

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA  
Escuela de Posgrado

MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE  
*Rhizobium* sp. EN EL RENDIMIENTO, CALIDAD  
Y RENTABILIDAD DE *Phaseolus vulgaris* L.  
(VAINITA) EN CONDICIONES DE CAMPO

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

BLGA. MBLGA. VIRGINIA LILIANA CHIPANA LAURA

Para optar el Grado Académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS (*MAGISTER SCIENTIAE*) CON MENCIÓN  
EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE

TACNA - PERÚ

2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL BIOFERTILIZANTE  
*Rhizobium* sp. EN EL RENDIMIENTO, CALIDAD Y RENTABILIDAD DE  
*Phaseolus vulgaris* L. (VAINITA) EN CONDICIONES DE CAMPO**

Tesis sustentada y aprobada el 6 de julio del 2015; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE : .....  
Dr. Julio Miguel Fernández Prado

SECRETARIO : .....  
*Rosario E. Zagarra Vda. de Chávez*  
Dra. Rosario E. Zagarra Vda. de Chávez

MIEMBRO : .....  
*Edilberto Pablo Mamani López*  
Dr. Edilberto Pablo Mamani López

ASESOR : .....  
*Daladier Miguel Castillo Cotrina*  
MSc. Daladier Miguel Castillo Cotrina

## DEDICATORIA

*À Dios por darme salud, sabiduría, fortaleza y por permitirme seguir adelante, para continuar creciendo como persona y como profesional. À mis queridos padres, por ser el motor de mi existencia, por su dedicación, por estar siempre allí para darme su apoyo incondicional. À mis queridos hermanos, por su comprensión, ayuda y a motivarme a seguir avanzando para alcanzar mis metas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mi asesor de tesis MSc. Daladier Castillo Cotrina, docente e investigador del Dpto. Académico de Biología, por su dirección y apoyo constante durante todo el desarrollo de esta investigación.
- Al Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX) por permitirme utilizar sus instalaciones y brindarme su apoyo, al Administrador C.P.C. Gabriel Cahuana, a los Srs. Percy Mamani, Teófilo Huanca, Orlando Cruz, Humberto Maquera, Antonio Mendoza, Félix Quispe y a todo el personal de este Instituto.
- A la Dra. Bertha Soriano Bernilla, docente e investigadora de la Universidad Nacional de Trujillo, por proporcionarme la cepa que me permitió iniciar esta investigación.
- A mi amigo Ing. Agr. Paul Medina Bedoya por su apoyo y asesoramiento antes y durante la ejecución de este proyecto.
- A mi amiga, colega e investigadora Claudia Clavijo Koc por sus valiosas sugerencias antes y durante esta investigación.

- Al Mgr. Roberto Castellanos Cabrera, docente e investigador del Dpto. Académico de Biología, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Bioquímica para la realización de parte de esta tesis.
- Al Lic. Mario Matos Peña, docente de estadística, por su asesoramiento en el procesamiento de datos.
- Al Dr. Julio Cáceda Quiroz, docente y jefe del Laboratorio de Microbiología, al Blgo. Edwin Obando, al docente Alfredo Quispe del Laboratorio de Química Inorgánica, a la Blga. Aracely Valera del Laboratorio de Biología, a todos ellos por su apoyo logístico durante la ejecución de esta tesis.
- A mis amigas, colegas e investigadoras Patricia Lanchipa y Nadia Vera por su apoyo y constante aliento durante el desarrollo de esta investigación.
- A mis amigos del laboratorio, que me apoyaron en la etapa de campo: a Gisela Maraza, Emma Flores, Abel Coaquira, Israel Salazar y Fredy Ninaja.

## CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1

### **CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

1.1. Descripción del problema	4
1.1.1. Antecedentes del problema	4
1.1.2. Problemática de la investigación	4
1.2. Formulación del problema	5
1.3. Justificación e importancia	6
1.3.1. Justificación	6
1.3.2. Importancia	6

	Pág.
1.4. Alcances y limitaciones	9
1.4.1. Alcances	9
1.4.2. Limitaciones	9
1.5. Objetivos	10
1.5.1. Objetivo general	10
1.5.2. Objetivo específicos	10
1.6. Hipótesis	10

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

2.1. Antecedentes del estudio	11
2.1.1. En el ámbito internacional	11
2.1.2. En el ámbito nacional	13
2.1.3. En el ámbito local	14
2.2. Bases teóricas	16
2.2.1. Fijación biológica de nitrógeno	16
2.2.1.1. Organismos fijadores de nitrógeno	18
2.2.1.2. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	19
2.2.1.3. Etapas de la formación de nódulos	20
2.2.1.4. Factores limitantes en la nodulación	24
2.2.2. Los rhizobia	25

	Pág.
2.2.2.1. Descripción macroscópica y microscópica	26
2.2.2.2. Metabolismo	27
2.2.2.3. Genética	28
2.2.2.4. Características simbióticas de los rhizobia	29
2.2.2.5. Los rhizobia que forman simbiosis con <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	30
2.2.3. Biofertilizantes o inoculantes rizobianos	31
2.2.3.1. Características y concentración de un buen inoculante	32
2.2.4. Cultivo de vainita	33
2.2.4.1. Origen del frijol	33
2.2.4.2. Taxonomía	33
2.2.4.3. Morfología	34
2.2.4.4. Factores agroclimáticos	37
2.2.4.5. Fertilización	39
2.2.4.6. Cosecha	39
2.2.4.7. Producción y rendimiento de vainita en el Perú	40
2.2.4.8. Calidad de la vainita	41
2.2.4.9. Usos de la vainita	43
2.2.5. Rentabilidad	43
2.2.6. Marco legal	44
2.3. Definición de términos	45

### **CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO**

	Pág.
3.1. Tipo y diseño de investigación	53
3.1.1. Tipo	53
3.1.2. Diseño	53
3.2. Población y muestra	54
3.2.1. Población	54
3.2.2. Muestra	54
3.3. Operacionalización de variables	54
3.4. Técnicas e instrumentos para recolección de datos	56
3.4.1. Fase de laboratorio	56
3.4.1.1. Materiales	56
3.4.1.2. Equipos	57
3.4.1.3. Purificación de la cepa de <i>Rhizobium etli</i> y producción de biofertilizante	57
3.4.2. Fase de campo	62
3.4.2.1. Localización del campo experimental	62
3.4.2.2. Ubicación geográfica	62
3.4.2.3. Características del suelo	63
3.4.2.4. Agua de riego	64
3.4.2.5. Características del clima	67
3.4.2.6. Material experimental	70

	Pág.
3.4.2.7. Variables evaluadas durante la investigación	70
3.4.2.8. Conducción del experimento	72
3.5. Procesamiento y análisis de datos	78

#### **CAPÍTULO IV. RESULTADOS**

4.1. Rendimiento	79
4.1.1. Rendimiento por hectárea	79
4.1.2. Rendimiento por planta	82
4.2. Calidad	85
4.2.1. Longitud de vaina	85
4.2.2. Peso promedio de vaina	88
4.2.3. Número de vainas por planta	91
4.3. Rentabilidad	94

#### **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

5.1. Rendimiento	96
5.1.1. Rendimiento por hectárea	96
5.1.2. Rendimiento por planta	100
5.2. Calidad	102

	Pág.
5.2.1. Longitud de vaina	102
5.2.2. Peso promedio de vaina	104
5.2.3. Número de vainas por planta	106
5.3. Rentabilidad	108
<b>CONCLUSIONES</b>	115
<b>RECOMENDACIONES</b>	117
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	118
<b>ANEXOS</b>	148

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición nutritiva de la vainita en 100 g de producto comestible	42
Tabla 2. Operacionalización de variables experimentales	55
Tabla 3. Caracterización morfológica de colonias de <i>Rhizobium etli</i> en ALMRC	152
Tabla 4. Caracterización fisiológica y bioquímica de <i>Rhizobium etli</i>	153
Tabla 5. Lecturas de conteos directos de <i>Rhizobium etli</i>	155
Tabla 6. Análisis físico-químico del suelo del INPREX-Tacna	63
Tabla 7. Análisis físico-químico del agua del canal Uchusuma	65
Tabla 8. Temperaturas y humedad relativa registradas en la zona de Tacna	67
Tabla 9. Fertilización de tratamientos	74
Tabla 10. Nódulos efectivos e inefectivos en raíces de plantas de vainita	158

	Pág.
Tabla 11. Composición química del biol	159
Tabla 12. Malezas identificadas en el campo experimental	76
Tabla 13. Análisis de varianza para el rendimiento por hectárea	79
Tabla 14. Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el rendimiento por hectárea	80
Tabla 15. Análisis de varianza para el rendimiento por planta	82
Tabla 16. Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el rendimiento por planta	83
Tabla 17. Análisis de varianza para la longitud de vaina	85
Tabla 18. Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para la longitud de vaina	86
Tabla 19. Análisis de varianza para el peso promedio de vaina	88
Tabla 20. Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el peso promedio de vaina	89
Tabla 21. Análisis de varianza para el N° de vainas por planta	91
Tabla 22. Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el N° de vainas por planta	92
Tabla 23. Análisis económico de los seis tratamientos de	

	Pág.
vainita	94
Tabla 24. Rendimiento en kilogramos por hectárea del cultivo de vainita	160
Tabla 25. Rendimiento por planta de vainita (g)	160
Tabla 26. Longitud de vaina (cm)	161
Tabla 27. Peso promedio de vaina (cm)	161
Tabla 28. N° de vainas por planta	162
Tabla 29. Altura de la planta a los 60 días (cm)	162
Tabla 30. Diferencias entre nodulación efectiva e inefectiva	163
Tabla 31. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 1	164
Tabla 32. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 2	166
Tabla 33. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 3	168
Tabla 34. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 4	170
Tabla 35. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 5	172
Tabla 36. Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 6	174

	Pág.
Tabla 37. Costo de producción del biofertilizante de <i>Rhizobium etli</i> a escala piloto (100 l)	176

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formación de un nódulo radical en una leguminosa afectada por <i>Rhizobium</i>	23
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>Rhizobium etli</i>	154
Figura 3. Esquema de la producción a escala de laboratorio (1 l) del biofertilizante de <i>Rhizobium etli</i>	157
Figura 4. Distribución espacial de tratamientos en el campo experimental	69
Figura 5. Gráfico del rendimiento por hectárea (Kg)	81
Figura 6. Gráfico del rendimiento por planta (g)	84
Figura 7. Gráfico de la longitud de vaina (cm)	87
Figura 8. Gráfico del peso promedio de vaina (g)	90
Figura 9. Gráfico del número de vainas por planta	93
Figura 10. Gráfico de la rentabilidad de los seis tratamientos de vainita	95

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium etli* en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo. Primero se hizo una fase de laboratorio, se purificó la cepa, produciéndose un biofertilizante para su aplicación en campo. El trabajo de campo se realizó desde marzo hasta junio del 2014, empleándose un diseño en bloques completamente aleatorizado, seis tratamientos, tres repeticiones, 18 unidades experimentales, totalizando 540 plantas; el campo experimental tuvo un área de 280 m<sup>2</sup>. Los tratamientos fueron: *Rhizobium etli* 10<sup>8</sup> cel/ml (T1), *Rhizobium etli* 10<sup>9</sup> cel/ml (T2), *Rhizobium etli* 10<sup>10</sup> cel/ml (T3), control negativo agua destilada (T4), control positivo fertilizante químico (T5) y control positivo biol (T6). Se evaluó el rendimiento, calidad y rentabilidad. Los resultados demostraron que la concentración *Rhizobium etli* 10<sup>10</sup> cel/ml (T3) fue la más efectiva de los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli*, que no tuvo diferencia significativa con el tratamiento con fertilizante químico, estos tratamientos generaron un mayor efecto en el rendimiento, calidad y rentabilidad de la vainita en campo.

Palabras clave: *Rhizobium etli*, *Phaseolus vulgaris* L. (vainita), biofertilizante, fertilizante químico.

## ABSTRACT

The effect of the concentration of *Rhizobium etli* biofertilizer on yield, quality and profitability of *Phaseolus vulgaris* L. (green bean) was evaluated under field conditions. First a phase laboratory was done, strain was purified, producing a biofertilizer for field application. Fieldwork was made from march to june 2014, using a design in randomized complete block with six treatments, three replicates, 18 experimental units, totaling 540 plants; the experimental field had an area of 280 m<sup>2</sup>. The treatments were: *Rhizobium etli* 10<sup>8</sup> cells/ml (T1), *Rhizobium etli* 10<sup>9</sup> cells/ml (T2), *Rhizobium etli* 10<sup>10</sup> cells/ml (T3), distilled water negative control (T4), positive control chemical fertilizer (T5) and biol positive control (T6). Yield, quality and profitability were evaluated. The results shown that the concentration *Rhizobium etli* 10<sup>10</sup> cells/ml (T3) were the most effective treatments inoculated with *Rhizobium etli*, which had no significant difference with the treatment with chemical fertilizer, these treatments generated a greater effect on yield, quality and profitability of green bean on the field.

Keywords: *Rhizobium etli*, *Phaseolus vulgaris* L. (green bean), biofertilizer, chemical fertilizer.

## INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de nitrógeno en suelos es uno de los principales factores que limita la producción de los cultivos. Para solucionar este problema los productores del sector agropecuario utilizan indiscriminadamente fertilizantes de síntesis química con el objetivo de mejorar la calidad de sus cultivos o del forraje; sin embargo, ésta es más costosa y poco amigable con el medio ambiente (Marín, Baldani, Dos Santos & Baldani, 2003).

Dentro del concepto de agricultura sostenible, surgen tecnologías limpias como la biofertilización con bacterias diazotróficas (Mahecha, 2002). Es así que se ha generado la tendencia hacia el desarrollo de dichas tecnologías que involucran el uso de diferentes microorganismos con potencial biofertilizante, enfocándose principalmente hacia los rizobios que tienen la habilidad de establecer simbiosis con plantas leguminosas contribuyendo en un alto porcentaje en la sustitución de fertilizantes mediante un proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). La aplicación de estas tecnologías tendrá un gran impacto medioambiental y social, gracias a la reducción de costos de los fertilizantes nitrogenados de síntesis, equilibrio en el ecosistema y contribución a mejores rendimientos

en planta sin provocar deterioro de las capacidades productivas del suelo, lixiviación y eutrofización de fuentes hídricas (Ben Rebah, Prévost, Yezza & Tyagi, 2007).

En el Perú, el cultivo de vainita está bastante difundido en zonas de la costa y sierra, principalmente; estimándose un total de 1500 hectáreas (ha) sembradas con esta hortaliza. Este cultivo se halla técnicamente más desarrollado en la costa en donde, además su consumo es bastante popular y apreciado por las características nutritivas y alto contenido de fibra de las vainas (Toledo, 2003).

El cultivo de vainita en Tacna se reportó en 44 ha de superficie cosechada, una producción de 304 toneladas métricas o toneladas (t) y un rendimiento de 6,909 t/ha (Gobierno Regional Tacna & Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna, 2010).

Aún no se han realizado trabajos con biofertilización utilizando *Rhizobium* sp. en vainita en Tacna, y no se conocen las dosis adecuadas para su aplicación en campo que permitan una rentabilidad atractiva para el agricultor. Este estudio procura brindar una alternativa de solución aplicando este biofertilizante en la dosis adecuada en cultivos de vainita, cuyos resultados puedan contribuir a la disminución de la fertilización

química nitrogenada. Por tanto, se ha planteado la hipótesis de que la concentración más efectiva es de  $10^9$  cel/ml del biofertilizante *Rhizobium etli* que produce una mayor rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de campo.

## **CAPÍTULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

##### **1.1.1. Antecedentes del problema**

Se han realizado trabajos de investigación a nivel internacional donde se ha probado el efecto de inoculantes de *Rhizobium* sp. en diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L., obteniéndose resultados que reflejan que el uso de inoculantes es una práctica económicamente rentable para el agricultor y también es ambientalmente responsable.

En la región Tacna, aún no se ha probado el efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium* sp. que produzca una mayor rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo. En esta región la fertilización nitrogenada es principalmente química en base a urea y nitrato de amonio, que son aplicados en la fertilización de la vainita.

##### **1.1.2. Problemática de la investigación**

El uso de los fertilizantes nitrogenados para la agricultura convencional es ampliamente conocido y empleado para la producción de la vainita; su

aplicación permite aumentar la productividad agrícola; sin embargo, su uso representa un elevado costo financiero, ambiental y de salud pública. En nuestra región el efecto de la concentración *Rhizobium* sp., sobre el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* (vainita) en condiciones de campo, aún no han sido probadas. Investigaciones a nivel nacional e internacional respecto a la aplicación de *Rhizobium* sp. como biofertilizante en campo, han utilizado diferentes volúmenes y concentraciones por hectárea, lo que ha hecho evidente que los costos en el uso de este biofertilizante varíen grandemente.

Estos problemas conllevan la necesidad de buscar alternativas eficientes para proporcionar nitrógeno a las plantas. Lo expuesto lleva a plantear en esta investigación, el uso de una tecnología limpia como un biofertilizante o inoculante de *Rhizobium* sp. para la fertilización del cultivo de vainita en la región Tacna y que contribuya a la disminución total o parcial de la fertilización nitrogenada, básicamente química, por una fertilización biológica que represente un menor impacto para el agricultor de la región.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Cuál es la concentración más efectiva del biofertilizante *Rhizobium etli* que produce una mayor rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

#### **1.3.1. Justificación**

En el Perú la fertilización nitrogenada en los cultivos es eminentemente química, su uso indiscriminado puede generar contaminación ambiental del aire por gases de invernadero, de acuíferos, variación del pH en suelos, acumulación de nitratos y nitritos en el suelo y los alimentos que pueden llegar al hombre y provocar enfermedades como la cianosis. Además los nitratos pueden formar nitrosaminas y nitrosamidas que pueden ser cancerígenos.

Actualmente se han aislado e identificado molecularmente diferentes cepas de *Rhizobium*, que han sido probadas en laboratorio y campo para determinar su efecto en diferentes plantas sean o no leguminosas, pero aún no se ha investigado el efecto de diferentes concentraciones de inoculante de *Rhizobium* sp. en el rendimiento, calidad y rentabilidad en el cultivo de frijol verde (vainita) en condiciones de campo. En estos tiempos se intensifican investigaciones en el campo de la fertilización biológica ya que representan una necesidad para mitigar los efectos negativos del uso indiscriminado de los fertilizantes nitrogenados.

#### **1.3.2. Importancia**

Actualmente en la región Tacna, los agricultores emplean fertilizantes químicos nitrogenados para la fertilización de sus cultivos (hortalizas) y en

especial la vainita, por lo cual la importancia de esta investigación radica en la necesidad de generar una tecnología limpia aplicable para el agricultor de la región que reemplace de manera total o parcial a los fertilizantes nitrogenados como la urea. El uso de esta tecnología, basada en la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizante, la hará más competitiva en el mercado externo.

Desde el punto de vista agronómico, la fijación biológica de nitrógeno es un recurso renovable que puede provocar la disminución de aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, cuyo impacto ambiental (agua-suelo-atmósfera) se traduce en aspectos de contaminación (Grageda-Cabrera, Esparza-García & Peña-Cabriales, 2000).

El uso de inoculantes a base de bacterias del género *Rhizobium*, ha sido una herramienta importante para la estimulación en la capacidad de captar nitrógeno atmosférico en plantas de la familia Fabaceae (leguminosas). A través de la inoculación de bacterias simbióticas, se logra que leguminosas que han sido catalogadas como muy pobres en su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, incrementen la tasa de fijación, de modo que sean más eficientes en este aspecto (Da Silva, Tsai & Bonetti, 1993).

La capacidad fijadora de nitrógeno por *Rhizobium*, en asociación con las leguminosas es importante en los sistemas agrícolas de producción y especialmente en la rotación de cultivos, por lo cual es conveniente favorecer su aplicación generalizada, ya que la inoculación es una opción natural, que no contamina el ambiente y favorece la conservación del suelo. Por lo tanto, el manejo adecuado de la tecnología de inoculantes a base de *Rhizobium* puede, por lo menos, asegurar el rendimiento de las leguminosas de manera ecológica (Asociación Ecología, Tecnología y Cultura en los Andes, 2004).

Los biofertilizantes microbianos representan un componente vital de los sistemas agrícolas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente justo, ambientalmente seguro y culturalmente aceptables, para reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos mediante la utilización de microorganismos del suelo debidamente seleccionados.

Por tanto, resulta conveniente explotar la fertilización biológica, como una alternativa natural, fácil de manejar, que permita conservar el ambiente, mejorar la sostenibilidad de los suelos y que su uso resulte rentable para el agricultor de la región.

## **1.4. ALCANCES Y LIMITACIONES**

### **1.4.1. Alcances:**

- Se determinó el efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium etli* en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo.
- Se obtuvo un tratamiento que generó un mayor efecto en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita), utilizando un biofertilizante orgánico.

### **1.4.2. Limitaciones:**

- Aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium* sp. que nodulen vainita en la región Tacna.
- Aplicación de inoculante líquido sin adherente en semillas de vainita.
- Presencia de mosca blanca por ser la región Tacna zona endémica de esta plaga.
- Presencia de enfermedades fúngicas por el descenso de la temperatura, aumento de humedad y presencia de lloviznas al final de la producción de vainita.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la concentración del biofertilizante *Rhizobium etli* en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo.

### **1.5.2. Objetivo específicos**

- Determinar el efecto de *Rhizobium etli* en el rendimiento de *Phaseolus vulgaris* L.
- Determinar el efecto de *Rhizobium etli* en la calidad de *Phaseolus vulgaris* L.
- Determinar el efecto de *Rhizobium etli* en la rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L.
- Establecer el tratamiento más efectivo que genere un mayor efecto en el rendimiento, calidad y rentabilidad *Phaseolus vulgaris* L. (vainita).

