SSE) con 60 y 120 min de imbibición (Cuadro 6).

Se registró una correlación directa altamente significativa ($r=0.92$, $p<0.01$) entre el índice de vigor y el tamaño de la raíz e hipocótilo de las plántulas, lo que podría indicar que, con las condiciones de este experimento, la longitud de radícula tuvo mayor peso en el vigor de las plántulas.

Cuadro 6. Efecto de la interacción coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato×tiempo de imbibición sobre la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamiento	Longitud de raíz (cm)	Longitud de hipocótilo (cm)	Índice de vigor	Germinación (%)
PSB1 30	9.22 ± 0.64 bcd	3.112 ± 0.59 bc	1232.80 ± 77.82 abc	100.0 ± 0.00 a
PSB1 60	9.32 ± 1.63 bc	3.622 ± 0.59 bc	1242.80 ± 216.27 abc	96.0 ± 8.94 a
PSB1 120	10.4 ± 0.77 ab	3.988 ± 0.56 ab	1344.00 ± 183.07 abc	93.3 ± 11.55 a
PSB2 30	9.94 ± 0.90 abc	3.048 ± 0.28 bc	1252.00 ± 195.22 abc	96.0 ± 8.94 a
PSB2 60	10.75 ± 0.88 ab	3.728 ± 0.99 bc	1448.00 ± 116.49 ab	100.0 ± 0.00 a
PSB2 120	11.86 ± 1.47 ab	4.662 ± 0.51 ab	1550.00 ± 297.21 ab	93.3 ± 11.55 a
PSB3 30	6.9 ± 1.71 cde	2.22 ± 0.64 c	912.40 ± 229.72 c	100.0 ± 0.00 a
PSB3 60	11.56 ± 0.95 ab	3.664 ± 0.35 bc	1522.00 ± 87.86 ab	100.0 ± 0.00 a
PSB3 120	12.9 ± 1.38 a	4.466 ± 1.13 ab	1658.80 ± 232.74 a	96.0 ± 8.94 a
ADE 30	10.39 ± 1.66 ab	4.232 ± 0.73 ab	1462.00 ± 190.55 ab	100.0 ± 0.00 a
ADE 60	11.84 ± 1.28 ab	3.972 ± 0.35 ab	1581.60 ± 107.24 a	100.0 ± 0.00 a
ADE 120	9.65 ± 1.19 abc	4.121 ± 0.64 ab	1270.00 ± 225.86 abc	92.0 ± 10.95 a
SSE 30	10.14 ± 3.74 abc	3.358 ± 0.56 bc	1288.67 ± 490.72 abc	93.3 ± 11.55 a
SSE 60	5.8 ± 0.41 de	5.613 ± 0.62 a	1066.00 ± 139.10 bc	93.3 ± 11.55 a
SSE 120	5.61 ± 1.06 e	3.893 ± 1.17 abc	914.40 ± 171.62 c	96.0 ± 8.94 a

Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey $_{0.05}$). PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); ADE, agua destilada estéril; SSE, solución salina estéril.

Los dos primeros componentes principales explicaron 87.27% de la variación total (Cuadro 7). En el primer componente principal las variables más significativas fueron la

longitud de la radícula y el índice de vigor, lo que indica que los tratamientos ubicados en el extremo positivo del eje “X” presentaron plántulas con radículas más largas y de mayor vigor (Figura 1). En el segundo componente principal las variables más sobresalientes fueron el porcentaje de germinación y la longitud de hipocótilo, sin embargo, el vector propio de la longitud de hipocótilo fue negativo, lo cual sugiere que los tratamientos ubicados en extremo positivo del eje “Y” presentaron mayores porcentajes de germinación, pero hipocótilos cortos.

Cuadro 7. Resultados del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en la germinación de semillas de frijol.

Componente principal	1	2	3
Autovalor	2.026	1.465	0.508
Proporción	0.507	0.366	0.127
Proporción acumulada	0.507	0.873	1.0
Vectores propios			
Germinación	0.0668	0.7177	0.6821
Longitud de radícula	0.6741	0.1328	-0.3232
Longitud de hipocótilo	0.2202	-0.6833	0.6547
Índice de vigor	0.7019	0.0186	0.0401

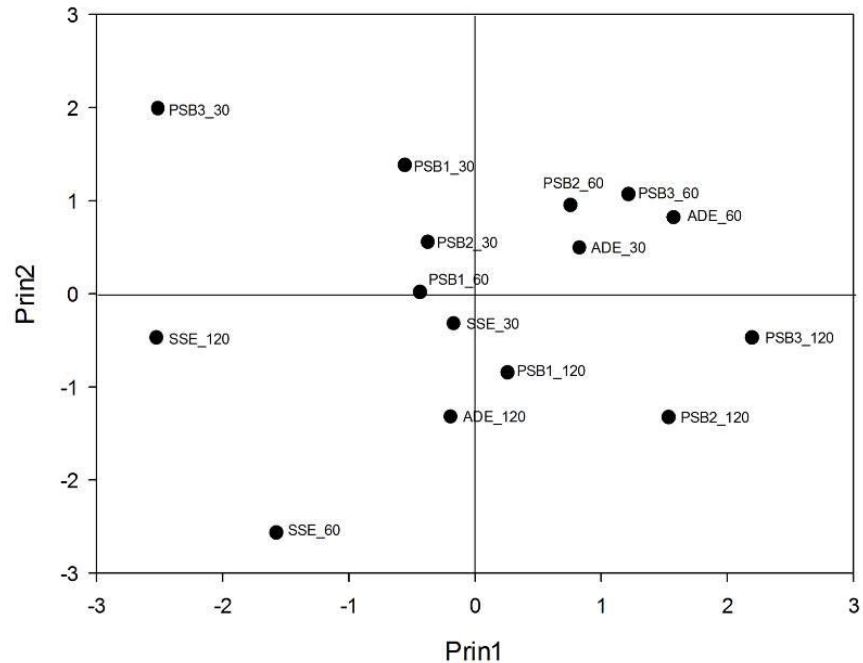


Figura 1. Distribución gráfica de los tratamientos de acuerdo con los primeros dos componentes principales. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); ADE, Agua destilada estéril; SSE, Solución salina estéril.

3.3.4 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol bajo condiciones semi-controladas

La cantidad de vainas por planta, las semillas producidas por planta, el peso de 100 semillas, el pH del suelo, la cantidad de P disponible y de P foliar fueron significativamente diferentes entre los tratamientos evaluados (Cuadro 8). La floración, la madurez fisiológica, el rendimiento y contenido de proteína de las semillas no respondieron significativamente a los tratamientos evaluados.

Cuadro 8. Variables evaluadas en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas con coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato (PSB) cultivadas en condiciones semicontroladas.

Tratamiento	FM	MF	VP	Ren	P100S	SPP	PD	pHS	Prot	PFol
PSB1	52.4 ± 2.6 a	91.2 ± 2.9 a	4.9 ± 0.7 a	5.56 ± 0.4 a	20.71 ± 3.2 ab	24.1 ± 4.1 ab	4.37 ± 1.9 b	8.05 ± 0.1 a	55.36 ± 2.5 a	0.018 ± 0.01 b
PSB2	51.8 ± 1.1 a	90.6 ± 1.1 a	4.3 ± 0.5 b	5.46 ± 0.2 a	20.83 ± 2.3 a	22.8 ± 2.7 b	5.57 ± 1.5 a	7.95 ± 0.2 b	55.04 ± 3.9 a	0.023 ± 0.01 a
PSB3	52.4 ± 1.9 a	91.0 ± 1.0 a	4.6 ± 0.8 ab	5.42 ± 0.5 a	21.09 ± 3.0 a	24.0 ± 4.9 ab	5.26 ± 1.5 a	8.06 ± 0.1 a	56.63 ± 3.2 a	0.021 ± 0.01 ab
ADE	52.6 ± 1.1 a	91.4 ± 1.1 a	4.9 ± 1.0 a	5.61 ± 0.3 a	20.11 ± 3.0 b	25.1 ± 4.7 a	5.13 ± 1.7 ab	8.09 ± 0.1 a	55.37 ± 4.2 a	0.021 ± 0.01 ab

PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); ADE, Agua destilada estéril; FM, Floración Media (días); MF, Madurez fisiológica (días); VP, Vainas por planta; Ren, Semilla producida (g.planta⁻¹); P100S, Peso de 100 semillas (g); SPP, Semillas por planta; PD, Fósforo disponible al final del ciclo de cultivo (mg·kg de suelo⁻¹); pHS, pH del suelo al final del ciclo de cultivo; Prot, Contenido de proteína en grano (% del peso seco); PFol, Fósforo foliar (mg·kg⁻¹).

La ausencia de efectos significativos de los tratamientos en estas variables podría ser debido a que la habilidad bacteriana de colonizar las raíces de frijol varía de acuerdo con la cepa utilizada (Collavino *et al.*, 2010). También podría influir que las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato no se aislaron de la rizósfera de plantas de frijol, éstas se aislaron de la rizósfera de *A. angustifolia* cultivado en suelos con propiedades similares a aquéllos donde se cultiva frijol en el estado de Oaxaca. Otros autores (e.g. Kaur y Reddy, 2014) han encontrado efectos significativos de diferentes inóculos solubilizadores de fosfato, comparados con el suelo sin inocular, hasta el tercer ciclo de cultivo en un sistema orgánico de rotación maíz-trigo, en el mismo suelo.

Con respecto al control, el peso de 100 semillas fue mayor con PSB2 y PSB3, se observó un incremento de 4.6% en el peso de las semillas con el PSB3 y de 3.5% con el PSB2. Kumar *et al.* (2016) evaluaron el efecto de una cepa fijadora de nitrógeno (*Rhizobium leguminosarum*) y dos cepas solubilizadoras de fosfato (*Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.) en plantas de frijol (*P. vulgaris*) y encontraron que las plantas inoculadas con las cepas solubilizadoras de fosfato presentaron, en promedio, un peso de cien semillas 35.0% mayor que las plantas sin inocular. El menor valor de pH del suelo, así como el contenido más alto de P disponible y P foliar, se encontró con el PSB2.

Se registró una correlación directa significativa entre las variables vainas por planta y semillas por planta ($r= 0.62$, $p<0.01$); ambas variables también presentaron una correlación inversa significativa con el peso de 100 semillas ($r= -0.61$, $p<0.01$) y ($r=-0.89$, $p<0.01$), respectivamente. El contenido de proteínas se correlacionó de forma directa con el peso de 100 semillas ($r= 0.72$, $p<0.01$), mientras que con la cantidad de vainas y semillas por planta mostró una correlación inversa ($r= -0.47$, $p<0.05$) y ($r= -0.7$, $p<0.05$), respectivamente. El rendimiento se correlacionó directamente con la cantidad de P

disponible en el suelo ($r= 0.62$, $p<0.01$). El contenido de P foliar se correlacionó directamente con el peso de cien semillas ($r=0.53$, $p<0.05$). Zafar *et al.* (2011) encontraron una correlación significativa entre la cantidad de P asimilado y la cantidad de semillas producidas por plantas inoculadas con una cepa fijadora de nitrógeno (*Bradyrhizobium* sp.) y una cepa solubilizadora de fosfato (*Agrobacterium* sp.).

Los dos primeros componentes principales explicaron 90.15% de la variación total. En el primer componente las variables días a madurez fisiológica, vainas por planta, semillas por planta, días a floración, pH del suelo y rendimiento presentaron mayor significancia, por lo que los tratamientos ubicados en el extremo positivo del eje “X” mostraron plantas más tardías, con mayor número de vainas por planta y granos por planta, además de que el suelo presentó pH más alcalino (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.

Componente principal	1	2	3
Autovalor	6.190	1.924	0.887
Proporción	0.688	0.214	0.099
Proporción acumulada	0.688	0.902	1.000
Vectores propios			
Días a floración media	0.376	0.249	0.067
Semillas por planta	0.387	0.093	0.255
Días a madurez fisiológica	0.401	0.046	0.028
Vainas por planta	0.392	0.010	-0.233
Peso de cien semillas	-0.281	0.432	-0.413
Fósforo disponible en el suelo	-0.255	0.028	0.821
pH del suelo	0.373	0.249	0.142
Proteína en las semillas	0.026	0.716	0.101
Rendimiento por planta	0.332	-0.406	-0.020

En el segundo componente principal el contenido de proteínas fue la variable que presentó mayor influencia, lo que indica que los tratamientos ubicados en el extremo positivo del eje “Y” presentaron semillas de mejor calidad (Figura 2).

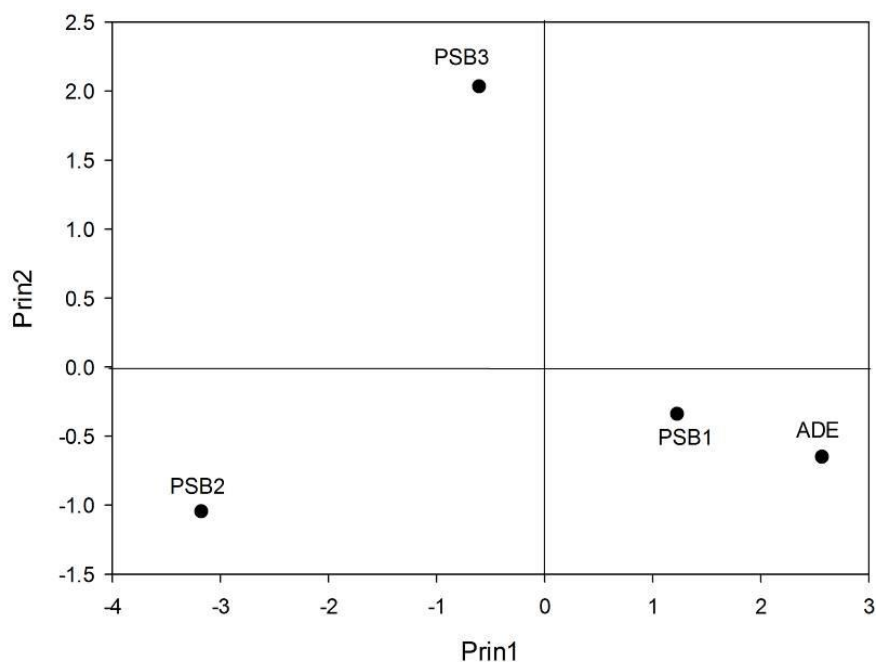


Figura 2. Distribución gráfica de los tratamientos de acuerdo a los primeros dos componentes principales. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); ADE, Agua destilada estéril.

3.4 CONCLUSIONES

Con respecto al control (SSE), las semillas imbibidas en el PSB3 durante 120 min presentaron la mayor longitud de radícula e índice de vigor. El peso de 100 semillas de las plantas bajo condiciones semi-controladas incrementó 3.5% y 4.6 % con PSB2 y PSB3, respectivamente respecto al control. PSB2 y PSB3 favorecen la germinación y algunos

parámetros biométricos del frijol a pesar de que fueron aislados de la rizósfera de *Agave angustifolia* cultivado en suelos con propiedades similares a aquéllos donde se cultiva frijol en el estado de Oaxaca (México), sin embargo, se sugiere la evaluación por más de un ciclo de cultivo para confirmar los efectos positivos de estos coinóculos.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A., J. L. Zurdo-Piñeiro, A. Peix, R. Rivas, and E. Velázquez. 2007. Solubilization of phosphate by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolated from *Phaseolus vulgaris* in El Chaco Arido soil (Argentina). *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16-19, 2002. 135-138 pp.
- Afzal, A., A. Bano, and M. Fatima. 2009. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 487-495.
- Bautista-Cruz, A., V. Martínez-Gallegos, L. Martínez-Martínez, and G. Martínez G. 2015. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of *Agave angustifolia* haw. (maguey espadín). *Pakistan Journal of Botany* 47(3): 1033-1038.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., R. Craig, and J. P. Lynch. 2002. Salinity Tolerance of *Phaseolus* Species during Germination and Early Seedling Growth. *Crop Science* 42:1584–1594.
- Bernal, L., P. Coello, J. Acosta y E. Martínez-Barajas. 2007. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia-México* 41:417-423.
- Cadahia L., C. 2000. Fertirrigación. Cultivos Hortícolas y Ornamentales. Segunda edición. Ediciones Mundi-Persa. España. pp. 25-62.