## **1.6. HIPÓTESIS**

La concentración más efectiva es de  $10^9$  cel/ml del biofertilizante *Rhizobium etli* que produce una mayor rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO**

##### **2.1.1. En el ámbito internacional**

Miyadi & López (2013) realizaron la investigación: “Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre una variedad local de *Phaseolus vulgaris* L., en Valladolid, edo. Aragua”, demostraron que la combinación de *Rhizobium* y cepa solubilizadora de fósforo mostró un mejor desempeño, evidenciando su potencial para ser utilizado en forma combinada como biofertilizante en este cultivo. Las dosis aplicadas en el experimento fueron a razón de 2 l/ha.

UE (Unión Europea), Gobierno de Nicaragua y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2011), presentaron el informe titulado “Resultados de parcelas comparativas con uso de inoculante (Nitronat) en frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (con uso de inoculante vs. sin inoculante)”, concluyeron que es totalmente evidente que la utilización de Nitronat, mejora considerablemente el rendimiento del cultivo de frijol común en diferentes ecosistemas

agrícolas, aun cuando existieron problemas derivados por efectos del cambio climático (sequía), los resultados económicos obtenidos indicaron que es una operación sumamente rentable. Se obtuvieron incrementos promedios de hasta 30% en la producción; la dosis empleada fue a razón de 572 g/ha.

Díaz & Varona (2011), realizaron la investigación denominada “Comparación de la eficiencia de dos cepas de *Rhizobium phaseoli* sobre los rendimientos de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la EEVT de Camagüey”, reportaron que la cepa CIAT-899 de *Rhizobium phaseoli*, manifestó mayor efectividad en el vigor de las dos variedades de frijol común utilizadas, así como también sobre los rendimientos. El estudio demostró que existen diferencias en la eficiencia de la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico de una cepa a otra específica para el grupo del frijol *Phaseolus*.

Torres, Soria, Pérez & García (2002) realizaron una investigación sobre incrementos en la fijación biológica de N<sub>2</sub> atmosférico en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la inoculación combinada de bacterias diazotróficas. Los resultados arrojaron un incremento significativo respecto a todas las variables evaluadas con el uso de las combinaciones microbianas, destacándose la dosis de *Rhizobium* a razón de 150 g

combinada con *Azotobacter*, la cual aumentó significativamente el rendimiento respecto a la inoculación con *Rhizobium* a razón de 70 g y el testigo, y no difirió estadísticamente con la fertilización mineral. Por lo que se recomienda, según los altos niveles de  $P_2O_5$  y  $K_2O$  en este suelo, utilizar como alternativa de fertilización la inoculación combinada de *Rhizobium* y *Azotobacter* a razón de 150 g/kg de semilla, implicando aumentos en los rendimientos, reducción en los costos de producción y la contribución al saneamiento ambiental.

Mora (1995), realizó una investigación sobre “Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica”, trabajó con una concentración de  $10^9$  cel/ml. Las plantas inoculadas con cepas seleccionadas presentaron los mayores valores de peso seco de nódulos; se observaron diferencias significativas entre algunos de los tratamientos y testigos; las plantas inoculadas que presentaron las mayores concentraciones de ureídos, fueron las que mostraron la mayor capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en el invernadero.

### **2.1.2. En el ámbito nacional**

Soriano & González (2012) evaluaron el efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre el crecimiento vegetal de pprika, *Capsicum annuum*

var. Longum y lechuga *Lactuca sativa*, encontrando que esta inoculación incrementa significativamente las cinco variables agronómicas como: altura de plántulas, tamaño de hojas, peso de la materia seca de la parte aérea, peso de la materia seca de la parte radicular y peso de la materia seca total de las plantas a los veinte días postinoculación.

Silvera, Zúñiga & Loli (2005) realizaron una investigación denominada: “Capacidad solubilizadora del fósforo por cepas de *Rhizobium*, aisladas de los nódulos del frijol caraota (*Phaseolus vulgaris* L.)”, encontraron cepas de *Rhizobium* sp, solubilizadoras de fósforo aisladas de nódulos de frijol caraota nativas de Huachipa. Asimismo hubo interacción entre cepas de *Rhizobium* sp. fijadoras de nitrógeno y las solubilizadoras de fósforo.

Vélez (1999) de la Asociación Civil Labor Moquegua, a través del “Programa de Desarrollo Agroecológico del Valle de Moquegua”, realizó un manejo agroecológico para el cultivo de vainita, utilizando guano de isla y el inoculante comercial “Rhizolam”, obtuvo un rendimiento de 8412 Kg/ha; la dosis de aplicación fue de 650 g de inoculante en 300 kg de humus.

### **2.1.3. En el ámbito local**

Medina (2012) realizó la tesis de pregrado denominada: “Efecto del compost inoculado con bacterias de los géneros *Azotobacter* y

*Novosphingobium* fijadoras de nitrógeno en el rendimiento del olivo (*Olea europaea* L.) en La Yarada–Tacna- 2011-2012”, demostrando la diferencia entre los rendimientos siendo el mejor la fertilización química, también se encontró que los mejores niveles de nitrógeno en suelo y mejores calibres fueron del tratamiento con aplicación de 48 Kg de compost mejorado por olivo y con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Grajeda (2008) realizó la tesis de pregrado titulada: “Aislamiento y selección de cepas nativas de *Rhizobium* spp. con mayor capacidad de biofertilizante en *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) de Los Palos –Tacna”, aislando diez cepas de *Rhizobium* spp. nativas, de las cuales dos tuvieron mayor capacidad biofertilizante. Este trabajo se realizó a nivel de invernadero y se inoculó  $2 \times 10^9$  UFC/ml (Unidad Formadora de Colonia) en las semillas de vainita.

Se ha realizado una investigación en la “Evaluación de la fertilización con *Azotobacter chroococcum*, compost y fertilizante químico en la productividad y calidad de *Lycopersicon esculentum* Mill var. Río Grande tomate en condiciones de campo”, concluyéndose que el biofertilizante solo produjo un efecto significativamente mayor en el rendimiento y calidad del fruto del tomate en comparación con el compost y el fertilizante químico. Además el *Azotobacter chroococcum* + fertilizante químico

combinado produjeron un efecto significativamente mayor en la productividad y calidad del fruto de tomate en comparación con otros tratamientos (Ancco, 2007).

Chipana (2003) realizó la tesis de pregrado denominada: “Optimización de parámetros para la producción de *Rhizobium meliloti* en una fermentación discontinua”, donde obtuvo una máxima producción de  $2,53 \times 10^9$  cel/ml. Los valores óptimos de temperatura y aireación obtenidos fueron: 30°C y 1 vvm, respectivamente.

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. Fijación biológica de nitrógeno**

A pesar de que el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) se encuentra en la atmósfera en una concentración de casi el 80%, ni plantas ni animales tienen una forma fácil para obtener el nitrógeno suficiente para su crecimiento. Esta situación se hace aún más crítica ya que el  $N_2$  es una molécula muy estable químicamente y de esta forma no está disponible para la mayoría de los organismos vivos. Éste debe ser fijado antes que pueda ser asimilado. Las formas más comunes de encontrar el nitrógeno fijado es en forma de iones amonio y nitrato. La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción de nitrógeno molecular a amonio (Newton, Fisher & Leigh, 2002).

En la naturaleza existen dos formas de fijar nitrógeno. Un mecanismo es mediante energía lumínica en la cual la enorme cantidad de luz ioniza las moléculas en la atmósfera y las hace aptas para combinarse y formar óxidos de nitrógeno. Estos óxidos de nitrógeno se disuelven en la lluvia y forman nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ), los cuales son llevados a la tierra. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de energía lumínica alrededor del mundo, ésta no es una forma efectiva de producir compuestos nitrogenados que puedan ser utilizados por plantas y animales. Esta forma de fijación de nitrógeno atmosférico probablemente contribuye con el 10% del total anual fijado (Newton, Fisher & Leigh, 2002).

La forma más importante de nitrógeno fijado deriva de la actividad de ciertas bacterias del suelo que absorben nitrógeno atmosférico y lo convierten en amonio. Algunas de estas bacterias son libres en el suelo y se alimentan de materia orgánica muerta. Los microorganismos que llevan a cabo este proceso se denominan diazotrofos (Lloret & Martínez-Romero, 2005). Otras bacterias fijadoras de nitrógeno, son encontradas creciendo en asociación con las raíces de plantas mayores. Las plantas suplen a la bacteria con la energía para crecer, mientras que la bacteria suple a la planta con nitrógeno fijado. Los procesos biológicos contribuyen con alrededor del 65% de la producción anual de nitrógeno fijado. Mientras que la síntesis comercial de amonio es otra forma diferente de

fijar nitrógeno y contribuye aproximadamente con el 25% del total de nitrógeno fijado anualmente; sin embargo, sigue siendo éste un proceso ambiental y energéticamente costoso (Newton, Fisher & Leigh, 2002).

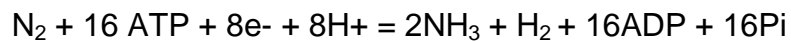
#### **2.2.1.1. Organismos fijadores de nitrógeno**

Sólo los procariotas pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno-FBN. La habilidad para fijar  $N_2$  es ampliamente usada entre varios géneros de bacterias, además existen una altísima variedad metabólica entre microorganismos que tienen esta capacidad. Se distinguen tres formas de FBN: por medio de asociaciones simbióticas, simbiosis asociativas y bacterias de vida libre (Newton, Fisher & Leigh, 2002).

La enzima responsable de la fijación de nitrógeno se denomina nitrogenasa y está compuesta por dos metaloproteínas, una con Fe (ferroproteína o nitrogenasa reductasa) y otra con Fe y Mo (ferromolibdoproteína o nitrogenasa propiamente dicha) como grupos activos (De Felipe, 2006).

La fijación biológica de nitrógeno se trata de un proceso altamente consumidor de energía. El triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno es duro de romper, el trabajo lo lleva a cabo la nitrogenasa con

el consumo de 16 moléculas de ATP por N<sub>2</sub> reducido, según la ecuación (Olivares, 2008):



### **2.2.1.2. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa**

Es la asociación mutualista de rhizobia y leguminosas ha sido desde siempre la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos partícipes son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz. Los nódulos son órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular por parte de los rhizobia y de las plantas (Gibson, Kobayashi, Walker, 2008).

El nódulo fija nitrógeno atmosférico mediante la enzima nitrogenasa situada en los bacteroides. El N<sub>2</sub> es transformado en NH<sub>3</sub> por esta enzima que posteriormente pasará a ureidos o amidas según el tipo de planta y será transportado por los vasos conductores a la parte aérea. El oxígeno es uno de los factores limitantes en el proceso y para su regulación el nódulo dispone de diferentes mecanismos, entre ellos la leghemoglobina

que transporta el oxígeno a las bacterias transformándose en oxihemoglobina, y libera el oxígeno a medida que es necesitado, manteniéndose una atmósfera microaeróbica, ya que la nitrogenasa se inactiva por exceso de O<sub>2</sub> (Frioni, 2001).

Se estima que la entrada total anual a los ecosistemas terrestres producto de la fijación biológica de nitrógeno, está en el rango de 139 a 170 millones de toneladas de nitrógeno, con asociación simbiótica en tierras de cultivo alrededor de 25-30% (35 a 44 millones t N) (Burns & Hardy, 1975).

### **2.2.1.3. Etapas de la formación de nódulos**

El establecimiento de una simbiosis rhizobia-leguminosa eficiente conlleva una serie de etapas:

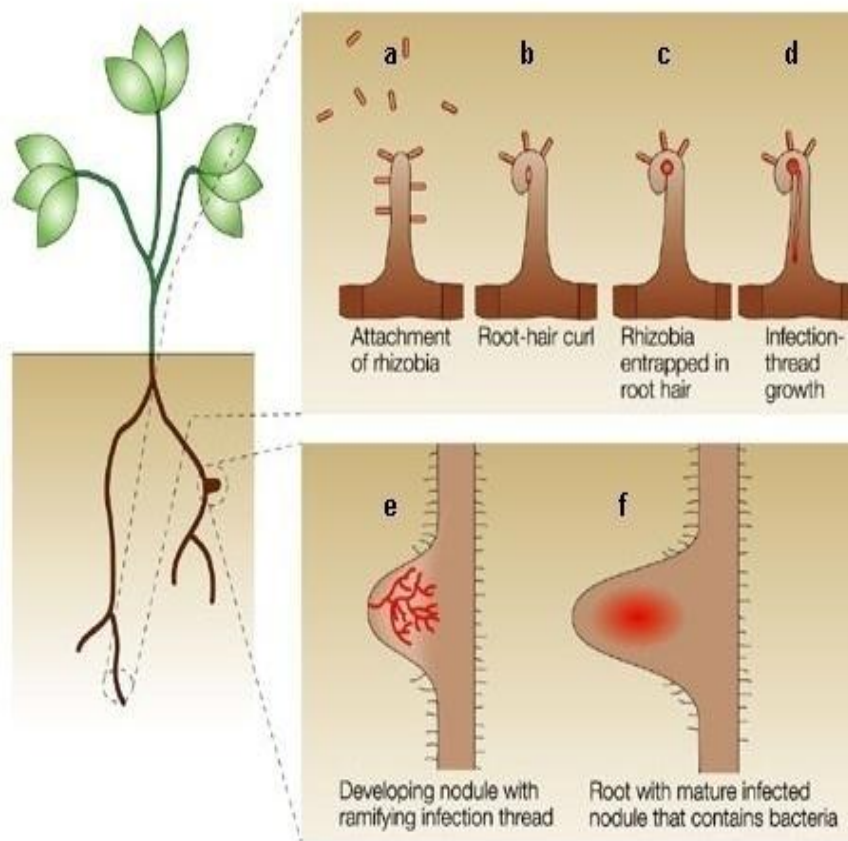
- a) Reconocimiento de la pareja adecuada, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales.
- b) Invasión del pelo radical y formación de un tubo radical por parte de la bacteria.
- c) Desplazamiento hacia la raíz principal a través del tubo de infección.
- d) Aparición de células bacterianas deformes llamadas bacteroides, dentro de las células de la planta y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.

e) Proceso continuado de división de las células bacterianas y vegetales y formación del nódulo radical maduro.

El primer paso para la formación de nódulos es la adherencia de la bacteria *Rhizobium* a la planta leguminosa. En la superficie de todas las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se localiza una proteína específica de la adherencia, la ricadesina. Es una proteína que se une al calcio y puede actuar captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen la función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de los pelos radicales y en la superficie de las células de *Rhizobium*. Después de la unión los pelos radicales se enroscan debido a la acción de unas sustancias secretadas por la bacteria, que se conocen como factores Nod. La bacteria penetra entonces el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de celulosa conocido como tubo de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo.

Las bacterias se multiplican rápidamente en el interior de las células vegetales y se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y

deformes, llamadas bacteroides, los cuales quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos, por porciones de la membrana de la célula vegetal, llamada membrana peribacteroidal. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que no se han formado los bacteroides. Cuando la planta muere, el nódulo se deteriora y las bacterias pasan al suelo. Las formas bacteroides no tienen capacidad de división, pero contienen siempre algunos bacilos en estado de latencia. Estas formas bacilares proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo (Madigan, Martinko & Parker, 2002).



**Figura 1.** Formación de un nódulo radical en una leguminosa afectada por *Rhizobium*

Fuente: Nature

Esquema de la formación del nódulo en leguminosas. a) Adhesión de los rizobios al pelo radicular. b) Enrollamiento del ápice del pelo radicular. c) Inducción de la formación del canal de infección. d) Canal de infección formado. e) Infección de los espacios intercelulares de la raíz e inducción de la formación del nódulo. f) Nódulo formado.

#### **2.2.1.4. Factores limitantes en la nodulación**

Los factores que afectan la sobrevivencia de la bacteria en el suelo y aquéllos que afectan la nodulación, son sin duda decisivos en el éxito de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. El rendimiento potencial de esta simbiosis se encuentra limitado por diferentes factores físico-químicos, derivados del medio y factores biológicos (Cunningham & Walker, 1991).

Las limitaciones impuestas por el medio tienen origen en el suelo y el clima. La acidez, la presencia de metales pesados (Al, Mn) bajas concentraciones de fósforo y potasio, el exceso de sal y altos niveles de nitrógeno combinado son los principales factores naturales del suelo a considerar. La simbiosis es más sensible a temperaturas extremas, bajas temperaturas retardan la infección y formación de nódulos, en tanto que altas temperaturas provocan nódulos poco eficientes. El rango óptimo para formación de nódulos se encuentra entre 18°C y 29°C (Grant & Long, 1989).

El uso indiscriminado de herbicidas, fungicidas, la acumulación de metales pesados en suelos y agua resulta perjudicial para el rizobio. Entre los factores biológicos que limitan la nodulación se encuentran los productos de la fotosíntesis, ésta provee energía y poder reductor para la fijación de N<sub>2</sub> y los esqueletos carbonados para la formación de aminoácidos, amidas, fuentes de N<sub>2</sub> para la leguminosa (Alexander, 1994).

### 2.2.2. Los rhizobia

También conocidos como rizobios, son microorganismos capaces de establecer simbiosis con leguminosas y engloban actualmente a una gran variedad de bacterias. El conocimiento de la existencia de estos microorganismos data de finales del siglo XIX cuando, por primera vez, Frank en 1889 denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas. Los rhizobia, pertenecen a las  $\alpha$ -Proteobacteria e incluidos en la actualidad en cinco géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Moulin, Munive, Dreyfus & Boivin-Masson, 2001).

Los rhizobia “clásicos” se incluyen actualmente en el orden *Rhizobiales* (Kuykendall, 2005) y se encuentran distribuidos en varias familias. Los antiguos géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Allorhizobium* se han fusionado en un solo género y actualmente todas sus especies se incluyen en el género *Rhizobium* (Young, Kuykendall, Martínez-Romero, Kerr & Sawada, 2001). Este género junto con el género *Sinorhizobium* que ha pasado a denominarse *Ensifer* (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008) y con el nuevo género *Shinella* (An, Im, Yang & Lee, 2006) se incluye en la familia *Rhizobiaceae*. Los géneros *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* se han incluido en una

nueva familia denominada *Phyllobacteriaceae* (Mergaert & Swings, 2005). El género *Azorhizobium* que forma nódulos en tallos de *Sesbania* se incluye en la familia *Hyphomicrobiaceae*. Finalmente, el género *Bradyrhizobium* se incluye en la familia *Bradyrhizobiaceae*. Actualmente el género *Rhizobium* contiene 34 especies (Kuykendall, 2005).

Según Holt, Krieg, Sneath, Sfaley & Williams (1994) en el Bergey's Manual de Determinación Bacteriológica, a esta bacteria se le clasifica de esta manera:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Proteobacterias alpha

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Rhizobium*

Especie: *Rhizobium etli*

#### **2.2.2.1. Descripción macroscópica y microscópica**

Los rizobios son bacterias gramnegativas de forma bacilar (0,5-0,9 x 1,2–3,0 µm), aerobios, móviles por flagelos peritricos o polares, no producen esporas, se reproducen por simple división celular. Comúnmente son capaces de crecer bien a bajas concentraciones de oxígeno (Jordan, 1984; Martínez & López, 1999).

Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en Agar Levadura Manitol (ALM). El crecimiento en medio con carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Pronunciada turbidez se desarrolla de 2-3 días en caldo aireado o agitado (Kuykendall, Young, Martínez, Kerr & Sawada 2005).

#### **2.2.2.2. Metabolismo**

Aeróbicos, poseen un metabolismo tipo respiratorio con oxígeno como aceptor terminal de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30°C; algunas especies pueden crecer a 40°C. El pH óptimo de crecimiento está entre 6,0 y 7,0, sin embargo, pueden crecer entre valores de 4,0 y 10,0. El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* está entre 1,5-5,0 horas (Kuykendall *et al.*, 2005).

s quimiorganoheterótrofo, utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción ácida en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas

requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato o ácido nicotínico. La peptona es pobremente utilizada, mientras que la caseína, el almidón, la quitina y el agar no son hidrolizadas. Los principales mecanismos para el catabolismo de la glucosa son la vía de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato (Kuykendall *et al.*, 2005).

### **2.2.2.3. Genética**

Uno de los más importantes cultivos en América Latina es el frijol común el cual es nodulado principalmente por *Rhizobium etli*. Se ha reportado que la secuencia del genoma completo de *Rhizobium etli* corresponde a 6 530 228,00 pb, seis grandes plásmidos comprenden un tercio del tamaño total del genoma. El cromosoma codifica la mayoría de funciones necesarias para el crecimiento celular, mientras que unos pocos genes esenciales o vías metabólicas completas son localizados en plásmidos. Se indica además que los plásmidos no son elementos completamente prescindibles (González *et al.*, 2005).

Regiones fácilmente amplificadas en genomas de *Rhizobium* sp. llamadas amplicones controlan tanto la adaptabilidad como las interacciones biológicas. Como éstas llegan a ser mejor definidas a través del mapeo y secuenciación del ADN, su estructura puede ser de particular interés. Con respecto al ADN extracromosomal, los rhizobia pueden tener tanto

plásmidos como megaplásmidos que pueden llegar a los 1600 Kb y pueden constituir hasta el 50% del genoma total (Kuykendall *et al.*, 2005).