- Collavino, M.M., P.A. Sansberro, L.A. Mroginski, y O.M. Aguilar. 2010. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46:727-738.
- Cordero E., J., P. Ortega-Rodés, y E. Ortega. 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de forfátos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1): 111-121.
- Cottenie, A. 1984. Soil and Plant Testing and Analysis. FAO Soils Bulletin 38/1. Roma, Italia. pp 96-97.
- Dodd, I.C., and F. Pérez-Alfocea. 2012. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany* 63 (9): 3415-3428.
- Ellis, R. H., T. D. Hong, and E. H. Roberts 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks - Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources. Rome.
- Fernández de C., F., P. Gepts, y M. López. 1986. Etapas de Desarrollo de la Planta de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT. Colombia. 33 p.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M.A. Gómez, y M. A. Sagardoy. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región Sojera. *Ciencia del suelo* 23(1):31-37.
- Glasser, G. 2002. Air pollution from phosphate fertilizer production. *Synthesis/Regeneration* 29:38-40.
- Hernández, G., V. Toscano, N. Méndez, L. Gómez, y M. Mullings. 1996. Efecto de la concentración de fósforo sobre la asimilación de tres genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana*. 7(1): 80-85.

- Kaur, G., and M. S. Reddy. 2014. Role of phosphate-solubilizing bacteria in improving the soil fertility and crop productivity in organic farming. *Archives of Agronomy and Soil Science* 60 (4): 549-564.
- Kaymakanova, M. 2009. Effect of Salinity on Germination and Seed Physiology in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23 (Sup. 1): 326-329.
- Kratz, S., J. Schick, and E. Schnug. 2016. Trace elements in rock phosphates and P containing mineral and organo-mineral fertilizers sold in Germany. *Science of the Total Environment* 542: 1013-1019.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science* 63: 671-678.
- Kumar, P., P. Pandey, R. C. Dubey, D. K. Maheshwaria. 2016. Bacteria consortium optimization improves nutrient uptake, nodulation, disease suppression and growth of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in both pot and field studies. *Rhizosphere* 2: 13-23.
- Lépez I., R., y R. Ramírez D. 2010. Parientes Silvestres del Frijol Común en el Occidente de México. Universidad de Guadalajara. SINAREFI. 64 p.
- Mar, S.S., M. Okazaki. 2012. Investigation of Cd contents in several phosphate rocks used for the production of fertilizer. *Microchemical Journal* 104: 17-21.
- Ormeño, E., R. Torres, J. Mayo, R. Rivas, A. Peix, E. Velázquez and D. Zúñiga. 2007. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 143-147 pp.

- Patel, R. R., D. D. Patel, P. Thakor, B. Patel, and V. R. Thakkar. 2015. Alleviation of salt stress in germination of *Vigna radiata* L. by two halotolerant Bacilli sp. isolated from saline habitats of Gujarat. *Plant Growth Regulation* 76:51-60.
- Peix, A., P. F. Mateos, C. Rodríguez-Barrueco, E. Martínez-Molina, and E. Velazquez. 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1927-1935.
- Qureshi, M.A., M. A. Shakir, A. Iqbal, N. Akhtar, and A. Khan. 2011. Co-inoculation of phosphae solubilizing bacteria and rhizobia for improving growth and yield of mungbean (*Vigna radiata* L.). *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 21(3): 491-497.
- Rajjou, L., M. Duva, K. Gallardo, J. Catusse, J. Bally, C. Job, and D. Job. 2012. Seed Germination and Vigor. *Annual Review of Plant Biology* 63:507-33.
- Sánchez, J. A., J. Reino, B. Muñoz, Y. González, L. Montejo, y R. Machado. 2005. Efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación en la germinación, la emergencia y el vigor de plántulas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. *Pastos y Forrajes* 28 (3): 209-220.
- Savci, S. 2012. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *APCBEE Procedia* 1:287-292.
- Sequera, O., y R. Ramírez. 2013. Roca fosfórica acidulada con ácido sulfúrico y tiosulfato de amonio como fuente de fósforo para frijol en dos tipos de suelo. *Bioagro* 25(1): 39-46.
- Utria, E., S. Goffe, I. M. Reynaldo, D. Morales, y J. A. Cabrera. 2008. Los biosólidos de aguas residuales urbanas aplicados con diferentes frecuencias en las propiedades químicas y microbiológicas del suelo, el rendimiento y la calidad de los frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill). *Cultivos Tropicales* 29(4): 5-11.

- Valverde, A., J.M. Igual and E. Cervantes. 2007. Polyphasic characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from rhizospheric soil of the north-eastern region of Portugal. *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 243-276 pp.
- Van Staden, J., S. G. Sparg, M. G. Kulkarni, and M. E. Light. 2006. Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo[2,3-c]pyran-2-one, and its potential as a preconditioning agent. *Field Crops Research* 98: 98-105.
- Younesi, O., and Moradi, A. 2014. Effects of plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) on antioxidant enzyme activities in salt-stressed bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 60(1): 10-21.
- Zafar, M., M. K. Abbasi¹, N. Rahim, A. Khaliq, A. Shaheen, M. Jamil, and M. Shahid. 2011. Influence of integrated phosphorus supply and plant growth promoting rhizobacteria on growth, nodulation, yield and nutrient uptake in *Phaseolus vulgaris*. *African Journal of Biotechnology* 10(74): 16793-16807.

CAPITULO 4. COINÓCULOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO Y FERTILIZACIÓN MINERAL EN PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

RESUMEN

La cantidad de fósforo (P) disponible para las plantas es afectada por algunos microorganismos del suelo que a su vez pueden mejorar el aprovechamiento de los fertilizantes aplicados. En el presente trabajo se evaluó el potencial de coinóculos bacterianos en la solubilización de fosfatos del suelo para aumentar la cantidad de P disponible y el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en comparación con fertilización mineral. Se aplicó una fertilización de fondo con la dosis N11-P30-K00. Se sembraron cuatro semillas inoculadas en macetas con suelo nativo sin esterilizar. Se realizó el raleo a dos plantas por maceta y una reinoculación cuando las plántulas desplegaron la primera hoja trifoliada. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar bifactorial, donde el primer factor fueron los coinóculos (PSB1: *Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*; PSB2: *Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*; PSB3: *P. luteola* + *Aeromonas hydrophila*) y dos controles (*P. putida* y agua destilada, ADE), mientras que el segundo factor fue la fertilización mineral (30P y 00P). Los fertilizantes minerales no tuvieron efecto significativo en las variables evaluadas. La aplicación de los diferentes coinóculos demostró tener efecto principalmente en la materia seca acumulada por las plantas y en el contenido de P foliar y disponible en el suelo. Las plantas tratadas con el coinóculo PSB3 (*P. luteola* + *A. hydrophila*) presentaron 21.1% más P foliar que el control (ADE) y, junto con la cepa control (*P. putida*) presentaron la mayor cantidad de P disponible en el suelo.

Palabras clave: bacterias solubilizadoras de fosfato, fósforo disponible, *Phaseolus vulgaris* L.

4.1 INTRODUCCIÓN

El P es un macronutriente esencial para todos los seres vivos ya que forma parte de la estructura de sus células y participa en muchos procesos de crecimiento y desarrollo (Bernal *et al.*, 2007). Es un elemento que, junto con el nitrógeno (N) y el potasio (K), es absorbido en grandes cantidades por las plantas, a la vez que no puede ser sustituido por ningún otro (Bonilla, 2013). El P es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre (Cadahia, 2000), ya que forma parte de más de 220 minerales estables de los cuales el principal es la apatita (Pansu y Gautheyrou, 2006). De igual manera, este elemento se puede encontrar tanto en compuestos inorgánicos como orgánicos, ambos estables o insolubles, por lo que sólo una pequeña parte se encuentra en la solución del suelo (Schachtman *et al.*, 1998; Cordero *et al.*, 2008).

Las plantas sólo pueden absorber el P cuando se encuentra como ortofosfato (Pansu y Gautheyrou, 2006), el cual varía en su solubilidad de acuerdo a los valores de pH del suelo, siendo más asimilable el ortofosfato divalente (HPO_4^{2-}) (Navarro y Navarro, 2003). En suelos con pH entre 3.5 y 10.0 el ortofosfato se encuentra en las formas H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , de las cuales la primera predomina en el extremo ácido y la segunda en el alcalino, llegando al equilibrio a pH 7.2; la forma PO_4^{3-} se encuentra en pH superior a 11.0, mientras que H_3PO_4 en pH menor a 3.5 (Pansu y Gautheyrou, 2006).

La deficiencia de P en el suelo es uno de los principales problemas en América Latina y África, donde 50% de los suelos presentan niveles bajos de P inorgánico, siendo frecuente que los cultivos presenten algún grado de deficiencia (Bernal *et al.*, 2007). Aunado a esto, el ortofosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) forma fácilmente complejos metálicos con el calcio (Ca^{2+}) en suelos calcáreos y con el hierro (Fe^{3+}) y aluminio (Al^{3+}) en suelos ácidos, lo que inmoviliza alrededor del 80% de los fertilizantes aplicados (Qureshi *et al.*, 2012).

Diferentes estudios han demostrado la existencia de microorganismos capaces de volver disponibles las reservas de P en el suelo (Kucey, 1983; Fernández *et al.*, 2005), así como de mejorar el aprovechamiento de los fertilizantes aplicados a los cultivos (Kucey, 1987), entre ellos el frijol (Collavino *et al.*, 2010). De esta manera desempeñan una función importante en el metabolismo de las plantas y en su productividad (Rugheim y Abdelgani, 2012).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato pueden llegar a representar más del 90% de la diversidad de microorganismos solubilizadores, desempeñando una función importante en el flujo de nutrimentos en el suelo (Vazquez *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, bajo ciertas condiciones, las bacterias presentan una mayor capacidad solubilizadora que los hongos (Mwajita *et al.*, 2013).

El frijol común es uno de los cultivos más importantes en el mundo debido a que se produce y se consume en todos los continentes, lo que la vuelve la leguminosa más importante utilizada como alimento principalmente en Latinoamérica, Asia y África (Collavino *et al.*, 2010, Lépiz y Ramírez, 2010). Durante el 2013 fueron producidas 22.8

millones de toneladas a nivel mundial, siendo los principales países productores Myanmar, India, Brasil, México y la República Unida de Tanzania (FAO, 2017). Se estima que en México se consumen 11 kg del grano de esta leguminosa por persona al año, lo que la convierte en una de las principales fuentes de proteína al ser complementaria al consumo de maíz (Lépiz y Ramírez, 2010). Como la mayoría de las leguminosas, el frijol es uno de los cultivos con alta dependencia a la disponibilidad de P en el suelo, a la vez de ser sensible a su deficiencia, lo que lo vuelve la principal limitante durante su cultivo (Hernández *et al.*, 1996).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de coinóculos bacterianos en la solubilización de fosfatos del suelo para aumentar la cantidad de P disponible y el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en comparación con fertilización mineral bajo condiciones semi-controladas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato usados en este estudio se seleccionaron por su efecto positivo en el desarrollo y crecimiento de *Agave angustifolia* Haw. (datos no publicados). Las cepas bacterianas empleadas en la preparación de estos coinóculos se aislaron de suelos semiáridos cultivados con *Agave angustifolia* Haw. en el distrito de Tlacolula, Oaxaca, México (Bautista-Cruz *et al.*, 2015).

Para la obtención del pre-coinóculo se tomó 1 mL de cultivo bacteriano de cada cepa solubilizadora de fosfato no antagónica y se inoculó conjuntamente en caldo nutritivo. De cada pre-coinóculo se tomaron 5 mL y se inocularon en caldo nutritivo para

posteriormente incubarse a 30°C y 150 opm durante 48 h en una incubadora-agitadora. Transcurrido el tiempo de incubación el pre-coinóculo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. El pellet celular obtenido se diluyó a una concentración aproximada de 15×10^8 UFC mL⁻¹ de acuerdo con la escala de McFarland. Los coinóculos utilizados se describen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Características de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato empleados en el experimento.

Coinóculo	Cepas bacterianas	pH final del cultivo <i>in vitro</i>	Acidez titulable (mL de NaOH 0.01 N consumido)	Fósforo solubilizado (mg·L ⁻¹)
PSB1	<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Burkholderia gladioli</i>	4.76	11.03	445.77
PSB2	<i>Enterobacter</i> sp. + <i>Pseudomonas luteola</i>	5.14	11.43	270.42
PSB3	<i>Pseudomonas luteola</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i>	5.18	4.03	443.66

Se utilizó la variedad mejorada de frijol “Negro INIFAP”, la cual fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de Especies Nativas de Oaxaca (BAGENO) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Valles Centrales, ubicado en Santo Domingo Barrio Bajo, Etla, Oaxaca, México. Antes de iniciar el trabajo experimental se eliminaron las semillas rotas o con daños por insectos o patógenos, después se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 min, para después lavarse repetidamente con agua destilada estéril.

El experimento se realizó bajo condiciones semi-controladas dentro de un macro túnel. Como macetas se utilizaron bolsas de polietileno negro con capacidad de 4 kg, los cuáles se llenaron con 3.3 kg de suelo sin esterilizar previamente tamizado con una malla de 2 mm de abertura. Algunas propiedades químicas y físicas del suelo utilizado se enlistan en el Cuadro 11.

Cuadro 11 Características físicas y químicas del suelo utilizado en el experimento.

Característica	Valor	Valor de referencia*
pH	7.65	7.4 – 8.5 medianamente alcalino
Densidad aparente**	1.21 g·cm ⁻³	1.20 - 1.32 g·cm ⁻³ suelos francos
Materia orgánica	2.38%	1.6 - 3.5 contenido medio
Fosforo extraíble	2.6 mg kg ⁻¹ de suelo	< 5.5 mg kg ⁻¹ baja disponibilidad
Nitrógeno total	0.612%	> 0.25% contenido muy alto
Textura (arena, limo y arcilla)	48.6%-25.12%-26.28%	Franco Arcilloso Arenoso

*Fuente: Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002);

**Método de la probeta.

Se realizó la inoculación de las semillas por imbibición en los coinóculos durante 60 min. Antes de la siembra de las semillas, se aplicó una dosis equivalente a N11-P30-K00 utilizando fosfato diamónico comercial. Se sembraron cinco semillas inoculadas de frijol por maceta a una profundidad de 2 cm y se regaron hasta el punto de saturación

utilizando agua corriente. Cuando las plántulas alcanzaron la etapa V3 (despliegue de la primera hoja trifoliada) (Fernández *et al.*, 1986) se realizó el raleo a dos plántulas por maceta. Al mismo tiempo, se inyectaron a la rizósfera de las plántulas, 5 mL de cada coinóculo utilizando una jeringa estéril. Se realizaron riegos periódicos de acuerdo a las necesidades del cultivo.