#### **2.2.2.4. Características simbióticas de los rhizobia**

La caracterización simbiótica consiste en el análisis de la infectividad y de la efectividad de los rhizobia, así como el estudio de marcadores genéticos relacionados con la simbiosis, como los genes de nodulación (*nod*) o de fijación (*nif*) (Eardly, Young & Selander, 1992; Haukka, Lindstrom & Young, 1998). Los genes simbióticos están incluidos en islas simbióticas (Sullivan *et al.*, 2002) o en plásmidos y combinaciones de todos ellos (Sorensen, Bailey, Hansen, Kroer & Wuertz, 2005) y se ha demostrado que muchos de estos elementos genéticos se transmiten frecuentemente por transferencia horizontal mediante mecanismos de conjugación, transducción o transformación (Sessitch, Howieson, Perret, Antoun & Martínez-Romero, 2002).

La transferencia de genes simbióticos a bacterias no simbióticas que se encuentran en la rizósfera, puede dar origen a nuevas cepas capaces de nodular (Ochman & Morán, 2001; Sullivan, Heather, Lowther Scott & Ronson, 1995), lo cual podría explicar la gran diversidad en el fondo genético de las especies con capacidad para nodular leguminosas y el hecho de que bacterias próximas a aquéllas que nodulan no tengan esta

capacidad (Brom, García de Los Santos, Cervantes, Palacios & Romero, 2000).

#### **2.2.2.5. Los rhizobia que forman simbiosis con *Phaseolus vulgaris* L.**

El género *Phaseolus* incluye algunas de las leguminosas más promiscuas en lo que se refiere al elevado número de rhizobia con los que son capaces de establecer simbiosis efectivas. Esta capacidad de ser noduladas por una elevada variedad de bacterias se ha relacionado con el espectro de inductores de genes de nodulación que secretan, considerándose *P. vulgaris* como una de las leguminosas que libera mayor cantidad y variedad de flavonoides, exudados tanto por la raíz como por la semilla (Morón, Dardanelli, Sousa & Megías, 2006).

Los principales endosimbiontes americanos de *P. vulgaris* son *Rhizobium etli*, *R. phaseoli* y *R. tropici* (Martínez-Romero, Segovia, Mercante, Franco, Graham & Pardo, 1991; Segovia, Young & Martínez-Romero, 1993; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) aunque en México se ha encontrado *Rhizobium gallicum* (Silva, Vinuesa, Eguiarte, Martínez-Romero & Souza 2003). *R. leguminosarum*, que es la especie tipo del género *Rhizobium*, ha sido recientemente revisada (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008) y contiene biovariedades que nodulan diferentes leguminosas; una de ellas denominada *phaseoli*, es capaz de formar nódulos muy efectivos en alubia

en suelos europeos (García-Fraile, Mulas-García, Peix, Rivas, González-Andrés, & Velázquez, 2010). En cuanto al género *Ensifer* (anteriormente denominado *Sinorhizobium*) contiene dos especies capaces de formar nódulos efectivos en alubia, *S.meliloti* y *S. fredii* (Mhamdi, Laguerre, Aouani, Mars & Amarger, 2002; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2009).

### **2.2.3. Biofertilizantes o inoculantes rizobianos**

Son formulaciones comerciales que contienen rizobios, para ser aplicados a la semilla o al suelo durante la plantación. Está estimado que aproximadamente 2000 toneladas de inoculantes son producidos anualmente en el mundo, una cantidad suficiente para inocular 20 millones de hectáreas de leguminosas. La gran mayoría casi el 50% son producidos en Estados Unidos de América. Los inoculantes son usualmente comercializados en presentación sólida, en polvo como turba o en formas granuladas, o como inoculante líquidos en formulaciones de caldo. Los métodos de inoculación dependen del tipo de inoculante, los polvos y los líquidos son generalmente aplicados sobre las semillas, mientras que los inoculantes granulares son aplicados directamente al suelo (Ben Rebah *et al.*, 2007).

El medio estándar incluye manitol como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales, han sido empleados para la producción a escala de laboratorio,

pero este uso es limitado a escala industrial debido a su alto costo. Entre los soportes que pueden tener altos niveles de rizobios, la turba es la más empleada pero no está universalmente disponible. De forma alterna diferentes materiales tales como subproductos industriales, arcillas, perlita y residuos agroindustriales han sido evaluados para el crecimiento de rizobios. Esto con el fin de disminuir los costos durante los procesos de producción de inoculantes, con el fin de que las tecnologías generadas lleguen a un bajo valor económico al agricultor (Ben Rebah *et al.*, 2007).

#### **2.2.3.1. Características y concentración de un buen inoculante**

Un inoculante debe contener un número alto de bacterias viables específicas para la leguminosa a ser cultivada. Los estándares mínimos de inoculantes varían según el país. Inoculantes con concentraciones de por lo menos  $10^8$  y  $10^9$  bacterias por gramo de producto fresco son sencillos de producir usando métodos industriales, pero es importante que el inoculante no sea expuesto a temperaturas mayores de 30-35°C durante el transporte y almacenamiento (FAO, 1995).

#### **2.2.4. Cultivo de vainita**

##### **2.2.4.1. Origen del frijol**

El conjunto de conocimientos recabados hasta hoy, como la edad de restos fósiles y características morfológicas, agronómicas y genéticas,

establecen que el frijol común se originó en Mesoamérica y posteriormente se domesticó entre los 5000 y 2000 años a. C. en dos sitios del continente Americano: Mesoamérica (México y Centroamérica) y los Andes (Sudamérica).

A partir del frijol silvestre se formaron dos acervos genéticos domesticados distintos, Mesoamericano y Andino. El uso de nuevas herramientas biotecnológicas y genómicas han ofrecido evidencias definitivas sobre el origen, domesticación y diversidad de *P. vulgaris* (Hernández-López, Vargas-Vázquez, Muruaga-Martínez, Hernández-Delgado & Mayek-Pérez, 2013).

#### **2.2.4.2. Taxonomía**

Según el Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (2011) la clasificación de la vainita es la siguiente:

Reino: Plantae (plantas)

Subreino: Viridaeplantae (plantas verdes)

Infrareino: Streptophyta (plantas terrestres)

División: Tracheophyta (traqueofitas, plantas vasculares)

Subdivisión: Spermatophytina (plantas de semilla, espermatofitas)

Infradivisión: Angiospermae (angiospermas, plantas con flores)

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosanae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae (legumbres, guisantes)

Género: *Phaseolus* (frijol, frijol silvestre)

Especie: *Phaseolus vulgaris* (frijol)

Nombre común: Vainita, poroto verde

Variedad: Jade

#### **2.2.4.3. Morfología**

- **Raíz**

El sistema radicular está formado inicialmente por la radícula, la cual se convierte luego en la raíz principal o primaria. La raíz principal es fácilmente identificable por su diámetro y su posición a continuación del tallo. Posteriormente, emergen las raíces secundarias, especialmente en la parte alta de la raíz principal, dispuestas en forma de corona. Las raíces terciarias se forman lateralmente sobre las secundarias y las cuaternarias lo hacen sobre terciarias. Se pueden observar raíces de orden superior a las mencionadas.

Finalmente, en las partes más jóvenes de las raíces se encuentran los pelos absorbentes, los que cumplen una función muy importante en la absorción de agua y nutrientes. Puede presentar nódulos de forma poliédrica y diámetro aproximado de 2-5 mm son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan nitrógeno atmosférico (Toledo, 2003).

- **Tallo principal**

Es herbáceo, de sección cilíndrica o levemente angular. En variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 cm (Faiguenbaum, 1993). El diámetro del tallo principal es mayor que el de las ramas laterales. El tallo tiende a ser vertical, con variaciones según el hábito de crecimiento del cultivar (Toledo, 2003).

El hábito de crecimiento determinado implica que el número de nudos existentes en el tallo principal sea limitado; el último nudo es el que se forma en el punto de inserción en la última hoja trifoliada. En las plantas de crecimiento indeterminado, el número de nudos es teóricamente ilimitado (Toledo, 2003).

- **Ramas axilares y complejos axilares**

Los componentes de la ramificación son el número de ramas y el número de nudos en cada rama. La ramificación se inicia en un nudo,

generalmente en la axila de una hoja trifoliada; si bien, puede existir también en los dos primeros nudos del tallo principal.

- **Hojas**

Sencilla, lanceolada y acuminada de tamaño variable según la variedad. En sus primeros estados de desarrollo presenta un par de hojas cotiledónicas, para después formar las hojas verdaderas que son compuestas formadas por tres folíolos (trifoliadas) (Faiguenbaum, 1993).

- **Flores e inflorescencias**

La flor de la vainita es una típica papilionácea, de simetría bilateral (Toledo, 2003). Puede presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes la flor es blanca (Faiguenbaum, 1993). Las inflorescencias son racimos de posición lateral o terminal.

- **Fruto**

El fruto es una legumbre o vaina de color verde claro, plana, de dimensiones variables, en cuyo interior se disponen 4-6 semillas. Existen frutos de color verde, verde oscuro, etc. (Faiguenbaum, 1993). La longitud de las vainas depende del cultivar, fluctuando entre 7 y 20 cm o más (Toledo, 2003).

#### **2.2.4.4. Factores agroclimáticos**

- **Temperatura**

Técnicamente, la vainita es un cultivo de verano o estación cálida. El crecimiento y rendimiento de esta hortaliza son óptimos en condiciones de temperatura moderadamente cálidas (18-29°C). Períodos excesivamente calurosos, con temperaturas superiores a los 32°C, así como también las lluvias fuertes, ocasionan la caída de flores y frutos. Temperaturas menores a 15°C retardan el desarrollo del cultivo.

Esta hortaliza no tolera heladas; asimismo, el desarrollo vegetativo y reproductivo y la calidad del producto son afectados seriamente por temperaturas de 10°C o menores (Toledo, 2003).

- **Luz**

Es un factor que no constituye una limitación crítica para el normal desarrollo del cultivo. La inducción, diferenciación floral y desarrollo de la vaina ocurren independientemente de la duración del día o fotoperíodo, es decir, es una planta fotoperíodicamente neutra. Excelentes rendimientos en lo referente a cantidad y calidad del producto, se logran en condiciones de baja luminosidad como las de la costa central (Toledo, 2003).

- **Suelo**

Si bien este cultivo se adapta a distintos tipos de suelos los mejores son los de textura franca, bien drenados y con buen contenido de materia orgánica. Suelos pesados, cuyas superficies se endurecen excesivamente luego del riego, causan fallas en la germinación al dificultar la emergencia de las plántulas.

El rango óptimo de pH es de 5,5 a 6,5 lo cual indica que es medianamente tolerante a la acidez del suelo; asimismo, excelentes cosechas se obtienen en suelos de reacción alcalina como los de la costa. La vainita es un cultivo muy sensible a la salinidad del suelo, siendo seriamente afectada por el exceso de boro (Toledo, 2003).

- **Agua**

Debido a su condición de planta mesofítica, la vainita requiere disponer permanentemente de agua de buena calidad, para la obtención de máximos rendimientos. La presencia de salinidad o de elementos tóxicos en el agua de riego afecta drásticamente el rendimiento de este cultivo. Es sensible a la toxicidad por exceso de boro en el agua, cuando este elemento supera el nivel de 0,5-1 ppm (Toledo, 2003).

#### **2.2.4.5. Fertilización**

Un adecuado abastecimiento de nutrientes es indispensable para lograr una buena cosecha de calidad exportable. En tal sentido, la determinación de la dosis de fertilización más conveniente para el cultivo debe basarse en los resultados de un análisis de suelo.

Una dosis de 70-80-80 puede servir de referencia para suelos de la costa. En suelos medianamente fértiles o cuando este cultivo se siembra luego de otros que han sido intensamente fertilizados, puede ser suficiente sólo la aplicación de 60 Kg de N/ha. Adicionalmente hay que asegurar un adecuado abastecimiento de micronutrientes, como el manganeso, el zinc son abastecidos mediante la aplicación de fungicidas. La vainita es particularmente sensible a la carencia del zinc, molibdeno, manganeso y cobre; siendo además muy afectada por exceso de boro y cloro (Toledo, 2003).

#### **2.2.4.6. Cosecha**

El cultivo está listo para ser cosechado cuando las vainas se encuentran bien conformadas, sin constricciones evidentes entre las semillas las que deben ser pequeñas e inmaduras. Además, las vainas no deben ser fibrosas partiéndose fácilmente cuando se doblan. La presencia de semillas desarrolladas y vainas grandes son signos de sobremaduración.

El inicio de la cosecha es a los 55-70 días después de la siembra, la duración es de 2-3 semanas. La frecuencia de la cosecha varía con la época del año, pudiendo ser cada 2-5 días y en invierno de 7-10 días. La cosecha se realiza a mano y se requiere de cuidado para no dañar la planta, en especial las vainas que aún no están en estado de cosecha (Toledo, 2003).

#### **2.2.4.7. Producción y rendimiento de vainita en el Perú**

Según la Dirección Regional Agraria Lima del MINAG, la producción de vainita en el Perú fue de 15 947,78 t (MINAG, 2012). En el Perú, el cultivo de vainita está bastante difundido en las zonas de la costa y sierra, estimándose un total de 1500 hectáreas con esta hortaliza. El rendimiento óptimo comercial en nuestro medio está entre 8 000 - 14 000 kg/ha (Ugás, Siura, Delgado de la Flor, Casas & Toledo, 1998); sin embargo, el rendimiento promedio nacional es sólo de 5,3 t/ha, siendo el departamento de Moquegua el de mayor rendimiento promedio con una producción de 7,3 t/ha (Ministerio de Agricultura, 1999). En la variedad Jade se ha obtenido rendimientos de 7,12; 5,18 y 3,24 t/ha en Lima, dependiendo del sistema de producción del cultivar (Loayza & Siura, 2006).

#### **2.2.4.8. Calidad de la vainita**

La vainita es una hortaliza, rica en fibra, proteína y fierro. En cuanto a sus características físicas organolépticas deben tener sección transversal redonda con forma de lápiz, sin embargo, pueden ser de forma alargada y ahuesada, sin sinuosidades superficiales, típica del cultivar, con una madurez comercial conveniente. Además la vainita deberá presentar un aspecto fresco, brillante, sin síntoma de marchitez o lignificación. El color debe ser verde típico de la especie, exento de humedad exterior anormal, sin materiales extraños (hojas, flores, etc.) y de acuerdo a las condiciones requeridas para su comercialización en estado fresco y con semillas de color blanco.

El peso de la vainita varía de 7 a 10 g según la relación con el tamaño de la misma. En cuanto a la presencia de los plaguicidas, éstos no deben exceder los límites máximos permitidos internacionalmente. Las vainitas se clasifican en tres categorías de calidad: calidad extra, primera y segunda (Sociedad Nacional de Industrias, 2012).

Los parámetros de calidad de la vainita que se evalúan en campo pueden ser entre otros: el peso, largo y diámetro promedio de vainas (Barrios & Siura 1999). Asimismo, los análisis químicos y nutricionales que se realizan a la vainita son: acidez, proteína, fibra, cenizas, carbohidratos,

grasa, pH, humedad, minerales (potasio, calcio, fósforo) y vitaminas (C) (Vela, 2010).

**Tabla 1.**

Composición nutritiva de la vainita en 100 g de producto comestible

Componente	Cantidad	Unidad
Calorías	37,0	cal
Agua	88,2	g
Proteínas	2,4	g
Carbohidratos	8,1	g
Fibra	2,3	g
Cenizas	1,0	g
Calcio	88,0	mg
Fósforo	49,0	mg
Hierro	1,4	mg
Vitamina A	317,0	UI*
Vitamina B1	0,07	mg
Vitamina B2	0,2	mg
Niacina	0,71	mg
Vitamina C	9,6	mg

\*Unidades internacionales

Fuente: Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)-Cultivos Hortícolas, 1980.

#### **2.2.4.9. Usos de la vainita**

**Vaina verde** se consume como verdura en sopas, ensaladas, para acompañar carnes y huevos, entre otros.

**Vaina procesada** se puede empacar fresca, entera o cortada, congelarse, hacerse encurtidos y enlatarse.

**Semillas maduras** se consumen frescas, por su alto contenido de proteínas.

**Otros** usos son las hojas jóvenes que se consumen en ensaladas y los desechos de cosecha se utilizan para alimentación animal (Font Quer, 1969).

#### **2.2.5. Rentabilidad**

La rentabilidad empresarial es sinónimo de ganancia, utilidad, beneficio. Se trata de un objetivo válido para cualquier empresa, ya que a partir de la obtención de resultados positivos ella puede mirar con optimismo no sólo su presente, que implica la supervivencia, sino también su futuro: es decir, el desarrollo de la organización en el tiempo.

Con esta perspectiva, la rentabilidad asegura el presente empresarial, el aquí y el ahora, y al mismo tiempo provee a su desarrollo futuro. Los

elementos que componen la rentabilidad son básicamente el precio de venta (el “techo” o la recompensa por comercializar el producto y el costo (el “piso” o el sacrificio que hay que hacer para fabricar y vender ese producto). Como consecuencia de la concurrencia de ambos factores, precio de venta y costo, se obtiene el resultado que para respetar el criterio de rentabilidad debiera ser positivo, aunque muchas veces no lo sea.

Como resultados positivos, entonces, las organizaciones con fines de lucro “continúan en carrera”, algunas mejor que otras, tras los objetivos de perdurar y crecer. Con resultados negativos, en cambio, no solo no se tiene seguridad sobre el presente, sino que tampoco existe una clara visión sobre el futuro (Faga & Ramos, 2006).

### **2.2.6 Marco legal**

La base legal del presente proyecto, está conformada por las normas nacionales vigentes. La política ambiental del Estado tiene como objetivo principal promover el equilibrio dinámico entre el desarrollo socio-económico y la protección del ambiente y los recursos naturales, para poder lograr el desarrollo sostenible. Los aspectos de protección

ambiental relacionados de manera directa o indirectamente a esta investigación se encuentran contenidos en la siguiente normatividad legal:

- Constitución Política del Perú
- Ley N° 28611 Ley General del Ambiente
- Ley N° 26842 Ley General de Salud
- Ley N° 29196 Ley de la Promoción Orgánica Ecológica
- D.S. 044-2006-AG Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos.

### **2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS**

- **Aerobios**

Organismo que crece en presencia de O<sub>2</sub>; puede ser facultativo estricto o microaerofílico (Madigan *et al.*, 2002).

- **Agricultura sostenible**

Es la agricultura considerada como un modelo de organización económico y social basado en una visión de desarrollo participativo y equitativo el cual reconoce el medio ambiente y los recursos naturales como la base de la actividad económica. La agricultura es sustentable cuando es ecológicamente segura, económicamente viable y socialmente justa (Altieri & Yurjevic, 1990).

- *Azotobacter*

Género de bacterias gramnegativas que habitan suelos rizosféricos (alrededor de las raíces) y aguas frescas, aerobios, son fijadores de nitrógeno de vida libre (Martínez & Martínez, 2000).

- *Bacillus*

Género que lo distinguen de otros Bacillaceae (todos formadores de endosporas) por su naturaleza aeróbica, que puede ser estricta o facultativa, forma de bastón, y producción de catalasa (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer & Stackebrandt, 2006).

- **Cepa**

Población descendiente de una única célula. Es la progenie o el subcultivo de una colonia única aislada de un cultivo puro (Madigan *et al.*, 2002).

- **Ciclo de pentosa fosfato**

Vía anabólica que utiliza una hexosa (glucosa) para generar azúcares de cinco carbonos (pentosas), necesarias para formar nucleótidos y equivalentes reducidos NADPH (Voet, Voet & Pratt, 2007).

- **Conjugación**

Transferencia de genes de una célula procariótica a otra por un mecanismo de contacto entre ellas. Se requiere que las dos células estén vivas (Madigan *et al.*, 2002).

- **Cromosoma**

Elemento genético, circular en procariotas, pero lineal en eucariotas, que lleva genes esenciales para la función celular (Madigan *et al.*, 2002).

- **Efectividad**

Es la habilidad para fijar nitrógeno de una cepa de rizobia (Silvester, Kipe & Harris, 1987).

- **Factores Nod**

Moléculas parecidas a la quitina secretadas por los rizobios, que inducen el rizado de los pelos radicales y desencadenan la división de la célula cortical de la planta, lo que determina la formación del nódulo (D'Haeze & Holsters, 2002).

- **Flavonoides**

Son compuestos polifenólicos que se encuentran en forma universal en plantas vasculares en forma de glicósidos (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Estimulan las simbiosis benéficas que culminan con la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Koes, Quattrocchio & Mol, 1994).

- **Flor papilionácea**

Con forma de mariposa, flores con corola amariposada en inflorescencias de tipo de racimo o espiga y con diez estambres, todos libres o todos unidos por sus filamentos, o bien uno libre y nueve unidos por sus filamentos; por ejemplo: el guisante, la retama y el algarrobo (Lexicoon, 2014).

- **Gen**

Es un segmento de ADN que codifica una proteína (vía mRNA), un tRNA o un rRNA (Madigan *et al.*, 2002).

- **Genoma**

Son todos los genes contenidos en una célula o un virus (Madigan *et al.*, 2002).

- **Hoja acuminada**

Hoja que se estrecha paulatinamente en un ápice alargado (Bailey, 1999; Font Quer, 1985).

- **Hoja cotiledónica**

Hoja embrionaria presente en la semilla; en las de las dicotiledóneas son dos y en los de las monocotiledóneas uno; en las plántulas de las dicotiledóneas son hojas que inicialmente realizan la fotosíntesis y resultan útiles para su identificación (Bailey, 1999; Font Quer, 1985).

- **Hoja lanceolada**

Con forma de lanza, es decir, con forma elíptica y alargada, y estrechado en el ápice y la base (Bailey, 1999; Font Quer, 1985).

- **Infectividad**

Es la habilidad de los rhizobia para infectar las raíces de las plantas leguminosas (Silvester *et al.*, 1987).

- **Leghemoglobina**

Es la proteína mayoritaria del nódulo, cuya función es transportar oxígeno a los bacteroides, transformada en oxileghemoglobina. Se cree que a su síntesis contribuyen ambos simbioses, bacteria y planta, y aparece cuando el nódulo está formado morfológicamente (De Felipe, 2009).

- **Leguminosa**

Aquella de grano comestible, comprende especies que pertenecen a la familia Fabaceae (Papilionaceae), cuyo uso principal radica en el consumo directo del grano o semilla y de la legumbre (vaina) (Peralta, Murillo, Mazón, Monar, Pinzón & Rivera, 2010).

- **Nódulos efectivos**

Son estructuras voluminosas de superficie lisa o rugosa, cuyo interior es rojo por la leghemoglobina (Frioni, 1999).

- *Novosphingobium*

Género que incluye microorganismos aeróbicos, quimioheterótrofos, gramnegativos, forma de bacilos, presentan glicoesfingolípidos que contienen como componente de la envoltura celular (Takeuchi, Hamana & Hiraishi, 2001). Pueden habitar en una gran variedad de suelos, sedimentos y ambientes acuáticos (Garrity, 2005).

- **Planta mesofítica**

Plantas que viven en una ecología intermedia entre el medio seco y acuático (Ramos, 2011).

- **Plásmidos.**- Elemento genético extracromosómico bacteriano, que no es esencial para el crecimiento de la célula y que no tiene forma extracelular (Madigan *et al.*, 2002).

- **Procariotas.**- Célula u organismo que carece de núcleo y otros orgánulos rodeados por membranas; generalmente con su ADN en una única molécula circular (Madigan *et al.*, 2002).

- **Productividad.**- Es la relación entre la producción obtenida por un sistema de producción o servicios y los recursos utilizados para obtenerla, por ejemplo la mano de obra, los materiales, la energía, entre otros (Definición ABC, 2007).

- **Transducción.**- Transferencia de genes de una célula a otra mediante un virus (Madigan *et al.*, 2002).

- **Transferencia horizontal.**- Es un mecanismo de transferencia de genes entre diferentes especies de géneros de bacterias en ambientes naturales (Wolska, 2003).

- **Transformación**

Transferencia de información genética por medio de ADN libre (Madigan *et al.*, 2002).

- **Vía Entner Doudoroff**

Es una ruta metabólica en la que se obtiene gliceraldehído-3-fosfato y piruvato a partir de 6-fosfogluconato que es el intermediario clave (Blevins, Feary & Ohibbs, 1975).

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **3.1.1. Tipo**

La investigación se clasificó como:

- Aplicada, porque aporta conocimientos de aplicación inmediata a la solución de problemas prácticos.
- Cuasi-experimental, porque la investigación se da en situaciones naturales (condiciones de campo) en que no se pueden controlar todas las variables de importancia. Y el investigador sí puede controlar cuándo llevar a cabo las observaciones, cuándo aplicar la variable independiente o tratamiento y cuál de los grupos recibirá el tratamiento.
- Prospectiva, el investigador comienza con la observación de supuestas causas y después observa las consecuencias; información utilizada fue captada después de planeado el estudio.
- Cuantitativa, porque se cuantifican o miden numéricamente las variables o aspectos estudiados.

##### **3.1.2. Diseño**

Se aplicó un diseño en bloques completamente aleatorizado, con seis tratamientos, cada uno con tres repeticiones que hicieron un total de 18 unidades experimentales.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: Concentración de  $10^8$  cel/ml de *Rhizobium etli*

T2: Concentración de  $10^9$  cel/ml de *Rhizobium etli*

T3: Concentración de  $10^{10}$  cel/ml de *Rhizobium etli*

T4: Control negativo: agua destilada

T5: Control positivo: fertilizante químico

T6: Control positivo: biol

### **3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA**

**3.2.1.** Población: 540 plantas de *Phaseolus vulgaris* L.

**3.2.2.** Muestra: 180 plantas (10 plantas por cada unidad experimental)

### **3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

**Tabla 2.**

Operacionalización de variables experimentales

Variable	Dimensiones	Indicador	Unidad/Categorías	Tipo de variable	Nivel de medición
<b>Variable independiente</b>					
Concentración de <i>Rhizobium etli</i>	Concentración de <i>Rhizobium etli</i>	Dosis de biofertilizante	Dosis 10 <sup>8</sup> cel/ml: baja Dosis 10 <sup>9</sup> cel/ml: media Dosis 10 <sup>10</sup> cel/ml: alta	Cuantitativa	Razón
<b>Variable dependiente</b>					
Rendimiento, calidad y rentabilidad de la vainita	Rendimiento	Cantidad en Kilogramos de vainita por hectárea y gramos por planta	Hectárea: bajo <3000 > alto; Planta: bajo <60,00 > alto	Cuantitativa	Razón
	Calidad	Longitud de vaina en centímetros	Baja <14,00 > alta	Cuantitativa	Razón
		Peso promedio de vaina en gramos	Bajo <6,00 > alto	Cuantitativa	
		Número de vainas por planta	Bajo <12,00 > alto	Cuantitativa	
Rentabilidad	Utilidad neta/Costo total \$./ha expresada en %	Baja <30% Alta >60%	Cuantitativa	Razón	

Fuente: Elaboración propia, marzo del 2014.

### **3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **3.4.1. Fase de laboratorio**

Se llevó a cabo en los Laboratorios de Micología y Virología, y en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna.

##### **3.4.1.1. Materiales**

- **Cepa en estudio**

*Rhizobium etli* aislada de nódulos de frijol e identificada molecularmente en el Laboratorio Marino Tabusso de la Universidad Nacional Agraria La Molina y perteneciente a la Colección de Cultivos Rizobianos del Laboratorio de Microbiología Ambiental-Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

- **De vidrio**

Los de uso común en el laboratorio.

- **Medios de cultivo y reactivos**

Caldo Extracto de Levadura Manitol (CLM), Agar Levadura Manitol con el colorante Rojo Congo (ALMRC), Agar Levadura Manitol con Carbonato de Calcio, Medio Peptona Glucosa con el indicador Púrpura de Bromocresol

(PGPBC), Medio Levadura Lactosa Agar (LLA), Agar Extracto de Levadura Manitol Azul de Bromotimol (ALMBT), Medio Luria Bertani (LB) (CIAT, 1988), Medio Leche Tornasolada (Vincent, 1975), solución salina fisiológica al 0,85% (SSF), peróxido de oxígeno, glicerol, tween 80 y set para coloración Gram. La composición de los medios de cultivo y soluciones se detallan en el Anexo 1.

- **Otros materiales**

Cámara de Neubauer, asa de Kolle, micropipeta de 1000 µl, bomba aireadora, mangueras de conexión, uniones, filtro de aire de 0,22 µm.

#### **3.4.1.2. Equipos**

Autoclave, horno, incubadora, refrigeradora, balanzas de precisión, vórtex, microscopio compuesto, destilador, pHmetro y biorreactor cilíndrico con tapa de acero.

#### **3.4.1.3. Purificación de la cepa de *Rhizobium etli* y producción de biofertilizante**

- **Reactivación de cepa**

Se sembró por agotamiento el cultivo en placas Petri conteniendo el medio ALMRC. Las placas se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta el desarrollo de colonias típicas (3-5 días para las cepas de *Rhizobium*) (Vincent, 1975).

Tomándose como prueba positiva el desarrollo de colonias convexas, pulvinada o cónica de un color desde blanco a opaco hasta translúcido acuoso, con una morfología microscópica previa coloración de Gram correspondiente a bastones gramnegativos asporógenos (Ferrera-Cerrato, González-Chávez & Rodríguez-Mendoza, 1993) (Anexos 2 y 23).

- **Pruebas bioquímicas y fisiológicas (Anexos 3 y 23)**

- a) Crecimiento en el Medio Agar Levadura Lactosa**

Se sembró el cultivo aislado por duplicado en placas con medio LLA por estrías paralelas, se incubó a 28°C por 2 días (para *Rhizobium* sp.). Al observar el crecimiento bacteriano se adicionó 5 ml del reactivo de Benedict, incubándose a temperatura ambiente por 10 minutos. Se observó el cambio de color.

El cambio de color del reactivo de Benedict a amarillo se debe a la producción de  $\alpha$ -cetolactosa, característico del género *Agrobacterium* y no rizobios, estos últimos no producen un cambio de color del reactivo (CIAT, 1988).

- b) Crecimiento en el medio Peptona-Glucosa con el Indicador**

- Púrpura de Bromocresol**

Se sembró el cultivo en medio PGPBC mediante estrías paralelas, incubándose a 28°C por 2 días (para *Rhizobium* sp.). Se observó el crecimiento y cambio de coloración.

Un buen crecimiento de la bacteria acompañado de un cambio de color del medio, no corresponde a los rizobios ya que éstos no desarrollan bien en este medio y probablemente sea un contaminante (CIAT, 1988).

**c) Crecimiento en el medio Luria Bertani**

Se sembró los cultivos en medio LB mediante estrías paralelas, incubándose a 28°C por 2 días. Al igual que en el medio PGPBC, un buen crecimiento de la bacteria no corresponde a los rizobios, por lo que probablemente sea un contaminante (CIAT, 1988).

**d) Prueba en Leche Tornasolada**

Se inoculó una colonia en el medio, se incubaron a 28°C por 15 días haciendo observaciones periódicas sin agitar. Se deben observar cambios ocurridos en el medio tomando en cuenta las siguientes consideraciones: si no se registra cambio la cepa inoculada pertenece al género *Rhizobium*, si se da un crecimiento pobre o no hay crecimiento con un ligero cambio de pH, producción superficial de suero se considera una cepa pura de *Rhizobium*; si se reconoce un cambio de color a pardo con cambio de pH, formación de coágulos y disolución del medio, no se considera una cepa de *Rhizobium* (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

**e) Producción de ácido o álcali en Agar Extracto de Levadura Azul de Bromotimol al 0,5%**

Se sembró la cepa de *Rhizobium* en el medio ALMBT al 0,5%, incubándose a 28°C por 2 días. Se considera la prueba positiva a *Rhizobium* cuando se observa el viraje de color de este medio a amarillo (producción de ácido) (CIAT, 1988).

**f) Prueba de la Catalasa**

Se sembró el cultivo puro en placas con ALMRC y se incubó a 28°C por 3 días. Se agregó a una colonia una gota de reactivo de peróxido de hidrógeno al 3%. El resultado positivo es con la producción de burbujas de gas o de efervescencia.

**• Determinación de la curva de crecimiento de *Rhizobium etli* (Keyser, 1999)**

El cultivo joven de *Rhizobium etli* fue inoculado en un biorreactor con 900 ml de CLM a una concentración inicial de  $10^7$  cel/ml. Se aplicó aire con una bomba de pecera purificándose el aire con un filtro. Se incubó a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 3 días. Se hicieron diluciones con SSF 0,85% + tween 80 al 0,1%, de acuerdo a lo recomendado por Clavijo, Chipana, Centeno, Zúñiga & Guillén (2012) para bacterias productoras de expolisacáridos. Luego se realizaron conteos en cámara de Neubauer.

Este procedimiento permitió determinar la cinética del crecimiento del cultivo bacteriano, su fase exponencial o logarítmica que fue desde la hora 18 hasta la hora 46 aproximadamente, datos necesarios para saber en qué tiempo se podía suspender el sistema discontinuo durante la producción del biofertilizante (Anexo 4). Se determinó también su tiempo de generación durante el crecimiento exponencial (Anexo 5).

- **Producción del biofertilizante de *Rhizobium etli* (Thompson, 1980 & Vincent, 1970)**

La cepa pura fue sembrada por agotamiento en placas con ALMRC, que se incubaron a 28°C por 3 días. Las colonias desarrolladas se cosecharon con ayuda de un asa de Drigalsky. La suspensión de la cosecha se realizó con SSF y luego fue transferida al biorreactor estéril conteniendo 900 ml de medio CLM.

Al biorreactor se le inyectó aire purificado a través de un filtro de 0,22 µm, utilizando un motor de pecera con doble salida (2 x 4 l/min). Este sistema fue incubado a una temperatura de 28°C por 46 horas (fase exponencial), hasta que se alcanzó una población aproximada de 10<sup>9</sup> cel/ml. Los conteos directos se realizaron con una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico (Anexos 6 y 24).

- **Mantenimiento y conservación de la cepa**

El mantenimiento de la cepa se llevó a cabo en tubos de prueba con medio ALM con Carbonato de Calcio a 4°C. La conservación se realizó, utilizando como agente crioprotector glicerol al 20%, el que se repartió en crioviales y luego se esterilizó en autoclave. Posteriormente, se utilizaron suspensiones de cultivos celulares en CLM que se agregaron al glicerol hasta un volumen final de 1 ml, estos crioviales fueron llevados a congelación a -20°C (Frank & Simione, 1998) (Anexo 23).

### **3.4.2. Fase de campo**

#### **3.4.2.1. Localización del campo experimental**

El presente trabajo experimental se realizó en el Instituto de Investigación, Producción y Extensión Agraria (INPREX) de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna.

#### **3.4.2.2. Ubicación geográfica**

Latitud: 18° 01 min 49,98 s S

Longitud: 70° 15 min 12,54 s O

Altitud: 538 m s. n. m.

Fuente: Google Earth, 2014

### 3.4.2.3. Características del suelo

El análisis de las características físico-químicas del suelo en la zona experimental se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

**Tabla 6.**

Análisis físico-químico del suelo del INPREX-Tacna

Características químicas	Cantidad
pH	7,54
CE (dS/m)	3,94
Materia orgánica (%)	1,20
Nitrógeno (%)	0,07
Fósforo (ppm)	13,3
Potasio (ppm)	1124
Carbonato de calcio (%)	0,80
CIC (meq/100 g)	10,88
Características físicas	
Arena (%)	40
Limo (%)	48
Arcilla (%)	12
Clase textural	Franco

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, 2013.

El suelo es de textura franco, con bajo contenido de materia orgánica, el pH es ligeramente alcalino, la conductividad eléctrica CE es 3,94 dS/m lo que indica que es ligeramente salina, siendo un valor alto para vainita

(Schwartz & Gálvez, 1980). La materia orgánica fue de 1,20% es considerada baja, el nitrógeno está 0,07% que es un nivel bajo, el contenido de fósforo 13,3 ppm es considerado en un valor medio, el contenido de potasio 1124 ppm está en un nivel alto, el carbonato de calcio está dentro de lo normal, sin representar problemas (Garrido, 1994); la capacidad de intercambio catiónico CIC es de 10,88 meq/100 g que es un valor bajo, es un suelo pobre que necesita aporte de materia orgánica (Garrido, 1994).

#### **3.4.2.4. Agua de riego**

El agua utilizada en el campo experimental proviene del canal Uchusuma que es almacenada en un pozo ubicado en el INPREX. El análisis físico-químico fue realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de la EPS Tacna S. A.

**Tabla 7.**

Análisis físico-químico del agua del canal Uchusuma

Composición química	Resultado
pH	8,72
CE $\mu$ S/cm	642
Dureza total mg/l CaCO <sub>3</sub>	240
TDS Sólidos totales disueltos mg/l	318
Alcalinidad F mg/l CaCO <sub>3</sub>	15
Alcalinidad total mg/l CaCO <sub>3</sub>	100
<b>Cationes</b>	
Calcio mg/l Ca <sup>++</sup>	75
Magnesio mg/l Mg <sup>++</sup>	13,05
Sodio mg/l Na <sup>+</sup>	32
Potasio mg/l K <sup>+</sup>	5,3
<b>Aniones</b>	
Cloruros mg/l Cl <sup>-</sup>	12
Sulfatos mg/l SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	206
Carbonatos mg/l CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	18
Bicarbonatos mg/l HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	85
Nitratos mg/l NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,38
<b>Otros</b>	
Boro mg/l	0,4

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de la EPS Tacna S. A., abril 2014.

Según el análisis físico-químico el agua presenta un pH de 8,72, siendo un valor alto para el cultivo de vainita ya que es una planta sensible a la salinidad. En cuanto a la CE 642  $\mu$ S/cm y TDS 318 mg/l el agua se clasifica como buena (James, Hanks & Jurinak, 1982) porque la vainita es

un cultivo sensible con un límite de tolerancia de CE 700-2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Mass & Hoffman, 1977). Según el cuadro indicativo de valores de dureza para aguas de riego, recomendado por Canovas Cuenca (1978) esta agua se clasifica como medianamente dura.

De acuerdo a los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua (ECA) N° 002-2008-MINAM, en cuanto al riego de vegetales de tallo bajo y alto, para el caso del calcio, magnesio, sodio, sulfatos, bicarbonatos y nitratos, estos resultados están dentro de los valores normales. Respecto al potasio el resultado fue de 5,3 mg/l valor que se encuentra dentro del rango normal (Martínez & Serra, 2008).

El resultado de cloruros fue de 12 mg/l, se considera un valor bajo de acuerdo a ECA (100-700 mg/l), siendo la vainita una planta sensible a cloruros; en cuanto a carbonatos el resultado fue de 18 mg/l se encuentra elevado respecto a ECA (5 mg/l), esto se observa debido al pH elevado del agua.

En cuanto al boro el resultado fue de 0,4 mg/l encontrándose dentro de los valores permitidos, ya que la vainita es sensible cuando supera 0,5-1 ppm (Toledo, 2003).

### 3.4.2.5. Características del clima

El clima de la costa es subtropical árido, con una temperatura media anual de 18°C, ausencia de lluvias y una alta humedad atmosférica. En el invierno caen garúas que propician el desarrollo de vegetación herbácea conocida como “lomas” (Guerra & Garcés-Restrepo, 1996). Presenta variaciones de temperaturas de 12°C a 30°C, las temperaturas más frías corresponden a los meses de julio y agosto y las máximas se alcanzan en enero y febrero (BCRP, 2014).

**Tabla 8.**

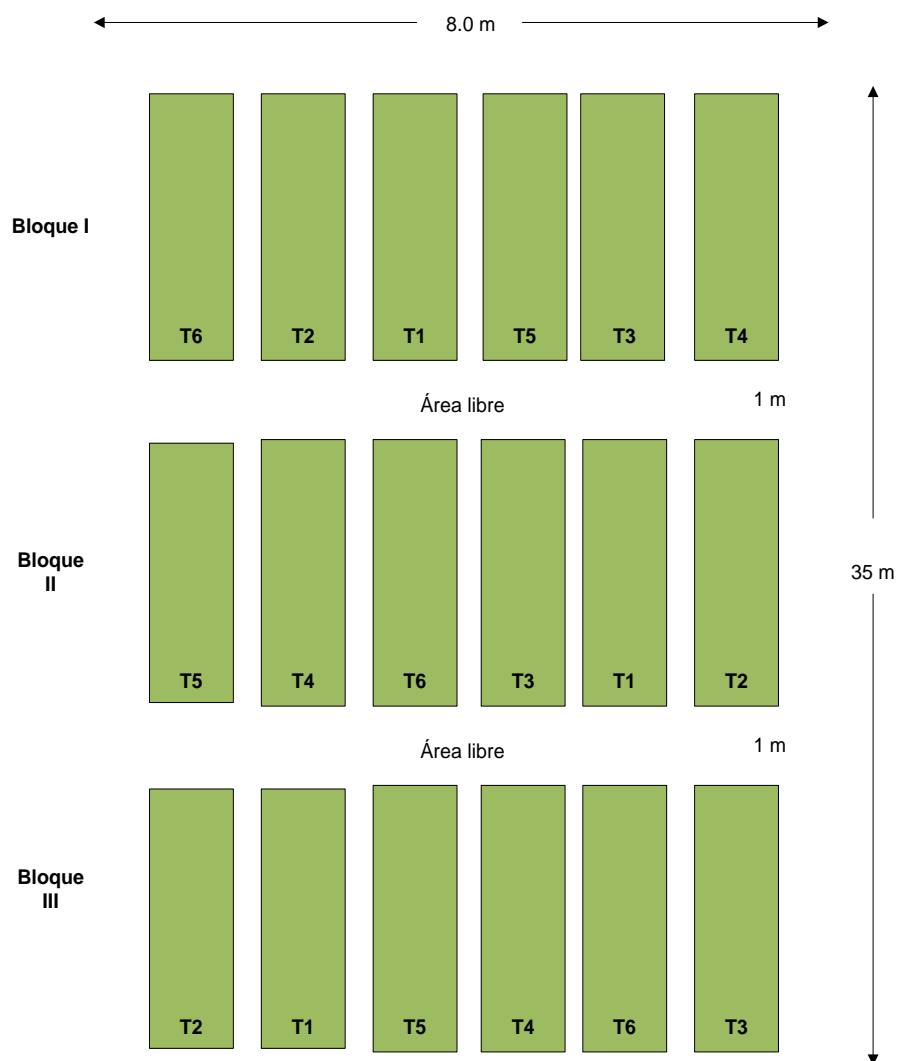
Temperaturas y humedad relativa registradas en la zona de Tacna

Meses	Temperatura			Humedad relativa %
	Máxima	Mínima	Media	
	°C			
Marzo	27,3	15,8	20,9	73
Abril	24	15,3	19,0	83
Mayo	22,1	13,5	17,0	84
Junio	19,3	11,5	14,6	85

Fuente: Estación metereológica “Jorge Basadre” tipo convencional-metereológica-SENAMHI-Tacna, 2014.

Las temperaturas medias registradas durante la investigación (meses de marzo a junio) variaron entre los rangos de 20,9-14,6, estos valores se

encuentran dentro de los rangos aceptables para el crecimiento de vainita. Respecto a la humedad relativa registrada durante la etapa de cultivo, los rangos oscilaron entre 73-85%, valores que no están totalmente dentro de lo que señala Infoagro (2008) que indica que la humedad óptima va de 65 a 75% no causando daño al cultivo.