Las variables medidas fueron floración media, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, madurez fisiológica, vainas por planta, P foliar por el método vanadato-molibdato amarillo (Cottenie, 1980), rendimiento y peso de cien semillas. Así mismo, se determinaron en el suelo, al inicio y al final del experimento, el pH y el contenido de P disponible (Olsen).

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar y arreglo bifactorial, donde el primer factor fueron los inóculos y el segundo la fertilización mineral. Como control se utilizaron una cepa comercial de *Pseudomonas putida* Trevisan (Pp) y ADE. En total se evaluaron 10 tratamientos (Cuadro 12). Las unidades experimentales constaron de tres macetas. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, prueba de comparación de medias (Tukey_{0.05}), correlación de Pearson y análisis de componentes principales utilizando el software SAS 9.2®. Previo al análisis de varianza se determinó la homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos a través de las pruebas de Hartley y Shapiro-Wilk, respectivamente.

Cuadro 12. Tratamientos evaluados en el desarrollo de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Factor A Coinóculo bacteriano	Factor B Fertilización mineral (kg P·ha ⁻¹)	Tratamiento
PSB1	00	PSB1x00P
	30	PSB1x30P
PSB2	00	PSB2x00P
	30	PSB2x30P
PSB3	00	PSB3x00P
	30	PSB3x30P
Pp	00	Ppx00P
	30	Ppx30P
ADE (Control)	00	ADEx00P
	30	ADEx30P

PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol

Se encontraron efectos significativos ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados en los días a floración media, materia seca acumulada en la raíz y parte aérea, así como en la cantidad de P foliar y P disponible en el suelo (Cuadro 13). Las plantas que recibieron el

coinóculo PSB1 fueron más tardías que el resto de los tratamientos, no obstante, presentaron una mayor acumulación de materia seca en la parte aérea. Las plantas con el coinóculo PSB2 presentaron la mayor acumulación de materia seca en la raíz al igual que las plantas inoculadas con la cepa Pp. Resultados similares encontraron Bautista-Cruz *et al.* (2015) en plantas de *Agave angustifolia* Haw. inoculadas con algunas cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos utilizadas en este estudio, las cuales incrementaron su contenido de materia seca en la parte aérea y raíz en un 12.14% y 11.64%, respectivamente, en comparación con el control. Yu *et al.* (2012) encontraron que semillas de nogal inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfatos, y suplementadas con roca fosfórica, generaban plántulas con un contenido de materia seca en la parte aérea y raíces hasta 16.14% y 16.9%, respectivamente, mayor al control con sólo roca fosfórica.

El control con ADE presentó la menor cantidad de P foliar. El tratamiento con el coinóculo PSB3 mostró la mayor cantidad de P disponible en el suelo y P foliar. Zafar *et al.* (2011) registraron un incremento de 5% de P foliar en plantas de frijol inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. y *Agrobacterium* sp., y suplementadas con fertilización mineral, en comparación con el control con fertilización mineral y 27.18% mayor al control sin fertilización.

Cuadro 13. Coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato y su efecto en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones semi-controladas

Tratamiento	FM (días)	PSA (g)	PSR (g)	MF (días)	VP	PCS (g)	Ren (g·pl ⁻¹)	pH	PFol (%)	PDisp (mg·kg ⁻¹)
ADE	46.3±1.7 ab	4.98±1.29 ab	3.84±0.64 ab	85.1±1.8 a	9.8±2.0 a	30.41±6.09 a	17.20±8.21 a	7.61±0.17 a	0.019±0.01 b	4.880±0.85 ab
PSB1	45.2±1.6 b	5.58±1.28 a	4.07±0.29 ab	84.9±2.4 a	9.6±3.0 a	30.57±6.74 a	16.56±8.26 a	7.57±0.31 a	0.020±0.00 ab	4.202±1.13 b
PSB2	46.7±2.0 a	5.03±1.06 ab	4.30±0.46 a	84.9±2.2 a	9.8±2.7 a	30.54±7.51 a	16.49±8.15 a	7.62±0.15 a	0.021±0.01 ab	4.358±1.19 b
PSB3	47.0±2.1 a	4.47±1.53 b	3.59±0.72 b	84.8±1.7 a	9.4±2.2 a	30.65±7.42 a	15.00±4.93 a	7.58±0.19 a	0.023±0.01 a	5.597±1.21 a
Pp	46.8±1.3 a	5.32±1.14 ab	4.26±0.43 a	85.7±2.1 a	10.4±2.6 a	30.59±6.82 a	19.18±10.97 a	7.52±0.20 a	0.020±0.01 ab	5.434±1.26 a

FM, Floración media; PSA, Peso seco parte aérea; PSR, Peso seco raíz; MF, Madurez fisiológica; VP, Vainas por planta; PCS, Peso de 100 semillas; Ren, Semilla producida; pH, pH del suelo; PFol, Fósforo foliar; PDisp, Fósforo disponible en el suelo. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril. Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey 0.05).

4.3.2 Efecto de la fertilización mineral en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol

No se observaron efectos significativos de la fertilización mineral sobre las variables evaluadas, con excepción de los días a floración media ($p \leq 0.01$), las plantas fertilizadas fueron más precoces que aquellas que no recibieron fertilización (Cuadro 14).

4.3.3 Efecto de la interacción coinóculo x fertilización mineral en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol

Se encontraron efectos significativos en los días a floración media y el contenido de P foliar ($p \leq 0.01$). El tratamiento PSB3 sin fertilización mineral fue el que presentó mayor cantidad de días a floración media, mientras que el PSB1 con fertilización mineral fue el que presentó la menor cantidad de días. Con respecto a la cantidad de P asimilado, el PSB3 con fertilización mineral presentó la mayor cantidad de P foliar y, junto con el PSB2 y PSB3 sin fertilización mineral, fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos con ADE con o sin fertilización mineral (Cuadro 15). Los tratamientos PSB3 y Pp, con fertilización mineral, fueron los que presentaron la mayor cantidad de P disponible, mientras que los PSB1 y PSB2 con fertilización mineral presentaron la menor cantidad. Yu *et al.* (2011) mencionaron que las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos absorben una parte del P que solubilizan. Valverde *et al.* (2007) encontraron que las plantas de frijol inoculadas con *P. fluorescens* no presentaron diferencias estadísticas en la cantidad de P asimilado con respecto al control sin inocular y mencionaron la existencia de una tendencia que indicaba un posible efecto negativo de la cepa solubilizadora de fosfatos, ya que las plantas inoculadas presentaron menor peso seco y contenido de P que el control sin inocular.

Cuadro 14. Efecto de la fertilización mineral en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones semi-controladas

Trat	FM (días)	PSA (g)	PSR (g)	MF (días)	VP	PCS (g)	Ren (g·pl ⁻¹)	pH	PFol (%)	PDisp (mg·kg ⁻¹)
N00-P00-K00	46.7±2.0 a	4.884±1.495 a	4.043±0.611 a	85.3±2.1 a	9.6±2.6 a	30.249±6.802 a	16.622±8.410 a	7.56±0.17 a	0.021±0.005 a	4.831±1.156 a
N11-P30-K00	46.0±1.6 b	5.264±1.050 a	3.980±0.549 a	84.8±2.0 a	9.5±2.5 a	30.854±6.840 a	17.147±8.204 a	7.60±0.24 a	0.020±0.006 a	4.958±1.340 a

FM, Floración media; PSA, Peso seco parte aérea; PSR, Peso seco raíz; MF, Madurez fisiológica; VP, Vainas por planta; PCS, Peso de 100 semillas; Ren, Semilla producida; pH, pH del suelo; PFol, Fósforo foliar; PDisp, Fósforo disponible en el suelo. Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey _{0.05}).