Área total:  $40 \times 8 = 320 \text{ m}^2$   
 Área neta del experimento:  $35 \times 8 = 280 \text{ m}^2$   
 Bloques experimentales: I, II, III  
 Tratamientos: 1; 2; 3; 4; 5 y 6  
 Nº de repeticiones: 3  
 Nº de unidades experimentales: 18  
 Distancia entre líneas: 1 m  
 Distancia entre plantas: 0,20 m

**Figura 4.** Distribución espacial de tratamientos en el campo experimental

Fuente: Elaboración propia, marzo 2014.

#### **3.4.2.6. Material experimental**

##### **Vainita variedad Jade (Rogers/Syngenta)**

Las características más importantes son:

- Porte arbustivo, crecimiento determinado y erecto.
- Vainas por encima del suelo, vainas color verde oscuro, cilíndricas, rectas, largas.
- Lento desarrollo de semilla, textura tierna y sabor muy dulce.
- Cosecha escalonada.
- Tolera roya, virus del mosaico común del frijol, virus del rizado (Farmagro, 2011).

##### **Biofertilizante o inoculante de *Rhizobium etli***

Biofertilizante líquido, preparado en 3 concentraciones de  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  cel/ml.

#### **3.4.2.7. Variables evaluadas durante la investigación**

Las evaluaciones se efectuaron desde la recolección y conteo de frutos desde los 60 días después de la siembra, hasta la finalización de la cosecha.

- **Rendimiento (FAO, 1995)**

**Rendimiento por ha**

Se realizó eligiendo al azar 10 plantas por unidad experimental de cada tratamiento.

**Rendimiento por planta**

Se determinó tomando 10 plantas por unidad experimental en forma aleatoria de cada tratamiento.

- **Calidad (FAO, 1995)**

**Longitud de vaina**

Se determinó tomando en forma aleatoria 10 plantas (por cada unidad experimental) de las que se eligió para medir una vaina al azar de cada planta.

**Peso promedio de vaina**

Se realizó pesándose el total de vainas de cada planta (10 plantas) por unidad experimental en forma aleatoria de cada tratamiento, obteniéndose un promedio.

**Número de vainas por planta**

Se evaluaron 10 plantas por unidad experimental en forma aleatoria de cada tratamiento.

- **Rentabilidad**

Se realizó el análisis económico de cada tratamiento de acuerdo a lo recomendado por Loayza & Siura (2006), determinándose el costo total de producción por hectárea, los ingresos totales, la utilidad neta y finalmente el porcentaje de rentabilidad de cada tratamiento. Las fórmulas aplicadas fueron:

$$\text{Ingreso total S./ha} = [\text{Rendimiento Kg/ha}] [\text{Precio S./Kg}]$$

$$\text{Utilidad neta S./ha} = \text{Ingreso total S./ha} - \text{Costo total S./ha}$$

$$\% \text{ Rentabilidad} = \left[ \frac{\text{Utilidad neta S./ha}}{\text{Costo total S./ha}} \right] 100$$

### **3.4.2.8. Conducción del experimento (Anexos 25; 26; 27 y 28)**

- **Preparación del terreno (20-03-14)**

Primeramente se removió el suelo a una profundidad 0,35 m aproximadamente, con el fin de conseguir una buena porosidad del suelo, se hicieron los surcos, realizando una aplicación de estiércol a razón de 10 t/ha, se hizo el tendido de cintas de riego y posteriormente se realizó un riego constante por una semana para acelerar la descomposición de la materia orgánica antes de la siembra.

- **Siembra (27-03-14)**

Previo a la siembra, las semillas, a excepción de las que correspondieron a los tratamientos T5 y T6, fueron lavadas varias veces con agua corriente hasta eliminar el antifúngico.

Se realizó la demarcación del área experimental y se procedió a la distribución del material a evaluar. La siembra se realizó en forma directa a razón de 3 semillas por golpe, las cuales se cubrieron con 2-3 cm de tierra, el distanciamiento entre plantas fue de 20 cm y a 1 m entre líneas.

- **Riego**

Los riegos se realizaron por el sistema por goteo y en forma periódica de acuerdo a las necesidades de la planta para su desarrollo, siendo los primeros días los más importantes para la germinación, y un riego frecuente y ligero en la etapa de floración y formación de vainas.

- **Fertilización**

La dosis de fertilización utilizada como referencia fue 70-80-80 para suelos de la costa (Toledo, 2003).

**Tabla 9.**

Fertilización de tratamientos

Tto.	Descripción	Fertilización Kg/ha		
		Fosfato diamónico	Urea	Sulfato de potasio
1	10 <sup>8</sup> cel/ml de <i>Rhizobium etli</i>	173,90	-	34,00
2	10 <sup>9</sup> cel/ml de <i>Rhizobium etli</i>	173,90	-	34,00
3	10 <sup>10</sup> cel/ml de <i>Rhizobium etli</i>	173,90	-	34,00
4	Control negativo agua destilada	173,90	-	34,00
5	Control positivo fertilizante químico	173,90	84,10	34,00
6	Control positivo biol	-	-	-

Fuente: Elaboración propia, febrero 2014.

La primera fertilización se llevó a cabo el día 27-03-14, agregándose la totalidad de los fertilizantes descritos a excepción de la urea que se adicionó sólo 1/3 del total (T5).

La segunda fertilización fue el 29-04-14, adicionándose los 2/3 de urea restantes (T5).

- **Aplicación del biofertilizante de *Rhizobium etli* en semillas**

Se aplicó en los tratamientos T1, T2 y T3 de acuerdo al diseño planteado. Para la concentración de 10<sup>8</sup> cel/ml se diluyó a partir de 10<sup>9</sup> cel/ml y para alcanzar 10<sup>10</sup> cel/ml se obtuvo una concentración por centrifugación,

resuspendiéndose las células. La dosis aplicada fue la recomendada por Zúñiga (2008) 50 ml/30 Kg semilla mezclados con 200 g de suelo, agregándose bajo la sombra y se procedió a sembrar.

Adicionalmente, a los 45 días después de la siembra se evaluaron los parámetros de fijación de nitrógeno como la presencia de nódulos totales: efectivos e inefectivos. Esta evaluación se realizó a un 10% de plantas en cada tratamiento (Anexos 7 y 28).

- **Aplicación del biol**

La aplicación fue foliar al 10% en el T6 a los 15; 22 y 30 días después de la siembra. El análisis de su composición química fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 8).

- **Desahije**

Se realizó en forma manual cuando las plántulas alcanzaron los 10-12 cm, esta labor consistió en extraer desde la raíz las plántulas que se separaron de las que permanecieron definitivamente en el terreno, para que queden una o dos plantas por hoyo de siembra.

- **Control de malezas**

Los deshierbos se realizaron en forma manual, al mismo tiempo que se removió el suelo, con el cual se le brinda buenas condiciones de aireación y humedad para un mejor desarrollo de la planta. Estas labores se realizaron al inicio en forma constante cada 7 días y luego cada 15 días. A continuación se detallan las malezas que se presentaron:

**Tabla 12.**

Malezas identificadas en el campo experimental

Nombre científico	Nombre común
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Yuyo o amaranto
<i>Bidens pilosa</i> L.	Chiriro
<i>Castelia cuneato-ovata</i> Cav.	Papilla
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Coquito
<i>Chenopodium murale</i> L.	Hierba del gallinazo
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Hierba de la golondrina
<i>Heliotropium curassavicum</i> L.	Jaboncillo
<i>Malva parviflora</i> L.	Malva
<i>Melilotus albus</i> Medik.	Trébol
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	Janacho

Fuente: Elaboración propia, con colaboración de Rosario Zegarra, 2014.

- **Control fitosanitario**

Entre las plagas y enfermedades que se presentaron durante la conducción del experimento fueron:

### **Plagas**

- Gusanos cortadores, se aplicó Furia, a razón de 200 ml/200 l y Lorsban a una dosis de 300 ml/200 l, al momento del establecimiento y emergencia del cultivo.
- Mosca minadora (*Liriomyza huidobrensis*) se aplicó Abamex, a una dosis de 200 ml/200 l, durante el crecimiento del cultivo. Se utilizaron trampas amarillas a razón de 60/ha.
- Mosca blanca (*Bemisia tabaci*) se aplicó Gerónimo a razón de 50 g/200 l. También se utilizó *Chrysoperla carnea* (dosis 15 millares/ha). Se colocaron también trampas amarillas a razón de 60/ha.
- Gusano de brotes y de vainas, se controló con Proclaim en la dosis de 100 g/200 l y Coragen a razón de 50 ml/200 l, al inicio de la formación de vainas. También se controló con Confi BT (*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*) cuya dosis fue de 300 g/200 l.

### **Enfermedades**

Fúngicas, como preventivo se aplicó Farmathe al día siguiente después de la siembra e inmediatamente después de la germinación, a razón de 250 g/200 l.

- **Cosecha**

La cosecha se realizó a partir de los 60 días, cuando las vainas alcanzaron su tamaño y textura comercial. Se obtuvieron cinco cosechas:

- Primera cosecha 26-05-14
- Segunda cosecha 30-05-14
- Tercera cosecha 06-06-14
- Cuarta cosecha 12-06-14
- Quinta cosecha 23-06-14

### **3.5 Procesamiento y análisis de datos**

Se utilizó el análisis de varianza (ANVA) usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 bajo el modelo del diseño en bloques y prueba de rango múltiple de Duncan, y se determinó si hay un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en los diferentes tratamientos. Los datos estadísticos obtenidos durante el experimento fueron analizados con el software estadístico Statgraphics. También se usó la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1. RENDIMIENTO

##### 4.1.1. Rendimiento por hectárea

**Tabla 13.**

Análisis de varianza para el rendimiento por hectárea

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Tratamiento	1,05325E7	5	2,11E06	14,13	0,0003 S.
Bloque	40775,4	2	20387,7	0,14	0,8738 N. S.
Error	1,49E06	10	149098,0		
Total	1,20643E7	17			

S.: significativo      N.S.: no significativo

C. V. : 17,34%

95% de confiabilidad

Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

Esta tabla indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, es decir, que por lo menos uno de los tratamientos es superior en el rendimiento por hectárea. No existen

diferencias entre bloques, lo cual indica que hubo homogeneidad en el campo experimental. El coeficiente de variabilidad de 17,34% señala que la homogeneidad del material experimental utilizado es aceptable, lo que significa que los datos obtenidos son confiables.

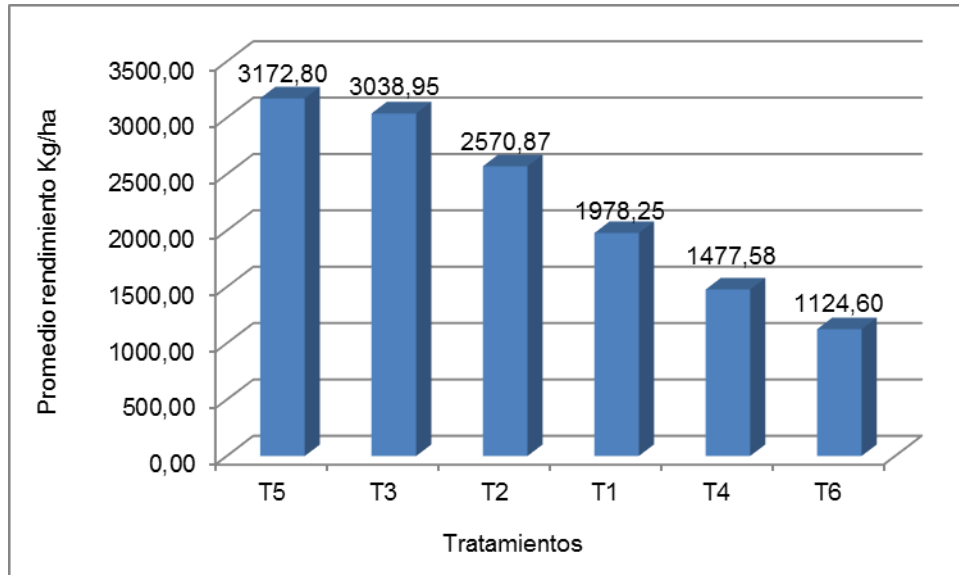
**Tabla 14.**

Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el rendimiento por hectárea

Orden de mérito	Tratamientos	Promedios Kg	Significación $\alpha$ 0,05
1	5	3 172,80	a
2	3	3 038,95	a
3	2	2 570,87	ab
4	1	1 978,25	bc
5	4	1 477,58	cd
6	6	1 124,60	d

Letras iguales no difieren estadísticamente  
Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se identifican cuatro grupos homogéneos que estadísticamente son similares en el rendimiento por hectárea. Los tratamientos 5 y 3 son diferentes del T1, asimismo los tratamientos 5; 3 y 2 son diferentes del T4 y T6 (controles), así como del tratamiento 1 es diferente estadísticamente del T6.



**Figura 5.** Gráfico del rendimiento por hectárea (kg)

Fuente: Tabla 14.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 3 tuvieron mayores rendimientos por planta con 3 172,80 y 3 038,95 Kg, respectivamente. Los tratamientos control T4 y T6 obtuvieron promedios más bajos 1 477,58 y 1 124,60 Kg, respectivamente.

#### 4.1.2. Rendimiento por planta

**Tabla 15.**

Análisis de varianza para el rendimiento por planta

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Tratamiento	4212,77	5	842,554	14,13	0,0003 S.
Bloque	16,3331	2	8,16657	0,14	0,8736 N. S.
Error	596,344	10	59,6344		
Total	4825,45	17			

S.: significativo N.S.: no significativo

C. V. : 17,34%

95% de confiabilidad

Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, es decir, que por lo menos uno de los tratamientos es superior en el rendimiento por planta. No existen diferencias entre bloques, lo cual indica que hubo homogeneidad en el campo experimental. El coeficiente de variabilidad de 17,34% señala que la homogeneidad del material experimental utilizado es aceptable, lo que significa que los datos obtenidos son confiables.

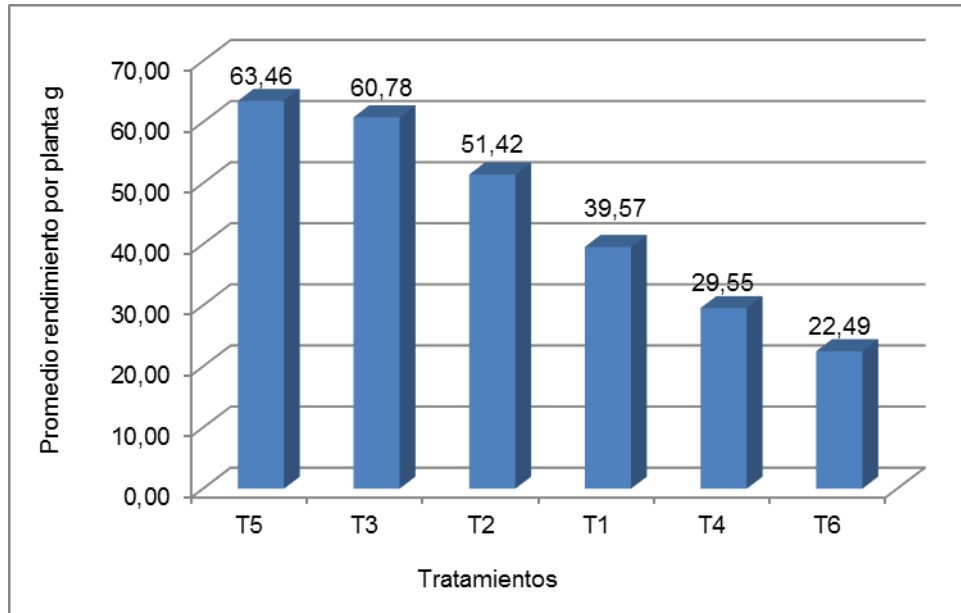
**Tabla 16.**

Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el rendimiento por planta

Orden de mérito	Tratamientos	Promedios g	Significación $\alpha$ 0,05
1	5	63,46	a
2	3	60,78	a
3	2	51,42	ab
4	1	39,57	bc
5	4	29,55	cd
6	6	22,49	d

Letras iguales no difieren estadísticamente  
Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se identifican cuatro grupos homogéneos que estadísticamente son similares en el rendimiento por planta. Los tratamientos 3 y 5 son diferentes del T1, asimismo los tratamientos 2; 3 y 5 son diferentes del T4 y T6 (controles), así como del tratamiento 1 es diferente estadísticamente del T6.



**Figura 6.** Gráfico del rendimiento por planta (g)

Fuente: Tabla 16.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 3 tuvieron mayores rendimientos por planta con 63,46 y 60,78, respectivamente. Los tratamientos control T4 y T6 obtuvieron promedios más bajos 29,55 y 22,49 g, respectivamente.

## 4.2. CALIDAD

### 4.2.1 Longitud de vaina

**Tabla 17.**

Análisis de varianza para la longitud de vaina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Tratamiento	1,58778	5	0,317557	3,82	0,0338 S.
Bloque	0,5677	2	0,28385	3,42	0,0739 N. S.
Error	0,830367	10	0,0830367		
Total	2,98585	17			

S.: significativo      N.S.: no significativo

C. V.: 2,05%

95% de confiabilidad

Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, es decir, que por lo menos uno de los tratamientos es superior en la longitud de vaina. No existen diferencias entre bloques, lo cual indica que hubo homogeneidad en el campo experimental. El coeficiente de variabilidad de 2,05% señala que la homogeneidad del material experimental utilizado es buena, lo que significa que los datos obtenidos son confiables.

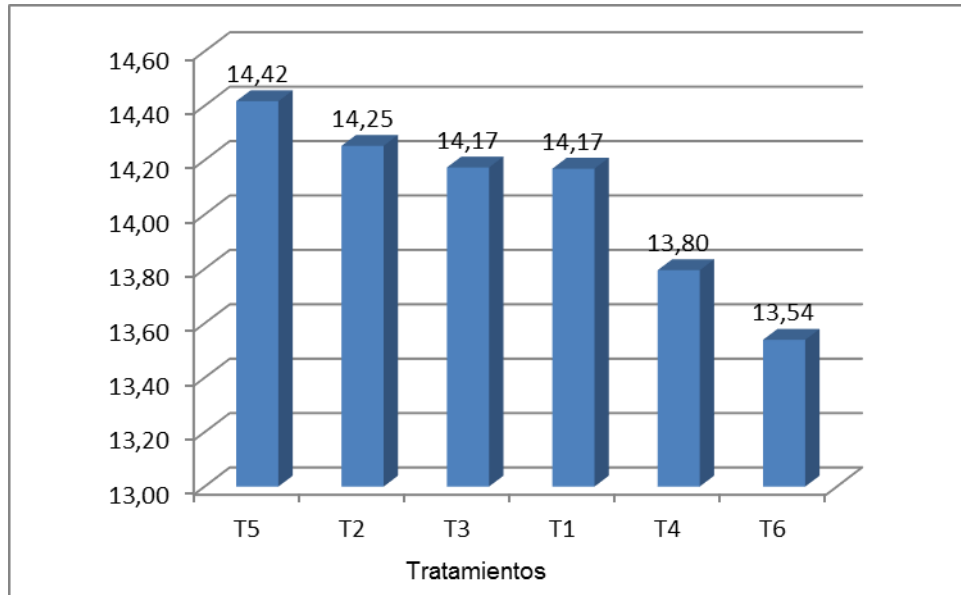
**Tabla 18.**

Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para la longitud de vaina

Orden de mérito	Tratamientos	Promedios cm	Significación $\alpha$ 0,05
1	5	14,42	a
2	2	14,25	ab
3	3	14,17	ab
4	1	14,17	ab
5	4	13,80	bc
6	6	13,54	c

Letras iguales no difieren estadísticamente  
Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se identifican tres grupos homogéneos que estadísticamente son similares en la longitud de vaina. Los tratamientos 5; 2; 3 y 1 son diferentes estadísticamente del tratamiento 6 (control positivo biol); asimismo el tratamiento 4 (control negativo agua destilada) es diferente al tratamiento 5.



**Figura 7.** Gráfico de la longitud de vaina (cm)

Fuente: Tabla 18.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 2 tuvieron mayores promedios de longitud de vaina con 14,42 y 14,25 cm, respectivamente.

Los tratamientos controles T4 y T6 obtuvieron los promedios más bajos.

#### 4.2.2. Peso promedio de vaina

**Tabla 19.**

Análisis de varianza para el peso promedio de vaina

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Tratamiento	1,20809	5	0,241619	2,86	0,0741N. S.
Bloque	0,161911	2	0,0809556	0,96	0,4163 N. S.
Error	0,845289	10	0,0845289		
Total	2,21529	17			

S.: significativo      N.S.: no significativo

C.V.: 4,91%

95% de confiabilidad

Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

Esta tabla indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos en estudio. No existen diferencias entre bloques, lo cual indica que hubo homogeneidad en el campo experimental. El coeficiente de variabilidad de 4,91% señala que la homogeneidad del material experimental utilizado es buena, lo que significa que los datos obtenidos son confiables.

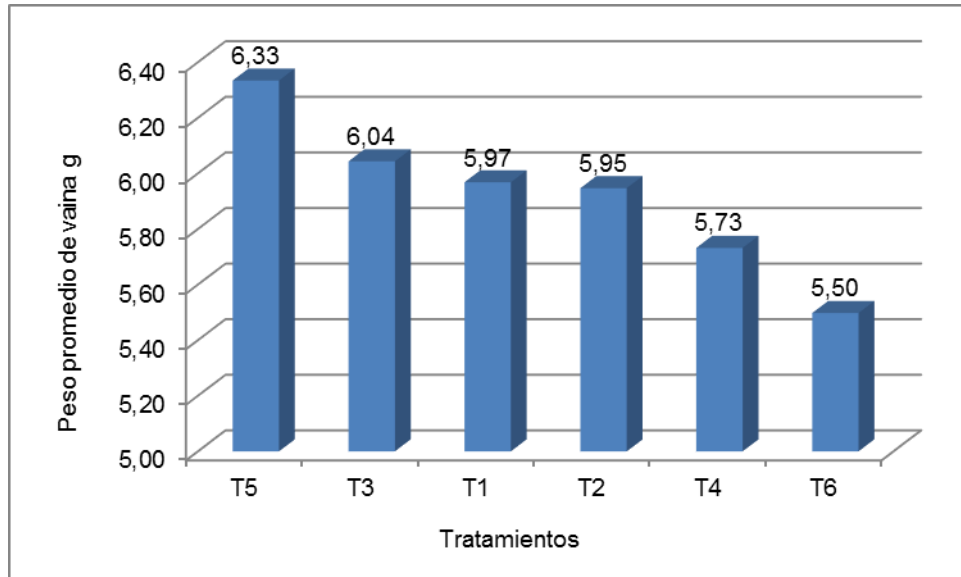
**Tabla 20.**

Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el peso promedio de vaina

Orden de mérito	Tratamientos	Promedios g	Significación $\alpha$ 0,05
1	5	6,33	a
2	3	6,04	ab
3	1	5,97	ab
4	2	5,95	ab
5	4	5,73	b
6	6	5,50	b

Letras iguales no difieren estadísticamente  
Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

En esta tabla se identifican dos grupos homogéneos que estadísticamente son similares en el peso de vaina. Hay diferencia significativa entre los tratamientos 5 y 6, así como también entre los tratamientos 4 y 5.



**Figura 8.** Gráfico del peso promedio de vaina (g)

Fuente: Tabla 20.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 3 tuvieron mayores promedios de peso de vaina con 6,33 y 6,04 g, respectivamente. Los tratamientos controles T4 y T6 obtuvieron los promedios más bajos 5,73 y 5,50 g, respectivamente.

### 4.2.3 Número de vainas por planta

**Tabla 21.**

Análisis de varianza para el número de vainas por planta

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón F	Valor P
Tratamiento	201,511	5	40,3022	13,4	0,0004 S.
Bloque	0,9883	2	0,49415	0,16	0,8507 N. S.
Error	30,0687	10	3,00687		
Total	232,568	17			

S.: significativo      N.S.: no significativo

C.V.: 18,91%

95% de confiabilidad

Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

Esta tabla indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos en estudio, es decir, que por lo menos uno de los tratamientos es superior en el número de vainas por planta. No existen diferencias entre bloques, lo cual indica que hubo homogeneidad en el campo experimental. El coeficiente de variabilidad de 18,91% señala que la homogeneidad del material experimental utilizado es aceptable, lo que significa que los datos obtenidos son confiables.

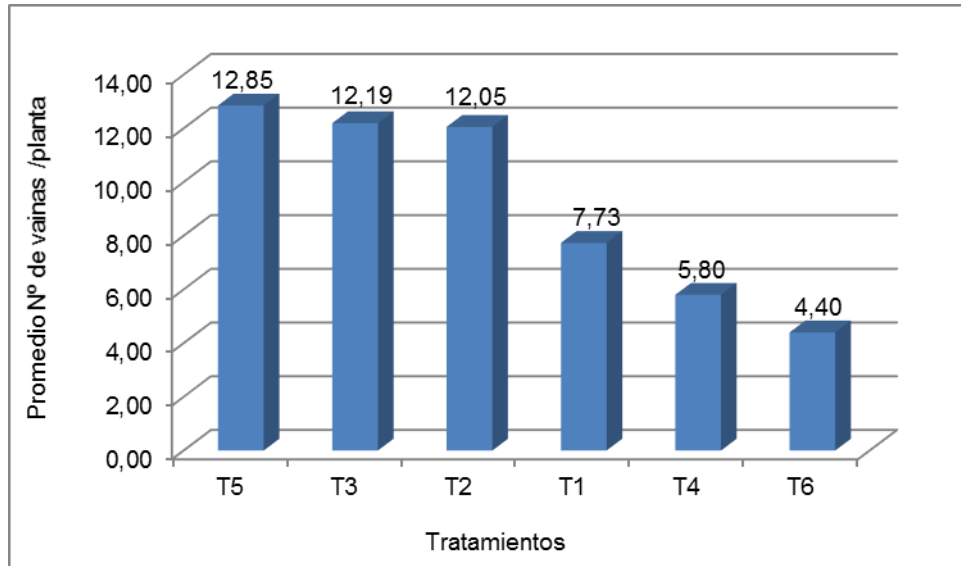
**Tabla 22.**

Prueba de rango múltiple de Duncan al 95% para el número de vainas por planta

Orden de mérito	Tratamientos	Promedios	Significación $\alpha$ 0,05
1	5	12,85	a
2	3	12,19	a
3	2	12,05	a
4	1	7,73	b
5	4	5,80	bc
6	6	4,40	c

Letras iguales no difieren estadísticamente  
Fuente: Elaboración propia, agosto 2014.

Esta tabla indica que se identifican tres grupos homogéneos que estadísticamente son similares en el número de vainas por planta. Los tratamientos 2; 3 y 5 son diferentes del T1, T4 y T6. Además el tratamiento 1 es diferente estadísticamente del 6.



**Figura 9.** Gráfico del número de vainas por planta

Fuente: Tabla 22.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 3 tuvieron mayores números promedios de vainas por planta con 12,85 y 12,19, respectivamente. Los tratamientos controles T4 y T6 obtuvieron promedios más bajos 5,80 y 4,40, respectivamente.

### 4.3. RENTABILIDAD

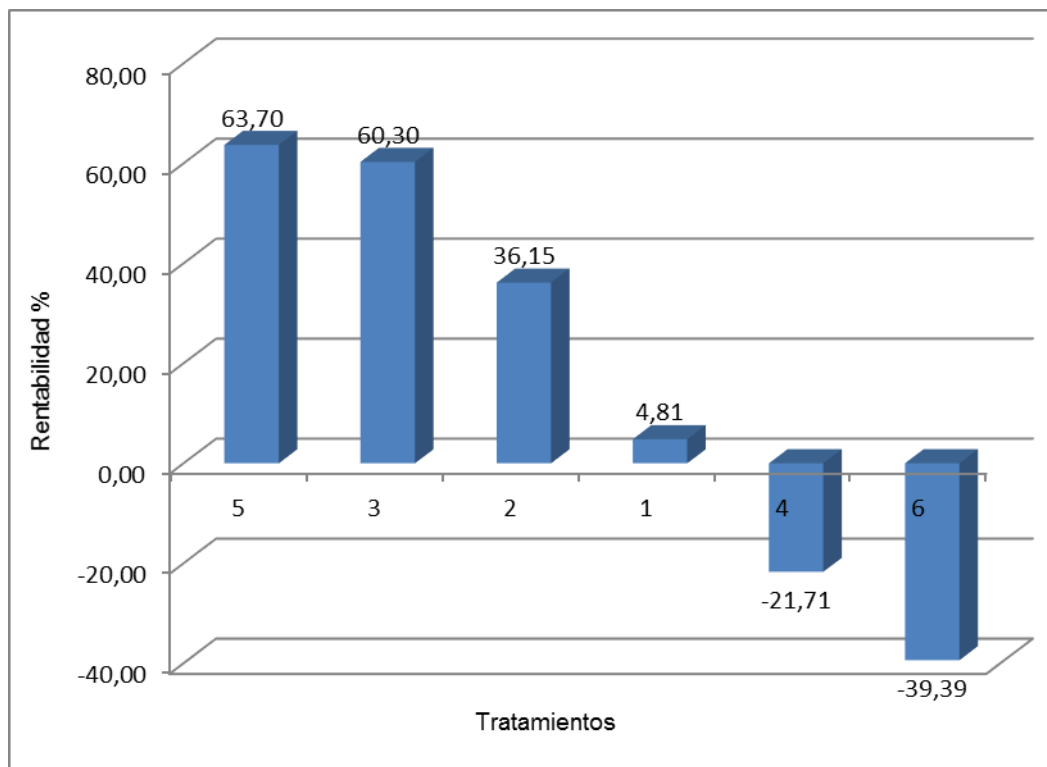
**Tabla 23.**

Análisis económico en los seis tratamientos de vainita

Variables económicas	Tratamientos					
	5	3	2	1	4	6
Costo total S./ha	8 722,05	8 531,22	8 497,20	8 493,80	8 493,42	8 349,87
Rendimiento Kg/ha	3 172,80	3 038,95	2 570,87	1 978,25	1 477,58	1 124,60
Precio S./Kg	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Ingreso total S./ha	14 277,60	13 675,28	11 568,90	8 902,13	6 649,13	5 060,70
Utilidad neta S./ha	5 555,55	5 144,05	3 071,70	408,32	-1 844,30	-3 289,17
Rentabilidad %	63,70	60,30	36,15	4,81	-21,71	-39,39

Fuente: Elaboración propia, octubre 2014.

En esta tabla se observa el análisis económico de los tratamientos, los valores más altos de rendimientos, ingresos totales, utilidades netas y rentabilidades se obtienen con el T5 y T3, mientras que T4 y T6 obtienen los valores más bajos.



**Figura 10.** Gráfico de la rentabilidad en los seis tratamientos de vainita

Fuente: Tabla 23.

En esta figura se observa que los tratamientos 5 y 3 presentan los porcentajes de rentabilidad más altos, mientras que T6 y T4 obtuvieron rentabilidades negativas.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

#### 5.1. RENDIMIENTO

##### 5.1.1. Rendimiento por hectárea

La Tabla 13 muestra que hay diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, se observa con más detalle en la Tabla 14 que el tratamiento con fertilizante químico T5 (3 172,80 Kg/ha), tratamiento con concentración *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml T3 (3 038,95 Kg/ha) y concentración *Rhizobium etli*  $10^9$  cel/ml T2 (2 570,87 Kg/ha) no tienen diferencia significativa, pero sí son diferentes estadísticamente del tratamiento control negativo con agua destilada T4 (1 477,58 Kg/ha). Lo que indica el efecto significativo del biofertilizante en las concentraciones  $10^{10}$  y  $10^9$ , en comparación con el control T4 sin biofertilizante. El tratamiento con concentración *Rhizobium etli*  $10^8$  cel/ml T1 (1 978,25 Kg/ha) tiene el rendimiento más bajo de los tres tratamientos biofertilizados con *Rhizobium etli*.

A su vez la Figura 5 muestra los rendimientos promedio por cada tratamiento donde T5 y T3 tienen los valores más altos y T4 y tratamiento

control positivo con biol T6 tienen los rendimientos más bajos. En el Anexo 9 se observan los rendimientos por hectárea; asimismo en el Anexo 14 se tiene la longitud de la planta a los 60 días, el promedio más alto lo tiene el T5 (23,57 cm) seguido del T3 (23,01 cm), mientras que T6 (14,75 cm) representa el promedio más bajo. La vainita variedad Jade representa plantas de porte mediano, vaina verde, de corte transversal redonda (Loayza & Siura, 2006).

Loayza & Siura (2006) hicieron una investigación sobre la productividad de vainita variedad Jade en un sistema con y sin rotación con *Crotalaria* obteniendo 7 120,00 y 3 240,00 Kg/ha, respectivamente, con una densidad de siembra de 500 000 plantas/ha. En comparación con esta investigación, el rendimiento en el T3 fue de 3 038,95 Kg/ha, pero con una densidad de siembra de 50 000 plantas/ha, por ello este rendimiento fue mejor al reportado por los investigadores mencionados.

De acuerdo a investigaciones realizadas por otros autores, respecto al rendimiento, se debe tomar en cuenta que se trabajan con diferentes densidades de siembra y, por ello, los rendimientos por hectárea son variables, además dependen también de la variedad del cultivar de vainita cosechado.

En cuanto a la dosis de biofertilizante aplicada en campo, el T3 obtuvo mejores resultados en el rendimiento, pues su promedio es superior a los otros tratamientos inoculados con *Rhizobium etli*, ya que al existir una adecuada concentración bacteriana en la superficie de los pelos radicales de las plantas de vainita y en la rizósfera, hubo una mayor proliferación e infección de estas bacterias y como consecuencia mejores resultados en la nodulación, esto se corrobora con la evaluación de los parámetros de fijación de nitrógeno (Anexo 7) reportándose en este tratamiento 265 nódulos efectivos, que es la nodulación efectiva más alta de los seis tratamientos de esta investigación; para ello, se consideraron las diferencias entre nodulación efectiva e inefectiva recomendadas por Frioni (1999) (Anexo 15).

Asimismo, se ha podido reemplazar totalmente el fertilizante químico como la urea, principalmente en el T3, ya que éste no tuvo diferencia significativa con el T5 y generó un mejor efecto entre los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli*. Cabe mencionar que a todos los tratamientos a los que se biofertilizó, se les aplicó una pequeña cantidad de N mineral (30 Kg N/ha), ya que según Silvester (1983) la disponibilidad de N proveniente de la fijación biológica se inicia aproximadamente a los 20 días después de la siembra, debido a lo cual se hace necesario adicionar esta pequeña cantidad, para estimular el crecimiento inicial de

las plántulas, favorecer el establecimiento de las cepas en el cultivo y la formación de nódulos.

Tanto el T4 y T6, que fueron tratamientos controles, no se biofertilizaron con *Rhizobium etli*, presentando los rendimientos más bajos, sin embargo, hubieron cepas nativas en la rizósfera, pues se observaron tanto nódulos efectivos como inefectivos (Anexo 7). Según Silvester *et al.* (1987), la habilidad de las cepas no necesariamente indica la eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno, para cada combinación leguminosa-rhizobio, el nivel óptimo de nodulación es diferente. No obstante, los parámetros de abundancia, tamaño, distribución y coloración interna de los nódulos son importantes indicadores de su efectividad o habilidad para fijar nitrógeno gaseoso. Es común observar leguminosas “promiscuas” que presentan una nodulación “semiefectiva” en donde se observa una buena nodulación, pero fijan una reducida cantidad de nitrógeno, que no les permite alcanzar su potencial rendimiento. De esta manera, no todas las cepas de *Rhizobium* son efectivas en la fijación de N, a pesar de que la infectividad sea alta (Mumns, 1987).

Los resultados obtenidos en la presente investigación difieren de los reportes de Hernández & Batista (2013) que aplicaron *Rhizobium* en la dosis de 1 Kg/ha en frijol cultivar Velazco Largo, este tratamiento mostró

un rendimiento superior al resto de tratamientos, seguido de los tratamientos donde se aplicó *Rhizobium* + 50% y 25% de NPK.

Piha & Mumns (1987) han demostrado que, entre un 25 y 75% de N requerido por la planta de frijol, proviene de la fijación simbiótica. Las cantidades de N<sub>2</sub> fijado suministrado entre 25-125 Kg N/ha, dependen del cultivar.

### **5.1.2. Rendimiento por planta**

En las variedades de vainita el rendimiento por planta está en función de la producción obtenida en cada cosecha, y de la duración del período de producción de vainas. Este último aspecto es muy importante en las variedades, ya que normalmente presentan una producción escalonada lo que determina un amplio período de producción y un mayor número de cosechas (Alfárez, 2009).

Al analizar la Tabla 15, se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, mostrándose con más detalle en la Tabla 16, el T5 (63,46 g), T3 (60,78 g) y T2 (51,42 g) son similares estadísticamente, pero son significativamente diferentes del T4 (29,55 g) que es el control negativo sin biofertilizante, lo que indica el efecto significativo de *Rhizobium etli* en concentraciones 10<sup>10</sup> (T3) y 10<sup>9</sup> cel/ml

(T2). La concentración más alta del inoculante  $10^{10}$  cel/ml tuvo el mejor efecto en el rendimiento por planta entre los tratamientos inoculados. En la Figura 6 se grafica el rendimiento promedio por planta, así como en el Anexo 10 se observan los rendimientos por planta de cada tratamiento.

Según Hernández & Batista (2013), la influencia del nitrógeno en los períodos críticos del cultivo donde se necesita mayor demanda de este elemento para que ocurra la floración y el llenado de vainas, esto lo proporciona la inoculación con *Rhizobium* el cual fija nitrógeno atmosférico.

Las investigaciones en leguminosas sobre el aprovechamiento de nitrógeno debido a las bacterias del género *Rhizobium* han posibilitado incrementos en el crecimiento y rendimiento de las leguminosas como soya y frijol, con la aplicación de *Rhizobium* en suelos con bajo contenido de nitrógeno se puede aumentar los rendimientos de plantas leguminosas (Torres *et al.*, 2002).

El nitrógeno es componente esencial de la clorofila, unidad básica en la absorción de energía lumínica para el proceso de fotosíntesis. El proceso es muy importante para la formación de hidratos de carbono que, sujetos a condiciones favorables del ambiente para el crecimiento de plantas,

conduce a la formación de proteínas y posteriormente a la producción de masa protoplasmática. Los efectos del nitrógeno son fácilmente observables en plantas, ya que estimula el crecimiento vegetativo y el desarrollo de un color verde oscuro en las hojas, incrementa la masa protoplasmática, sustancia que se hidrata fácilmente y produce succulencia foliar (Kass,1998).

## **5.2. CALIDAD**

### **5.2.1. Longitud de vaina**

La Tabla 17 muestra que hay diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, en la Tabla 18 se observa con más detalle que T5, T2, T3 y T1 no tienen diferencia significativa entre ellos, pero son diferentes estadísticamente del T6 (control positivo con biol). No se observa el efecto significativo de la concentración del inoculante en las tres concentraciones aplicadas en campo, si bien éstas igualan al tratamiento químico, no obstante, son similares estadísticamente al tratamiento control con agua destilada T4.

Asimismo, la Figura 7 grafica los promedios de longitudes, las más altas correspondieron al T5 (14,42 cm) y T2 (14,25 cm) y las longitudes más bajas fueron T4 (13,80 cm) y T6 (13,54 cm). Se debe considerar que en las evaluaciones hechas como parámetros de fijación de nitrógeno (Anexo

7) respecto a los nódulos efectivos e inefectivos, se han encontrado nódulos efectivos en el tratamiento con T4 y T6, lo que corresponde a cepas nativas con capacidad de nodulación que se encuentran en ese suelo agrícola, pero cuya población sería baja en la rizósfera de la vainita.

Se debe tomar en cuenta que el potasio reportado en el análisis inicial en el campo experimental fue de un nivel alto 1124 ppm, el cual pudo originar que no haya diferencia significativa en la longitud de vaina entre los tratamientos mencionados. En aspectos de calidad de cultivos, el potasio produce al aumento de tamaño en frutos y tubérculos, estimula la formación de flores y frutos e interviene en procesos metabólicos fundamentales como respiración, fotosíntesis y síntesis de clorofila (Imas, 2005).

El largo de la vaina obtenido por Alférez (2009) con la variedad Venus-INIA, para los distintos niveles del factor densidad osciló entre 14,24 y 17,39 cm. En la presente investigación los valores más altos estuvieron entre 14,17 y 14,42 cm, pero con la variedad Jade.

Los promedios obtenidos de longitud de vaina de cada tratamiento se muestran en el Anexo 11. Según Barrios & Siura (1999), que trabajaron con diferentes concentraciones de biol, aplicado foliarmente al 10% en un

cultivo de vainita (variedad Bush Blue Lake 47) en el que obtuvieron 12,87 cm aproximadamente de longitud de vaina, este valor es menor al que se reporta en la presente investigación que fue 13,54 cm (T6 control positivo con biol al 10% con la variedad Jade).

### **5.2.2. Peso promedio de vaina**

La Tabla 19 muestra que no hay diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, en la Tabla 20 se observa que los tratamientos 5; 3; 1 y 2 no tienen diferencia significativa, al igual que los tratamientos 3; 1; 2; 4 y 6. No se observa el efecto significativo de la concentración del biofertilizante en los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli* ya que son estadísticamente iguales a los controles T4 y T6.

Se ve diferencia significativa del T5 con el T4 y T6. Asimismo, en la Figura 8 se observan los valores más altos que corresponden al T5 (6,33 g) y T3 (6,04 g) y los valores más bajos fueron del T4 (5,73 g) y T6 (5,50 g). Los promedios obtenidos en el peso promedio de vaina de cada tratamiento se muestran en el Anexo 12.

Como ya se mencionó respecto al análisis de suelo (Tabla 6), se reportó un nivel de potasio considerado alto de 1124 ppm, debido a esto se agregó en el suelo una proporción menor de potasio durante la siembra,

se consideró como referencia la dosis de fertilización 70-80-80 NPK, recomendada por Toledo (2003).

Al no haber diferencia significativa en el peso de vaina en los tratamientos evaluados, el potasio pudo tener efecto en el peso de los frutos. Se sabe que el potasio estimula la turgencia celular y actúa en gran parte como activador enzimático en los procesos fisiológicos de las plantas; además facilita la translocación de azúcares, es decir, en el transporte de productos fotosintéticos, hacia sitios de almacenamiento o de crecimiento en semillas, tubérculos y frutas. Un adecuado contenido de potasio en las plantas fijadoras de nitrógeno molecular por simbiosis, como las leguminosas, incrementa la actividad de la enzima nitrogenasa y la cantidad de nitrógeno molecular fijado dentro de los nódulos bacteriales (Kass,1998 ).

Loayza & Siura (2006) realizaron una investigación de productividad de vainita variedad Jade en un sistema de producción orgánico y rotación con crotalaria (*Crotalaria juncea* L.), reportan un peso de vaina de 4,363 g, valor que es menor a todos los promedios obtenidos en la presente investigación, e incluso comparando con los tratamientos inoculados con el biofertilizante de *Rhizobium etli* T3 (6,04 g), T1 (5,97 g) y T2 (5,95 g).