Cuadro 15. Variables evaluadas en el efecto de coinóculos vs. fertilización mineral en plantas de frijol.

Trat	FM (días)	PSA (g)	PSR (g)	MF (días)	VP	PCS (g)	Ren (g·pl ⁻¹)	pH	PFol (%)	PDisp (mg·kg ⁻¹)
Sin fertilización										
ADE	46.2±1.81 bcd	5.00±1.75 a	3.97±0.63 a	85.8±2.1 a	9.5±1.86 a	30.78±6.96 a	15.82±4.70 a	7.59±0.12 a	0.020±0.00 cd	4.62±0.00 bcd
PSB1	45.3±2.00 de	5.52±1.45 a	4.10±0.39 a	85.0±3.02 a	9.0±3.15 a	30.07±6.53 a	15.18±8.30 a	7.59±0.17 a	0.020±0.00 cd	4.43±0.00 cd
PSB2	47.3±1.70 ab	4.41±0.99 a	4.27±0.53 a	85.4±1.78 a	10.7±3.27 a	30.15±6.64 a	18.73±10.93 a	7.56±0.14 a	0.022±0.01 ab	4.62±0.01 bcd
PSB3	48.0±2.11 a	4.04±1.50 a	3.52±0.85 a	84.5±1.43 a	8.8±1.53 a	29.73±8.22 a	14.78±4.85 a	7.58±0.18 a	0.022±0.01 abc	5.32±0.01 ab
Pp	46.9±1.37 abc	5.45±1.38 a	4.34±0.41 a	85.8±1.69 a	9.9±2.62 a	30.52±6.96 a	18.62±11.61 a	7.49±0.23 a	0.020±0.00 cd	5.18±0.00 abc
Con fertilización										
ADE	46.3±1.7 bcd	4.97±0.66 a	3.70±0.69 a	84.4±1.07 a	9.5±2.21 a	30.04±5.45 a	18.59±10.77 a	7.64±0.21 a	0.019±0.01 d	5.15±0.01 abc
PSB1	45.0±1.05 e	5.63±1.15 a	4.03±0.19 a	84.8±1.81 a	10.0±2.86 a	31.08±7.25 a	17.93±8.42 a	7.56±0.42 a	0.020±0.00 bcd	3.98±0.00 d
PSB2	46.0±2.11 cde	5.65±0.74 a	4.33±0.44 a	84.3±2.58 a	8.4±1.27 a	30.93±8.64 a	14.26±3.11 a	7.68±0.14 a	0.020±0.00 cd	4.10±0.00 d
PSB3	46.0±1.63 cde	4.89±1.53 a	3.66±0.67 a	85.1±1.91 a	9.3±2.84 a	31.58±6.82 a	15.22±5.25 a	7.57±0.20 a	0.023±0.01 a	5.88±0.01 a
Pp	46.7±1.34 bc	5.19±0.89 a	4.17±0.49 a	85.5±2.59 a	10.6±2.69 a	30.65±7.06 a	19.74±10.89 a	7.56±0.17 a	0.020±0.01 bcd	5.69±0.01 a

FM, Floración media; PSA, Peso seco parte aérea; PSR, Peso seco raíz; MF, Madurez fisiológica; VP, Vainas por planta; PCS, Peso de 100 semillas; Ren, Semilla producida; pH, pH del suelo; PFol, Fósforo foliar; PDisp, Fósforo disponible en el suelo; PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril. Valor medio ± desviación estándar de cada variable. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey 0.05).

4.3.4 Correlación entre variables

Se observó una correlación directa entre el contenido de P foliar y P disponible en el suelo con el rendimiento ($r=0.358$ y 0.316 , $p<0.05$, respectivamente), lo que coincide con lo encontrado por Kumar *et al.* (2014) en *P. vulgaris*, Stefan *et al.* (2013) en *Phaseolus coccineus* y Rugheim y Abdelgani (2012) en *Vicia faba*, los cuales registraron un aumento en el rendimiento de las plantas inoculadas con respecto a sus controles.

El contenido de P foliar presentó una correlación inversa con el peso seco de la raíz y parte aérea ($r=-0.370$ y -0.452 , $p<0.01$, respectivamente), mientras que con los días a floración y a madurez fisiológica de las plantas presentó una relación directa ($r=0.364$ y 0.409 , $p<0.01$, respectivamente), lo que significa que las plantas con mayor asimilación de este nutrimento tendieron a ser más tardías, y con una menor acumulación de materia seca, que aquellas con menor asimilación. Los días a madurez fisiológica presentaron una correlación indirecta con la cantidad de P disponible en el suelo ($r=-0.338$, $p<0.05$).

El pH del suelo no se correlacionó de forma significativa con alguna variable, lo que podría sugerir que los coinóculos utilizados en este experimento, y bajo estas condiciones, utilizaron una forma distinta a la liberación de ácidos orgánicos para aumentar la cantidad de fosfatos solubles en el suelo, posiblemente a través de la liberación de fosfatasas (Güneş *et al.*, 2014).

4.3.5 Análisis de componentes principales

Los cuatro primeros componentes explicaron 85% de la variación total (Cuadro 16). Las variables más significativas para el primer componente fueron vainas por planta, floración

media, P disponible en el suelo, días a madurez fisiológica y rendimiento con vectores propios positivos, mientras que el pH del suelo y la materia seca acumulada en la parte aérea presentaron vectores negativos. En el segundo componente, las variables más sobresalientes fueron la materia seca acumulada en la raíz y parte aérea de las plantas, el rendimiento y los días a madurez, todas con vectores propios positivos.

Cuadro 16. Resultados del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en el efecto de la inoculación y la fertilización mineral.

Componente principal	1	2	3
Autovalor	3.334	2.909	1.451
Proporción	0.333	0.291	0.145
Proporción acumulada	0.333	0.624	0.770
Vectores propios			
Floración media	0.367	-0.287	-0.287
Madures fisiológica	0.332	0.328	0.158
Peso seco parte aérea	-0.329	0.430	0.108
Peso seco raíz	-0.045	0.457	-0.177
Peso de cien semillas	-0.112	0.196	0.721
Fósforo disponible	0.352	-0.198	0.259
Fósforo foliar	0.271	-0.280	0.429
pH	-0.408	-0.217	-0.132
Rendimiento	0.325	0.333	-0.243
Vainas por planta	0.403	0.320	-0.054

Conforme al análisis de componentes principales, los tratamientos ubicados en el primer cuadrante de la Figura 3 presentaron una mayor acumulación de biomasa y un mayor rendimiento, con mayor cantidad de P disponible en el suelo y menor pH del suelo. En el segundo cuadrante se encuentran los tratamientos que presentaron también mayor acumulación de biomasa y rendimiento, pero con menor cantidad de disponible en el

suelo, así como un pH más alcalino. En el tercer cuadrante se encuentran los tratamientos más precoces, con menor rendimiento y acumulación de biomasa. En el cuarto cuadrante se encuentran los tratamientos de mayor rendimiento, tardíos y menor acumulación de biomasa.

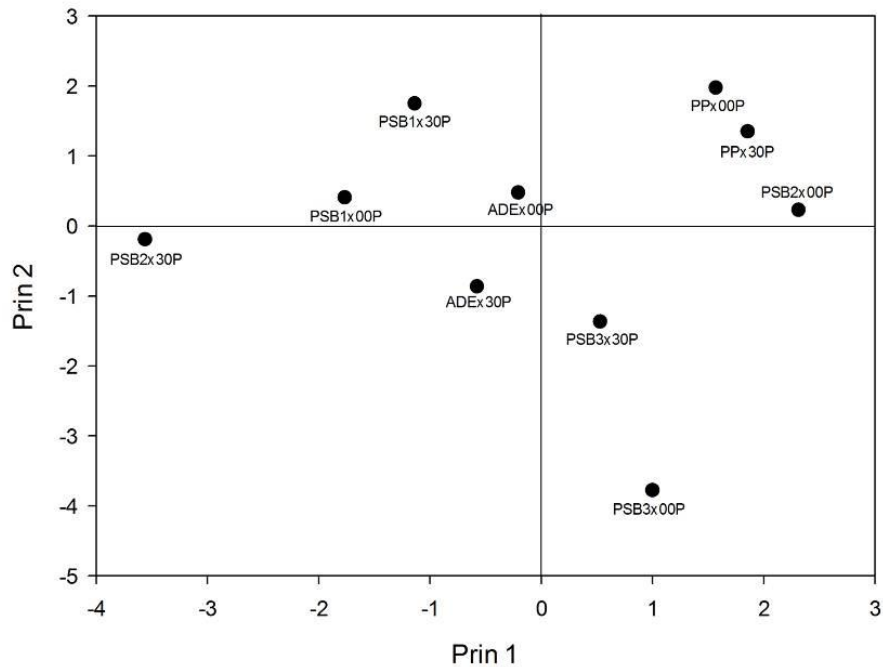


Figura 3. Distribución gráfica de los tratamientos de acuerdo con los primeros dos componentes principales. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.

En el tercer componente principal el contenido de P foliar y el peso de 100 semillas fueron las variables de mayor peso, ambas con vectores propios positivos. En la Figura 4 se muestra la distribución de los tratamientos tomando como referencia el primero y tercer componente. En el primer cuadrante se encuentra el tratamiento PSB3x30P que, de

acuerdo con el análisis de componentes, fue tardío, con mayor cantidad de vainas por planta con semillas más grandes, una mayor cantidad de P asimilado y disponible en el suelo.

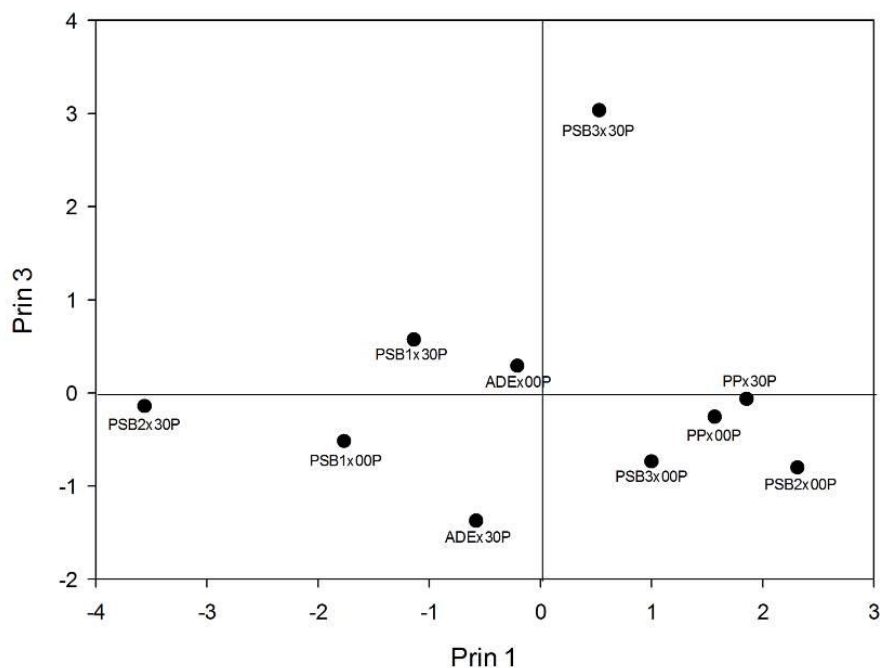


Figura 4. Distribución gráfica de los tratamientos de acuerdo con los primeros dos componentes principales. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.

En un segundo análisis de componentes, ahora enfocado al comportamiento de las cepas evaluadas, se encontró que los primeros tres componentes explicaron el 91.5% de la variación observada (Cuadro 17). En el primer componente las variables rendimiento, vainas por planta, días a madurez fisiológica y acumulación de biomasa en la parte aérea y la raíz presentaron vectores propios con valores positivos, mientras que la variable

contenido de P foliar presentó un vector propio negativo. Para el segundo componente, las variables P disponible, días a floración, madurez fisiológica y peso de 100 semillas presentaron vectores propios positivos, mientras que el pH presentó un vector propio negativo (Figura 5).

Cuadro 17. Resultados del análisis de componentes principales de las variables evaluadas en el efecto de los coinóculos utilizados.

Componente principal	1	2	3
Autovalor	4.737	3.092	1.320
Proporción	0.474	0.309	0.132
Proporción acumulada	0.474	0.783	0.915
Vectores propios			
Floración media	-0.139	0.428	-0.346
Madures fisiológica	0.368	0.320	-0.164
Peso seco parte aérea	0.385	-0.213	0.338
Peso seco raíz	0.342	-0.077	0.174
Peso de cien semillas	-0.149	0.319	0.658
Fósforo disponible	-0.098	0.522	-0.208
Fósforo foliar	-0.375	0.234	0.257
pH	-0.202	-0.412	-0.374
Rendimiento	0.433	0.157	-0.163
Vainas por planta	0.425	0.201	-0.019

En el primer cuadrante de la Figura 5 se encuentra la cepa control de *P. putida*, la cual, de acuerdo con el análisis de componentes principales, promovió plantas con rendimiento y peso de cien semillas más elevado, así como un pH de suelo más ácido, sin embargo, tuvo una baja cantidad de P asimilado. El coinóculo PSB3, en el segundo cuadrante, presentó un menor rendimiento, pero una mayor concentración de P foliar que la cepa control. Por último, los coinóculos PSB1, PSB2 y el control ADE presentaron valores intermedios de rendimiento y acumulación de biomasa, al igual que un pH más alcalino.

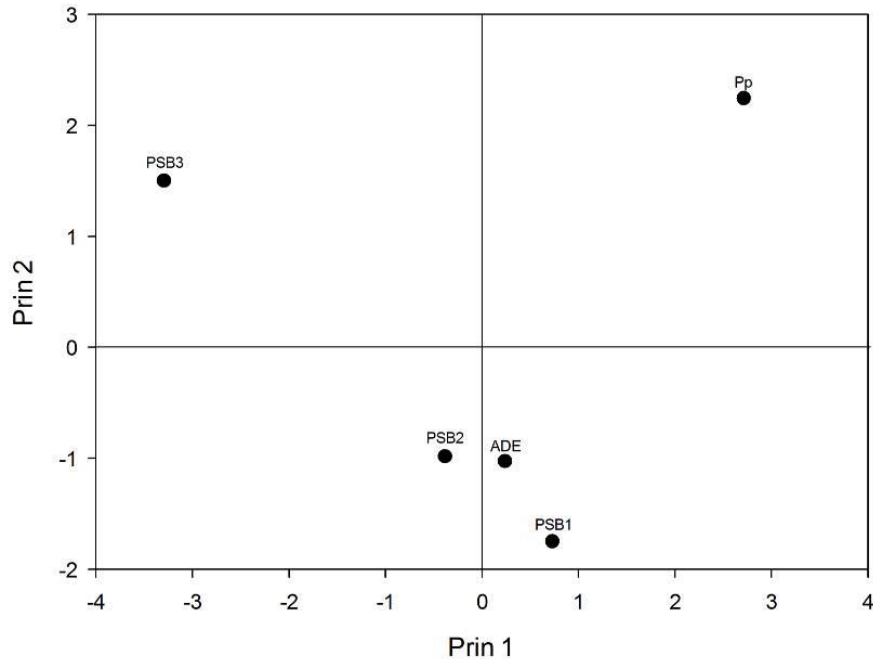


Figura 5. Distribución gráfica de los tratamientos de acuerdo con los primeros dos componentes principales. PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.

4.4 CONCLUSIONES

El efecto de la aplicación de fertilizantes minerales no tuvo un efecto significativo en las variables biométricas evaluadas en las plantas de frijol. La aplicación de los diferentes coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato demostró tener efecto principalmente en la materia seca acumulada por las plantas y en el contenido de P foliar y disponible en el suelo. Las plantas tratadas con el coinóculo PSB3 (*P. luteola* + *A. hydrophila*) presentaron 21.1% más P foliar que el control (ADE) y, junto con la cepa control (*P. putida*) presentaron la mayor cantidad de P disponible en el suelo. Las plantas con menor

cantidad de P asimilado presentaron también una mayor acumulación de biomasa en la raíz y la parte aérea. El tratamiento con mayor cantidad de P asimilado fue el PSB3 con fertilización mineral.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, A., A. Bano, and M. Fatima. 2009. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 487-495.
- Bautista-Cruz, A., V. Martínez-Gallegos, L. Martínez-Martínez, and G. Martínez G. 2015. Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of *Agave angustifolia* haw. (maguey espadín). *Pakistan Journal of Botany* 47(3): 1033-1038.
- Bernal, L., P. Coello, J. Acosta y E. Martínez-Barajas. 2007. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia* 41:417-423.
- Bonilla, I. 2013. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. *In*. Azcón-Bieto, J., y M. Talón. (Coordinadores). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Segunda Edición. McGraw-Hill – Interamericana. Publicacions I Edicions. Madrid, España. pp. 103-121.
- Cadahia L., C. 2000. *Fertirrigación. Cultivos Hortícolas y Ornamentales*. Segunda edición. Ediciones Mundi-Persa. España. pp. 25-62.
- Chen Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W.-A. Lai, and C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Collavino, M.M., P.A. Sansberro, L.A. Mroginski, y O.M. Aguilar. 2010. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid

- soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* 46:727-738.
- Cordero E., J., P. Ortega-Rodés, y E. Ortega. 2008. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de forfátos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(1): 111-121.
- Cottenie, A. 1984. *Soil and Plant Testing and Analysis*. FAO Soils Bulletin 38/1. Roma, Italia. pp 96-97.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Edición matutina. Diciembre, 31. Segunda sección.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. FAOSTAT. Web (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>). Consultada en abril del 2017.
- Fernández de C., F., P. Gepts, y M. López. 1986. *Etapas de Desarrollo de la Planta de Frijol Común (Phaseolus vulgaris L.)*. CIAT. Columbia. 33 p.
- Fernández, L. A., P. Zalba, M.A. Gómez, y M. A. Sagardoy. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región Sojera. *Ciencia del suelo* 23(1):31-37.
- Güneş, A., M. Turan, M. Güllüce, and F. Şahin. 2014. Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *PUBLICACIONES I EDICIONES 2007. Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses. Plant Physiology* 144: 752-767.
- Hernández, G., V. Toscano, N. Méndez, L. Gómez, y M. Mullings. 1996. Efecto de la concentración de fósforo sobre la asimilación de tres genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 80-85.

- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63: 671-678. Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 53(12): 2699-2703.
- López I., R., y R. Ramírez D. 2010. *Parientes Silvestres del Frijol Común en el Occidente de México*. Universidad de Guadalajara. SINAREFI. 64 p.
- Mishra, P. K., S. Chandra B., K. Jeevanandan, S. Kumar, J. Kumar B., and J. Chandra B. 2014. Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash (*Phaseolus vulgaris* L.) *Archives of Agronomy and Soil Science* 60(6): 799-815.
- Mwajita, M. R., H. Murage, A. Tani, and E. M. Kahangi. 2013. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. SpringerPlus. Web (<http://www.springerplus.com/content/2/1/606>).
- Navarro B., S., y G. Navarro G. 2003. *Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida*. Segunda edición. Ediciones Mundi Persa. España. pp. 219-250.
- Pansu, M., and J. Gautheyrou. 2006. *Handbook of Soil Analysis. Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Springer. Netherlands. pp. 793-795.
- Qureshi, M.A., A. Ahmad, N. Akhtar, A. Iqbal, F. Mujeeb, and A. Shakir. 2012. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 22(1): 204-210.
- Rugheim, A. M. E., and M. E. Abdelgani. 2012. Effects of microbial and chemical fertilization on yield and seed quality of faba bean (*Vicia faba*). *International Food Research Journal*. 19(2): 417-422.

- Schachtman, D. P., R. J. Reid, and S. M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Stefan, M., N. Munteanu, V. Stoleru, M. Mihasan, and L. Hritcu. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151: 22-29.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Cierre de la producción agrícola por estado. Página web (http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp). Consultada en mayo del 2017.
- Valverde, A., J.M. Igual and E. Cervantes. 2007. Polyphasic characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from rhizospheric soil of the north-eastern region of Portugal. *In*. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velázquez, E., and C. Rodríguez-Barrueco (eds.). Springer. Salamanca, Spain, July 16–19, 2002. 243-276 pp.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. E. Puente, A. Lopez-Cortes, and Y. Bashan. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30:460-468.
- Yu, X., X. Liu, T.H. Zhu, G.H. Liu, C. Mao. 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils* 47: 437-446.
- Yu, X., X. Liu, T.H. Zhu, G.H. Liu, C. Mao. 2012. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology* 50: 112-117.
- Zafar, M., M. K. Abbasi¹, N. Rahim, A. Khaliq, A. Shaheen, M. Jamil, and M. Shahid. 2011. Influence of integrated phosphorus supply and plant growth promoting

rhizobacteria on growth, nodulation, yield and nutrient uptake in *Phaseolus vulgaris*. African Journal of Biotechnology 10(74): 16793-16807.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES

Con respecto al control (SSE), las semillas imbibidas en el PSB3 durante 120 min presentaron la mayor longitud de radícula e índice de vigor. El peso de 100 semillas de las plantas bajo condiciones semi-controladas incrementó 3.5% y 4.6% con PSB2 y PSB3. Al comparar los coinóculos con la fertilización mineral se encontró que la aplicación de fertilizantes minerales no tuvo un efecto significativo en las variables biométricas evaluadas. La aplicación de los diferentes coinóculos demostró tener efecto principalmente en la materia seca acumulada por las plantas y en el contenido de P foliar y disponible en el suelo. Las plantas con el coinóculo PSB3 presentaron 21.1% más P foliar que el control (ADE) y, junto con la cepa control (*P. putida*) presentaron la mayor cantidad de P disponible en el suelo. PSB2 y PSB3 parecen favorecer la germinación y algunos parámetros biométricos del frijol. Sin embargo, se sugiere una evaluación mayor a un ciclo de cultivo para confirmar los efectos positivos de estos coinóculos.

CAPITULO 6. ANEXOS



Anexo 1. Germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con bacterias solubilizadoras de fósforo dentro de cámara de germinación.



Anexo 2. Aspecto de las plántulas durante la inoculación durante la evaluación del efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fósforo en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.



Anexo 3. Aspecto de las plantas al llegar a madurez fisiológica al final de la evaluación del efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de frijol.



Anexo 4. Aspecto de las plantas durante la reinoculación durante la comparación del efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato con la fertilización mineral de plantas de frijol.



Anexo 5. Aspecto de las plantas sin fertilización mineral al llegar a madurez fisiológica al final de la comparación del efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato con la fertilización mineral de plantas de frijol. De izquierda a derecha PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.



Anexo 6. Aspecto de las plantas con fertilización mineral al llegar a madurez fisiológica al final de la comparación del efecto de los coinóculos bacterianos solubilizadores de fosfato con la fertilización mineral de plantas de frijol. De izquierda a derecha PSB1 (*Enterobacter* sp. + *Burkholderia gladioli*); PSB2 (*Enterobacter* sp. + *Pseudomonas luteola*); PSB3 (*Pseudomonas luteola* + *Aeromonas hydrophila*); Pp (*Pseudomonas putida*); ADE, agua destilada estéril.