A su vez Barrios & Siura (1999), al aplicar 10% de biol obtuvieron un peso de vaina de la variedad Bush Blue Lake 47 de 6,02 g aproximadamente, valor que es mayor al obtenido en esta investigación que fue 5,50 g reportado en el T6 con la variedad Jade, pero con la misma concentración de biol. La variedad Bush Blue Lake presenta vainas con mayor peso (Loayza & Siura, 2006).

### **5.2.3. Número de vainas por planta**

En la Tabla 21 se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, la Tabla 22 muestra con más detalle que el T5 (fertilizante químico), T3 (concentración de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml) y T2 (concentración de *Rhizobium etli*  $10^9$  cel/ml) son similares estadísticamente en el número de vainas. Se observa un efecto significativo del biofertilizante de *Rhizobium etli* en concentraciones altas (T3 y T2), en comparación con el T1 y los controles T4 y T6 con los que tienen diferencia significativa.

En la evaluación de parámetros de fijación de nitrógeno, el T3 tuvo el mayor número de nódulos totales y nódulos efectivos, 331 y 265, respectivamente; y se observaron también 66 nódulos inefectivos. En el T5 se hallaron nódulos formados por cepas nativas en el suelo que

colonizaron los pelos radicales, reportándose 63 nódulos totales, 36 efectivos y 27 nódulos inefectivos (Anexo 7).

El T1 (*Rhizobium etli*  $10^8$  cel/ml) concentración más baja aplicada en campo, a su vez es similar estadísticamente al T4 (agua destilada), esta concentración tuvo 12 nódulos efectivos y pudo encontrar competencia con las cepas autóctonas de la rizósfera de la vainita por la colonización de los pelos radicales, ya que el T4 presentó plantas de vainita con 45 nódulos efectivos formados por cepas nativas (Anexo 7). Los promedios obtenidos en el número de vainas por planta de cada tratamiento se muestran en el Anexo 13. Asimismo, la Figura 9 grafica el número promedio de vainas por planta, donde el T5 tiene 12,85 y T3 12,19 siendo éstos los valores más altos; mientras que el T4 obtuvo 5,80 y T6 4,40 vainas por planta, representando los valores más bajos.

Los resultados obtenidos con las concentraciones más altas de biofertilizante de *Rhizobium etli*, 12,19 y 12,05 son similares que el promedio de número de vainas por planta reportado en la tesis de Gambetta (2007) que fue de 12, que investigó respecto al efecto de tres niveles de nitrógeno y fósforo en dos variedades de vainita.

Los resultados de la presente investigación no coinciden con lo realizado por Torres *et al.* (2002) respecto a incrementos en la fijación de nitrógeno

en el cultivo del frijol negro, donde evaluaron el número de vainas por planta y no encontraron diferencia significativa entre el tratamiento de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (70 y 150 g/Kg semilla/ha) y el testigo; sin embargo, la coinoculación de esta bacteria y *Azotobacter chroococcum* sí tuvo un efecto significativo en el número de vainas por planta que fue 6,77. Cabe mencionar que en el presente trabajo no se realizó coinoculación y se tuvo un efecto significativo en el número de vainas por planta.

Hernández & Batista (2013) evaluaron los efectos de *Rhizobium* en el rendimiento del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Velazco Largo, respecto al número de vainas por planta, encontraron que *Rhizobium* (dosis 1 Kg/ha) fue superior significativamente al resto de tratamientos que tuvieron fertilización parcial de NPK, obteniéndose 7,15 vainas por planta.

### **5.3. RENTABILIDAD**

#### **Análisis económico en los seis tratamientos de vainita**

Al analizar la Tabla 23, se observa que los costos de producción del cultivar de vainita variedad Jade en los seis tratamientos son diferentes (Anexos 16; 17; 18; 19; 20 y 21); para obtener dichos costos se han considerado los gastos del cultivo como horas máquina, mano de obra,

insumos, otros gastos (agua de riego, movilidad y electricidad) e imprevistos; diferenciándose los tratamientos en el nivel de fertilización química y biológica, así como en la mano de obra.

Se observa también en la Tabla 23, que entre los tratamientos inoculados con el biofertilizante *Rhizobium etli*, el T3 (concentración más alta de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml) fue el que generó una mayor utilidad neta y rentabilidad, obteniéndose S/. 5 144,05 y 60,30%, respectivamente. El T5 (fertilizante químico) obtuvo S/. 5 555,55 de utilidad neta y 63,70% de rentabilidad, valores que son similares al T3, siendo éste el único tratamiento que pudo competir con el T5. El costo total de producción del T5 fue el más alto S/. 8 722,05, seguido del T3 que tuvo un costo de S/. 8 531,22.

Asimismo, se observa en la Figura 10 que los tratamientos experimentales T5 y T3 tuvieron rentabilidades altas. El T2 (concentración media de *Rhizobium etli*  $10^9$  cel/ml) y el T1 (concentración más baja de *Rhizobium etli*  $10^8$  cel/ml) tuvieron rentabilidades de 36,15% y 4,81%, respectivamente, si bien no tuvieron pérdida económica, pero comparándolos con el T5 que obtuvo 63,7%, resultaron no ser las concentraciones suficientes como para producir una rentabilidad similar

que compita con el T5 que representa la producción convencional de vainita que realiza el agricultor.

La Figura 10 muestra también los tratamientos controles como el T4 (-21,71%) y T6 (-39,39%) tuvieron rentabilidades negativas y con pérdidas económicas; el T4 tuvo fertilización NPK sin urea y sin biofertilizante y en el T6 no se aplicó fertilización química con NPK. En ambos tratamientos sus utilidades netas fueron también negativas (Tabla 23).

De acuerdo a los resultados del análisis de la composición química del biol (Anexo 8), se muestran resultados como: sólidos totales (1,296%), materia orgánica en solución (0,588%), N (0,180%), P (0,005%), K (0,231%) y Ca (0,023%), que son mucho menores a los obtenidos en el biol reportado por Suquilanda (1995): sólidos totales (5,6%), materia orgánica (38%), N (1,6%), P (0,2%), K (1,5%) y Ca (0,2%). No se observa que hay una estandarización en los métodos de producción de biol, pues es bastante la diferencia y esto explicaría porque el biol solo no fue suficiente para producir una rentabilidad positiva. Se utilizó un 10% de biol debido al trabajo reportado por Barrios & Siura (1999) en el que no hallaron diferencias significativas para el efecto de diferentes concentraciones de biol sobre el rendimiento total comercial en vainita Bush Blue Lake 47.

Los resultados de esta investigación, respecto a los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli*, son diferentes y mayores comparados con los obtenidos por Loayza & Siura (2006), que emplearon un sistema con rotación con *Crotalaria* para la producción de vainita variedad Jade, donde obtuvieron una utilidad neta de S/. -1 391,00 y una rentabilidad de -16%; de igual forma cuando probaron en otro sistema sin rotación con *Crotalaria* la utilidad neta fue de S/. -5 146 y la rentabilidad de -61%.

Acuña *et al.* (2001) en un estudio sobre la validación técnica de inoculantes de frijol con cepas de *Rhizobium* en Centroamérica, concluyeron que en el 80% de los casos el análisis económico seleccionó la inoculación como rentable y a excepción de Panamá, el uso de la mitad del fertilizante recomendado más inoculación, fue superior al tratamiento con solo inoculante.

Asimismo, Flores, Hernández, Acosta & Montero (1999) mencionan que hubo una respuesta positiva a la utilización del biofertilizante de *Rhizobium* sp. en frijol común en la región Brunca (Costa Rica) con un beneficio neto por ha de ₡ 198089,5 Colones (S/. 1 168,00); en otras regiones la fertilización química fue la que obtuvo un mayor beneficio neto ₡ 192315 Colones (S/. 1 133,95), seguido de la fertilización química más inoculante biológico con ₡173092 Colones (S/. 1 020,61) de beneficio neto.

En los últimos años ha habido un crecimiento importante en los costos de producción para el agricultor peruano, la urea, principal insumo para la fertilización, aumentó en más de 48% en los últimos 9 años. La urea, que representa el 48% de los fertilizantes y abonos utilizados en el Perú, duplicó su precio en ese mismo período producto del aumento del precio del petróleo (Libélula, 2011).

Es importante señalar que hay variables en la producción que no pueden ser controladas, como el incremento del precio de la urea, el precio de la mano de obra local que ha aumentado en los últimos cinco años en un 100% y el precio en el mercado del kilo de vainita.

Sin embargo, al realizar una producción reemplazando la urea por el biofertilizante de *Rhizobium etli*, el gasto en fertilización nitrogenada disminuiría, porque ahora dependería solamente del biofertilizante, habría también una disminución en el gasto en mano de obra, ya que se inocula sólo una vez, y en el transporte.

El costo de producción estimado del biofertilizante es de S/. 13,69/l como se ve en el Anexo 22 (donde se ha considerado el costo de producción a escala piloto de 100 l). El precio del biofertilizante en el mercado va a variar de acuerdo a la concentración en cel/ml de éste (Anexos 16; 17 y

18). Así se tiene que el precio del biofertilizante estimado de venta es de S/. 36,00/ha a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  cel/ml (0,0717 l) (Anexo 18); frente a S/. 117,74/ha, que representa el gasto solamente para urea (Anexo 20). Por lo tanto, resulta rentable tanto para quien produce el biofertilizante con *Rhizobium* y para el agricultor que utilice dicho biofertilizante en campo.

Los costos de producción por hectárea disminuirían aún más, si se trabajaran con consorcios microbianos de bacterias fijadoras de nitrógeno, con bacterias solubilizadoras de fósforo, bacterias con actividad de biocontrol, micorrizas; pues se lograría reemplazar de manera total o parcial la fertilización química, y entonces la rentabilidad y el beneficio neto en la producción utilizando la biofertilización, serían mejores que en la producción solamente con fertilizantes químicos.

Si bien el T5, tiene una rentabilidad similar que el tratamiento biológico T3, se debe considerar el aspecto ambiental pues el uso de los fertilizantes nitrogenados trae un impacto ambiental adverso, como contaminación de mantos acuíferos con  $\text{NO}_3^-$ , eutrofización, lluvia ácida y calentamiento global por la emisión de gases de nitrógeno a la atmósfera ( $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) (Ramanathan, Cicerone, Singh, & Kiehl, 1985). La acumulación de nitratos en frutos y verduras comestibles y en acuíferos es de alto riesgo

para la salud humana cuando la concentración de N-NO<sub>3</sub> supera el 0,2% en las partes comestibles de las plantas, como frutos de hortalizas o verduras, y en el agua potable llega a 10 ppm (Malakouti, Navabzadeth & Hashemi, 1999).

Opuestamente, la ventaja de los biofertilizantes es que no contaminan, ni causan daño al suelo, planta y al hombre, mejoran rendimientos, son fáciles de transportar y su bajo costo permite la utilización en grandes superficies (INIFAP, 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, en cuanto a todas las variables analizadas, se concluye que la hipótesis planteada se rechaza, ya que la concentración más efectiva fue de 10<sup>10</sup> cel/ml de biofertilizante *Rhizobium etli*, que produjo una mayor rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. (vainita) en condiciones de campo.

## CONCLUSIONES

### Primera

Se determinó que la concentración de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml (T3) tuvo un mejor efecto en el rendimiento por hectárea y en el rendimiento por planta, entre los tratamientos con *Rhizobium etli*, obteniéndose 3 038,95 Kg/ha y 60,78 g/planta, respectivamente; estos valores no tuvieron diferencia significativa con el tratamiento con fertilizante químico (T5).

### Segunda

Se determinó la calidad de la vainita tomando en cuenta la longitud de vaina, donde no hubo diferencia significativa entre los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli* y el fertilizante químico; el peso promedio de vainas, en el cual los tratamientos con concentraciones de *Rhizobium etli* no tuvieron diferencia significativa entre ellos y los controles, siendo el T3 el de mejor efecto y, finalmente, en el número de vainas por planta la concentración de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml (T3), tuvo un mejor efecto entre los tratamientos inoculados con biofertilizante.

### **Tercera**

Se determinó que la concentración de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml (T3) tuvo un mejor efecto en la rentabilidad para la producción de *Phaseolus vulgaris* L., entre los tratamientos con *Rhizobium etli*, obteniéndose 60,30% de rentabilidad, siendo este valor similar al tratamiento con fertilizante químico (T5) en el que se reportó 63,70% de rentabilidad.

### **Cuarta**

Se estableció que la concentración de *Rhizobium etli*  $10^{10}$  cel/ml (T3) fue la más efectiva entre los tratamientos inoculados con biofertilizante, la cual no tuvo diferencia significativa con el tratamiento con fertilizante químico (T5), estos tratamientos generaron un mayor efecto en el rendimiento, calidad y rentabilidad de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de campo.

## **RECOMENDACIONES**

### **Primera**

Realizar investigaciones sobre aislamientos, estudios en biología molecular en cepas efectivas seleccionadas de bacterias con capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR), y posteriormente ser aplicadas como biofertilizantes conformados por cócteles microbianos que reemplacen total o parcialmente la fertilización nitrogenada y fosfórica.

### **Segunda**

Considerar para la aplicación del biofertilizante o inoculante líquido de *Rhizobium* un adherente, que garantice la mayor retención de bacterias en la superficie de las semillas antes de la siembra en campo.

### **Tercera**

Fomentar la agricultura sostenible con el desarrollo de técnicas amigables con el medio ambiente, a los efectos de disminuir el uso de insumos químicos altamente contaminantes para el suelo, agua, aire y el hombre.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, O., Rodríguez, E., Llano, A., Calderón, V., Flores, G., Viana, A., & Lépiz, R. (2001). Validación técnica de inoculantes en frijol con cepas de *Rhizobium* eficientes en fijación de nitrógeno en Centroamérica. *Agronomía Mesoamericana*, 12(001), 25-32. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx>

Alexander, M. (1994). *Introducción a la microbiología del suelo*. México D. F.: Editorial AGT Editor S. A.

Alfárez Mamani, E. (2009). *Efecto de la aplicación del bioestimulante Stimplex-G en el rendimiento de la vainita (Phaseolus vulgaris L.) bajo tres densidades de siembra en el sector de La Yarada Baja*. (Tesis inédita de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Altieri, M. & Yurjevic, A. (1990). Después de la revolución verde agricultura sostenible para el desarrollo. *Revista Agroecología y Desarrollo*, 4, 48. Recuperado de <http://.bibliociencias.cu/gsdll/collect/libros/index/assoc/HASH36ce.dir/doc.pdf>

An, D. S., Im, W. T., Yang, H. C., & Lee, S. T. (2006). *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of there classification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 443-448. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449455>

Ancco Oliva, I. (2007). *Evaluación de la fertilización con Azotobacter chroococcum, compost y fertilizante químico en la productividad y calidad de Lycopersicum esculentum Mill Var. Río Grande tomate en condiciones de campo*. (Tesis inédita de posgrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Asociación ecología, tecnología y cultura en los Andes. (2004). Rehabilitación de tierras degradadas. *Leisa Revista Agroecológica*, 10, 4. Recuperado de <http://www.leisa-al.org.pe/antecedentes/194/33.html>

Bailey, J. (Ed.). (1999). *The Penguin dictionary of plant sciences*. London: Penguin Books.

Barrios, F. & Siura, S. (1999). Efecto de diferentes concentraciones de biol aplicados foliarmente y al suelo en el cultivo de vainita

(*Phaseolus vulgaris* L.). V Congreso Nacional RAAA, 91-103.  
Recuperado de [http://www.cepes.org.pe/pdf/participacion\\_ciudadana\\_para\\_participacion\\_ciudadana\\_para\\_la\\_institucionalidad.pdf](http://www.cepes.org.pe/pdf/participacion_ciudadana_para_participacion_ciudadana_para_la_institucionalidad.pdf)

BCRP. (2013). *Caracterización del departamento de Tacna*. Lima: Banco Central de Reserva del Perú. Recuperado de <http://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Arequipa/Tacna->

Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Bioresource Technology*, 98, 3535-3546. Recuperado de [http://www.researchgate.net/publication/6469317\\_Agro-industrial\\_waste\\_materials\\_and\\_wastewater\\_sludge\\_for\\_rhizobial\\_inoculant\\_production\\_a\\_review](http://www.researchgate.net/publication/6469317_Agro-industrial_waste_materials_and_wastewater_sludge_for_rhizobial_inoculant_production_a_review)

Blevins, W. T., Feary, T. W., & Ohibbs, P. V. (1975). 6-phosphogluconate dehydratase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 121, 942-9. Recuperado de <http://hera.ugr.es/tesisugr/17162956.pdf>

Brom, S., García-de los Santos, A., Cervantes, L., Palacios, R., & Romero, D. (2000). In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons. *Plasmid*, 44(1), 34-43. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873525>

Burns, R. C. & Hardy, R. W. F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Molecular, Biology, Biochemistry, and Biophysics*, 21(1), 189. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/820962>

Canovas Cuenca, J. (1978). *Calidad agronómica de las aguas de riego*. Madrid: Publicaciones de Extensión Agraria.

Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). (1988). *Simbiosis Leguminosa - Rizobio: Manual de métodos de evaluación selección y manejo agronómico*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europaea* "olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34125279006>

Chipana Laura, V. (2003). *Optimización de parámetros para la producción de Rhizobium meliloti en una fermentación discontinua*. (Tesis inédita de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Constitución Política del Perú. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 31 de octubre de 1993.

Cunningham, S. & Walker, L. (1991). Chemical control of interstrain competition of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(7), 1886-92. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1892378>

D.S. 044-2006-AG Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 14 de julio del 2006.

D. S. N° 002-2008-MINAM Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 31 de julio del 2008.

D’Haeze, W. & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Oxford Journals Glycobiology*, 12(6), 79R-105R. Recuperado de <http://glycob.oxfordjournals.org/content/12/6/79R.full.pdf+html>

Da Silva, P. M., Tsai, S. M., & Bonetti, R. (1993). Respuesta a la inoculación y a la fertilización nitrogenada para incrementar la producción y la fijación biológica de nitrógeno en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant and Soil*, 152, 123-130. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00016341#page-1>

De Felipe, M. R. (2006). Fijación biológica de nitrógeno atmosférico en vida libre. En E., Bedmar, J., Gonzalo, C. Lluch & B., Rodelas (Eds.), *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones* (pp. 9-16). Granada: Sociedad Española de Microbiología (SEFIN). Recuperado de <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1585/Antonio.pdf?sequence=1>

De Felipe, A. M. (2009). *Bioteecnologías limpias en agricultura: Fijación biológica de nitrógeno Estructura-función de la simbiosis Rhizobium-leguminosa*. España: Real Academia Nacional de Farmacia.

Definición ABC. (s. f.). En glosario de términos de definición ABC. Recuperado de <http://www.definicionabc.com/economia/productividad.php>

Delgado de la Flor, F., Toledo, J., Casas, A., Ugás, R., & Siura, S. (1980). *Cultivos hortícolas: Datos básicos*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Díaz, L. M. & Varona, G. I. (2011). Comparación de la eficiencia de dos cepas de *Rhizobium phaseoli* sobre los rendimientos de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la EEVT de Camagüey. *Agrisost*, 1025-0247. Recuperado de [www.ucp.cm.rimed.cu/.../index.php?...](http://www.ucp.cm.rimed.cu/.../index.php?...)

Dworkin, M. (Editor-in-Chief), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (2006). *Prokariotes a handbook on the biology of bacteria*. USA: Erko Stackebrandt (Editors).

Eardly, B. D., Young, J. P., & Selander, R. K. (1992). Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Applied Environmental Microbiology*, 58(6), 1809–1815. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195688/>

Faga, H. & Ramos, M. (2006). *Cómo profundizar en el análisis de sus costos para tomar mejores decisiones empresariales*. Buenos Aires. Ediciones Granica S. A.

Faiguenbaum, H. (1993). *Curso de producción de leguminosas hortícola y maíz dulce*. Santiago: P.U. Católica de Chile.

Farmagro. (s. f.). En *vainita Jade de Farmagro*. Recuperado de <http://www.infrontsac.com/farmagro/producto.php?id=126-vainita-jade>

Ferrera-Cerrato, R, González-Chávez, M. C. A., & Rodríguez-Mendoza, Ma. N. (1993). *Manual de agromicrobiología*. México: Ed. Trillas S. A.

Flores, G., Hernández, J., Acosta, M., & Montero, M. (1999). Análisis económico de la utilización de inoculante biológico (*Rhizobium* sp.) en frijol común en la región Brunca, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 10(2), 37–41. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v10n02\\_037.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v10n02_037.pdf)

Font Quer, P. (1969). *Botánica general*. Barcelona: Editorial Labor.

Font Quer, P. (1985). *Diccionario de Botánica*. Barcelona: Editorial Labor.

Frank, P. & Simione, M. (1998). *Cryopreservation Manual Nalge Nunc International*. Recuperado de <http://www.nalgenelabware.com/technicaldata/technical/cryo.pdf>

Frioni, L. (1999). *Procesos microbianos*. Córdoba: Editorial de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Frioni, L. (2001). *Ecología microbiana del suelo*. Montevideo: Editorial Universidad de la República de Montevideo.

Gambetta Quelopana, L. (2007). *Efecto de tres niveles de nitrógeno y fósforo en dos variedades de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) en la*

*zona del valle viejo de Tacna*. (Tesis inédita de pregrado).  
Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F., & Velázquez, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* nodulated in Northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeography and evolutionary implications. *Can. J. Microbiol.*, 56(8): 657-666. doi: 10.1139 / w10-048.

Garrido, V. S. (1994). *Interpretación de análisis de suelos*. [Versión de Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente]. Recuperado de [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1993\\_05.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1993_05.pdf)

Garrity, G. M. (2005). *Bergey's Manual Trust*. Michigan: Springer.

Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413-441. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427.

Gobierno Regional Tacna & Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna. *Serie histórica de la producción agraria, comercio exterior e hidrología al 2010*. Tacna, Perú. Recuperado de [http://www.agritacna.gob.pe/informacion/Serie%20Historica%20de%20la%20Produccion%20al%20\\_2010.pdf](http://www.agritacna.gob.pe/informacion/Serie%20Historica%20de%20la%20Produccion%20al%20_2010.pdf)

González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra, J. S., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., & Dávila, G. (2005). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *PNAS*, 103(10), 3834-3839. doi: 10.1073pnas.0508502103

Google Earth. (2014). [INPREX de la UNJBG] [Coordenadas] Recuperado de <https://earth.google.es/>

Grageda-Cabrera, O., A., Esparza-García, F., & Peña-Cabriales, J. J. (2000). Environmental impact of nitrogen fertilizers in the Bajío región of Guanajuato state, Mexico. En G. Sánchez & E. Olguín (Eds), *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses* (pp. 45-54). London: Taylor & Francis.

Grajeda Castillo, D. (2008). *Aislamiento y selección de cepas nativas de Rhizobium spp. con mayor capacidad de biofertilizante en Phaseolus vulgaris (vainita) de Los Palos –Tacna*. (Tesis inédita de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Grant, W. D. & Long P. (1989). *Microbiología ambiental*. Zaragoza: Editorial Acribia S. A.

Guerra, T. J. & Garcés-Restrepo, C. (1996). *Perfil de riego de la República del Perú*. Lima: Instituto de Promoción para la Gestión del Agua e Instituto Internacional de Manejo de la Irrigación.

Haukka, K., Lindstrom, K., & Young, J. P. (1998). Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied Environmental Microbiology*, 64(2), 419–426. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464375>

Hernández, S. L. & Batista, S. J. (2013). Efectos de *Rhizobium* en el rendimiento del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la CCS

Sabino Pupo del Municipio Manatí. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*, 1-22. Recuperado de <http://xn--caribea-9za.eumed.net/wp-content/uploads/frijol.pdf>

Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, Ma. L., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(2), 95-104. Recuperado de [www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802013000200002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802013000200002)

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Sfaley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Infoagro. (s. f.). *El cultivo de la judía, habichuela o frijol (Parte I) de Infoagro Systems*. Recuperado de [http://www.infoagro.com/documentos/el\\_cultivo\\_judia\\_\\_habichuela\\_o\\_frijol\\_\\_parte\\_i\\_.asp](http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_judia__habichuela_o_frijol__parte_i_.asp)

INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (14 de mayo del 2011). Biofertilizantes. *INIFAP*. Recuperado de [www.inifap.gob.mx](http://www.inifap.gob.mx)

Integrated Taxonomic Information System – ITIS (2011). *Taxa taken from Fabaceae of North America update*. [Versión ITIS database]. Recuperado de [www.itis.gov](http://www.itis.gov)

Imas, P. (2005). El potasio: nutriente esencial para aumentar el rendimiento y la calidad de las cosechas. *ICL Fertilizers*, 1-5. Recuperado de [http://www.iclfertilizers.com/Fertilizers/Knowledge%20Center/El\\_potasio,\\_un\\_nutriente\\_esencial.pdf](http://www.iclfertilizers.com/Fertilizers/Knowledge%20Center/El_potasio,_un_nutriente_esencial.pdf)

James, D. W., Hanks, R. J., & Jurinak, J. J. (1982). *Modern irrigated soils*. New York: John Wiley & Sons.

Jordan, D. C. (1984). Family III, *Rhizobiaceae*. En N. R., Kreig & J. G., Holt (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp.234-242). Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2008). The genus name *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name “*Sinorhizobium adhaerens*” is not validly published. *International*

*Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 58, 1973.

Recuperado de <http://ijs.sgmjournals.org/content/59/4/921.full>

Kass, D. (1998). *Fertilidad de suelos*. [Versión de Google Books].

Recuperado de [books.google.com.pe/books?isbn=9977648891](http://books.google.com.pe/books?isbn=9977648891)

Keyser, H. (1999). *Liquid Inoculant Development Research* (Summary II).

Hawaii: Niftal Project University of Hawaii.

Koes, R. E., Quattrocchio, F., & Mol, J. N. M. (1994). The flavonoid

biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *Bioessays*,

16, 123–132. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59301/>

Kuykendall, L. D. (2005). Order VI. Rhizobiales ord. nov. En *Bergey's*

*Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria, part C (the alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria)* (pp. 324). New

York: Springer.

Kuykendall, D., Young, J., Martínez, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2005).

*Rhizobium*. En Frank, *Bergeys Manual of Sistematic Bacteriology*

(pp. 325-340). US: Editorial Springer.

Lexicoon. (s. f.). *En diccionario de definiciones y sinónimos*. Recuperado de <http://lexicoon.org/es/papilionaceo>

Ley N° 26842 Ley General de Salud. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 20 de julio de 1997.

Ley N° 28611 Ley General del Ambiente. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 13 de octubre del 2005.

Ley N° 29196 Ley de la Promoción Orgánica Ecológica. Diario Oficial El Peruano, Lima, Perú, 24 de enero del 2008.

Libélula. (2011). *Diagnóstico de la agricultura en el Perú* (informe final). Lima: Libélula.

Lloret, L. & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 43–60. Recuperado de [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-1\\_2f.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2005/mi05-1_2f.pdf)

Loayza, S. & Siura, S. (2006). *Productividad de seis cultivares de vainita (Phaseolus vulgaris L.) en un sistema de producción orgánico y*

*rotación con crotalaria (Crotalaria juncea L.).* (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperado de: <http://www.lamolina.edu.pe/hortalizas/Investigacion/Tesis/Tesis%20Sustentadas/Resumen%20Sara%20Loayza.pdf>

Maas, E. V. & Hoffman, G. J. (1977). Crop salt tolerance - current assessment. *J. Irrigation Drainage Engineering Div. ASCE*, 103(IR2), 115-134.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1999). *Brock biología de los microorganismos*. Madrid: Ed. Prentice Hall.

Mahecha, L. (2002). El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria*, 15(2), 226-231. Recuperado de <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Mis%20documentos/Downloads/Dialnet-EISilvopastoreoUnaAlternativaDeProduccionQueDismin-3242906.pdf>

Malakouti, M., Navabzadeth, M. & Hashemi, S. H. R. (1999). The effect of differents amounts of N-fertilizer on the nitrate accumulation in the edible parts of vegetables. En: D. Anac & P. Martin-Prevel (Eds.),

*Improved Crop Quality by Nutrien Mnagement* (pp. 43-45). London:  
Kluwer Academic Publisher.

Marín, V. A., Baldani, V. L., Dos Santos, R., & Baldani, I. J. (2003). *Fijación biológica de nitrógeno; bacterias de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical*. Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.

Martínez, J. & López, I. (1999). *Rhizobium y su destacada simbiosis en plantas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez, E. & Martínez, J. (2000). *Biología de Azotobacter vinelandii*. México: Universidad Autónoma de México.

Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 417-426. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715738>

Martínez, S. L. & Serra, A. J. (2008). *Estudio de la calidad agronómica del agua de riego de las Islas Baleares*. España: Dirección General del Recursos Hídricos.

Medina Bedoya, P. (2012). *Efecto del compost inoculado con bacterias de los géneros Azotobacter y Novosphingobium fijadoras de nitrógeno en el rendimiento del olivo (Olea europaea L.) en La Yarada-Tacna- 2011-2012*. (Tesis inédita de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

Mergaert, J. & Swings, J. (2005). Family IV. Phyllobacteriaceae fam. nov. En D. J., Brenner, N. R., Krieg, J. T., Staley, & G. M., Garrity (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria) (pp. 393). New York: Springer.

Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., & Amarger, N. (2002). Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 41(1), 77-84. doi: 10.1111 / j.1574-6941.2002.tb00968.x.

MINAG. (2012). *La vainita* boletín N° 81-13. Lima: Dirección Regional Agraria Lima del MINAG. Recuperado de <http://vizcarraproyectos.com/web/la-vainita/>

Ministerio de Agricultura. (1999). *Producción hortofrutícola*. Lima: Impreso en los talleres gráficos de la Oficina de Información Agraria (OIA).

Miyadi, H. A. & López, M. (2013). Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre una variedad local de *Phaseolus vulgaris*, en Valladolid, edo. Aragua. *Venesuelos*, 20, 31-39. Recuperado de [www.sian.inia.gob.ve/repositorio/congresos/CVCS19/propiedades\\_PROCESOS/pps27.pdf](http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/congresos/CVCS19/propiedades_PROCESOS/pps27.pdf)

Mora, F. (1995). Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 6, 68-74. Recuperado de [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v06n01\\_068.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v06n01_068.pdf)

Morón, B., Dardanelli, M. S., Sousa, C., & Megías, M. (2006). Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. En E. Bedmar, J., Gonzalo, C., Lluch, B., Rodelas (Eds.), *Fijación de nitrógeno*,

*fundamentos y aplicaciones* (pp. 160-171). Granada: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-50. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418858>

Mumns, D. N. (1987). Nitrogen fixation potential of bean (*P. vulgaris*) compared with other grains legumes under controlled conditions. *Plant and Soil*, 98(2): 169-182.

Newton, W., Fisher, K., & Leigh, G. F. (Ed.). (2002). *Nitrogen Fixation-A general overview in nitrogen fixation at the millenium*. Brighton: Elsevier Publications.

Ochman, H. & Morán, N. A. (2001). Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science*, 292, 1096-1099. doi: 10.1126 / science.1058543

Olivares, J. (2008). Fijación biológica de nitrógeno. *Estación Experimental del Zaidín CSIC*, 1–8. Recuperado de <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijación/>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
FAO. (1995). *Manual técnico de la fijación simbiótica de nitrógeno leguminosa/Rhizobium*. [Versión en Google books]. Recuperado de <http://books.google.com.pe/books?isbn=9253031999>

Peralta, E., Murillo, A., Mazón, N., Monar, C., Pinzón, J., & Rivera, M. (2010). *Manual agrícola de frijol y otras leguminosas. Cultivos, variedades y costos de producción*. Quito: Publicación Miscelánea No. 135.

Piha, M. & Mumns, D. (1987). Sensitivity of the common bean (*P. vulgaris*) symbiosis to high soil temperature. *Plant and Soil*, 98(2), 183-194.

Ramanathan, V., Cicerone, R. J., Singh, H. B., & Kiehl, J. T. (1985). Trace gas trends and their potential role in climate change. *J. Geophys. Res.*, 90, 5547-5566.

Ramírez-Bahena, H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889 AL, *R. phaseoli* 1926 AL and *R. trifolii* Dangeard 1926 AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum* DSM 30132T (=NCIMB 11478T) as the novel species *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58(11), 2484-2490. doi: 10.1099 / ijs.0.65621-0.

Ramos, T. Y. (2011). *Glosario de botánica- biología*. Recuperado de <http://es.slideshare.net/YonniGuillermoRamosTovar/glosario-de-botnica-y-fisiologa>

Schwartz, F., H. & Gálvez, E. G. (1980). *Problemas de producción del frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Segovia, L., Young, J. P. & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43(2),

374–377. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8494746>

Sessitch, A., Howieson, J. G., Perret, X., Antoun, H., & Martínez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews In Plant Sciences*, 21(4), 323–378. Recuperado de <http://www.basihanfoundation.org/hani/hanirrhizobiumresearch.pdf>

Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. & Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 884-893. doi: 10.1128/AEM.69.2.884-893.2003

Silvera, P. C., Zúñiga, D. D., & Loli, F. O. (2005). Capacidad solubilizadora del fósforo por cepas de *Rhizobium* aisladas de los nódulos del frijol caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Anales Científicos*, 60, 1–11. Recuperado de [www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf.../LX\(1\).pdf](http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf.../LX(1).pdf)

Silvester, R. (1983). Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas: aspectos agronómicos relacionados con su nodulación de *Rhizobium*. *Suelos Ecuatoriales*, 13(2), 28-35.

Silvester, R., Kipe, J., & Harris, D. (1987). *Simbiosis leguminosa-rizobio: evaluación, selección y manejo*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Sociedad Nacional de Industrias. (2012, 5 de junio). Ficha técnica vainita. *Sociedad Nacional de Industrias*. Recuperado de [www.sni.org.pe/downloads/fichas\\_tecnicas/VAINITA.doc](http://www.sni.org.pe/downloads/fichas_tecnicas/VAINITA.doc)

Sorensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 700–710. doi: 10.1038/nrmicro1232

Soriano, B. B. & González, V. A. (2012). Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre el crecimiento vegetal de pprika, *Capsicum annuum* var. Longum, y lechuga, *Lactuca sativa*. *REBIOL*, 32, 31-41. Recuperado de file:///C:/Documents%20and%20Settings/Ad

ministrador/Mis%20documentos/Downloads/Efecto%20de%20la%  
20inoculaci%C3%B3n%20de%20Rhizobium%20etli%20(2).pdf

Sullivan, J. T., Heather, N. P., Lowther, W. L., Scott, D. B., & Ronson, C. W. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8985-8989. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41092/>

Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., Mc Callum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., De Bruijn, F. J., & Ronson, C. W. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.*, 184(11), 3086–3095. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003951>

Suquilanda, M. (1995). *El biol fitoestimulante orgánico*. Ecuador: Editorial FUNDAGRO.

Takeuchi, M., Hamana, K., & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 51(4), 1405–1417. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491340>

Thompson, J. A. (1980). Production and quality control of legume inoculants. En: F. J. Bergersen (Ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation* (pp. 489-543). New York: J. Wiley & Sons.

Toledo, H. J. (2003). *Cultivo de vainita*. Lima: Instituto Nacional de Investigación Agraria.

Torres, G. R., Soria, A. E., Pérez, N. C., & García, I. J. (2002). Incrementos en la fijación biológica de N<sub>2</sub> atmosférico en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la inoculación combinada de bacterias diazotróficas. *Eco Portal Net*. Recuperado de [http://www.ecoportal.net/Temas\\_Especiales/Salud/Incrementos\\_en\\_la\\_Fijacion\\_de\\_N2\\_en\\_el\\_Cultivo\\_del\\_Frijol](http://www.ecoportal.net/Temas_Especiales/Salud/Incrementos_en_la_Fijacion_de_N2_en_el_Cultivo_del_Frijol)

Ugás, R., Siura, S., Delgado de la Flor, Casas, A., & Toledo, J. (1998). *Hortalizas datos básicos, Programa de Investigación en Hortalizas*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Unión Europea (UE), el Gobierno de Nicaragua, & FAO. *Informe de resultados de parcelas comparativas con uso de inoculante (Nitronat) en frijol común (Phaseolus vulgaris) (con uso de inoculante vs. sin inoculante)*, 2011. Nicaragua. Recuperado de [http://www.redsicta.org/rhizobium\\_Pdf/InoculacionZona](http://www.redsicta.org/rhizobium_Pdf/InoculacionZona)

Vela Cantos, K. (2010). *Caracterización física, química y nutricional de la vainita (Phaseolus vulgaris), en diferentes suelos edafoclimáticos, cultivados a campo abierto e invernadero, como un aporte a la norma INEN "Vainita Requisitos"*. (Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica Equinoccial). Recuperado de [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5330/1/40765\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5330/1/40765_1.pdf)

Vélez, A. (1999). *Técnicas agroecológicas en el cultivo de la vainita*. (Informe N° 1 de Prácticas Preprofesionales). Tacna. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I. B. P. Handbook N° 15*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Vincent, J. M. (1975). *Manual práctico de rizobiología*. Argentina: Editorial Hemisferio Sur.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular*. Recuperado de <http://medbioqui11.files.wordpress.com/2011/04/viapentosas.pdf>

Wolska, K. I. (2003). Horizontal DNA transfer between bacteria in the environment. *Acta Microbiológica Polónica*, 52(3): 233-243. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743976>

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89–103.

Recuperado de [http://www.gastronet.it/scientifico/medline/ricerca.html?list\\_uids=11211278](http://www.gastronet.it/scientifico/medline/ricerca.html?list_uids=11211278)

Zúñiga, D. D. (2008). *Manual de microbiología agrícola: Rhizobium, PGPR, indicadores de fertilidad e inocuidad*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Zurdo-Piñeiro, J. L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. y Van Berkum, P. (2009). Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain. *Appl Environ Microbiol* 75: 2354-2359.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1.** Composición de medios de cultivo y soluciones

### **Medio Extracto de Levadura Manitol (ALM)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,4 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1000 ml
Agar	15 g
Colorantes*	
pH	6,8

\*Solución acuosa de Rojo Congo al 10 ml/l de ALM 0,0025%.

\*Azul de Bromotimol al 0,5% en alcohol al 5 ml/l de ALM 70%.

Para mantenimiento de cepa se agrega al medio ALM 3,0 g de Carbonato de Calcio y sin Rojo Congo.

**Medio Peptona Glucosa con el indicador Púrpura de Bromocresol  
(PGPBC)**

Glucosa	5,00 g
Peptona	10,00 g
Agar	15,00 g
Solución etanólica de Púrpura de Bromocresol al 1%	10,00 ml
Agua destilada	1000 ml
pH	6,8

**Medio Levadura Lactosa Agar (LLA)**

Lactosa	10,00 g
Extracto de levadura	0,50 g
$K_2HPO_4$	0,50 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
NaCl	0,20 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6,8

### **Medio Luria Bertani (LB)**

Triptona o peptona	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
NaCl	5,00 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6,8 - 7,0

Se ajusta el pH y se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 lbf/plg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos.

### **Medio Leche Tornasolada**

Leche descremada UHT	1000 ml
Papel de tornasol	

## Anexo 2.

**Tabla 3.**

Caracterización morfológica de colonias de *Rhizobium etli* en ALMRC

Característica evaluada	Resultado
Velocidad de crecimiento (días)	2
Diámetro (mm)	3
Textura	Ligoso cremoso
Apariencia	Opaca
Color	Blanca
Elevación	Convexa
Forma	Redonda
Borde	Liso
Goma	Abundante

Fuente: Elaboración propia, marzo 2014.

En esta tabla se observan las características morfológicas que son típicas de una cepa pura de *Rhizobium*, se destaca la producción de expolisacárido o goma abundante.

### Anexo 3.

#### Tabla 4.

Caracterización fisiológica y bioquímica de *Rhizobium etli*

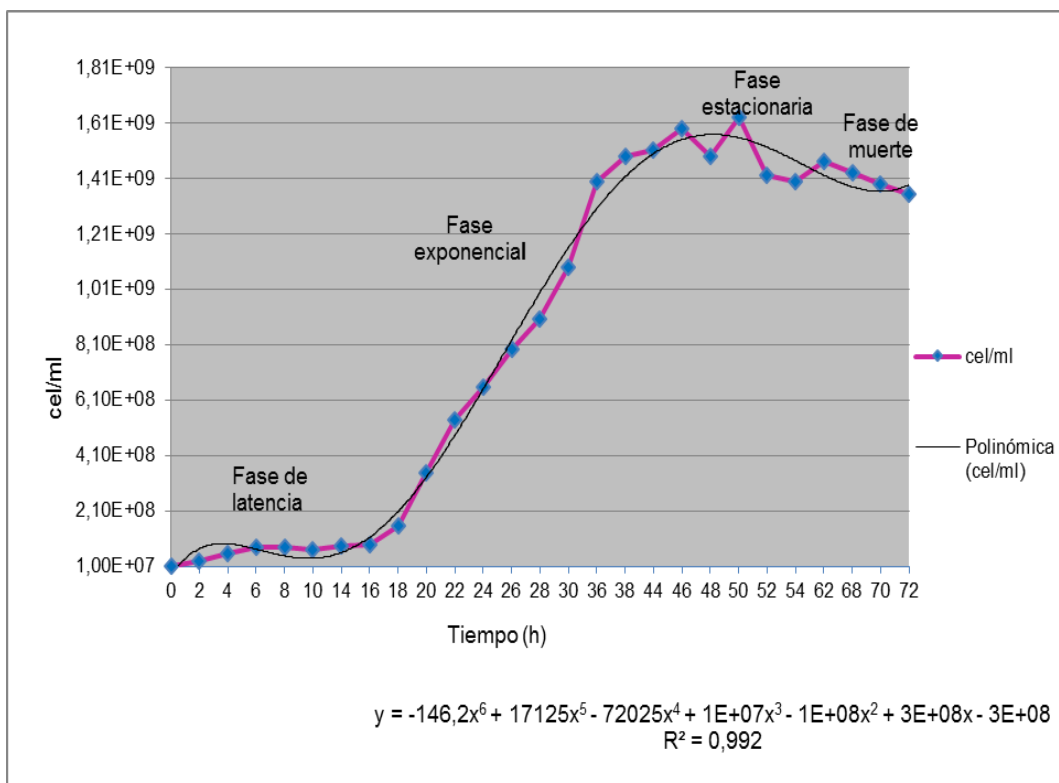
Crecimiento				Reacción ALMAB	Reacción de Benedict	Prueba de la catalasa
APGPB	ALL	LB	Leche tornasolada			
(-)	(+)	(-)	(-)	Acidez	(-)	(+)

Fuente: Elaboración propia, marzo 2014.

Nota: (+) positivo, (-) negativo.

Se observan los resultados de las pruebas realizadas, que garantizan la pureza de la cepa empleada, además la reacción en el medio ALMAB fue para ver la acidez que es característica de una cepa de crecimiento rápido como *Rhizobium etli*.

**Anexo 4.** Monitoreo del crecimiento de *Rhizobium etli* en ALM por 72 horas



**Figura 2.** Curva de crecimiento de *Rhizobium etli*

Fuente: Tabla 5.

Se observa un típico crecimiento bacteriano expresado aritméticamente, donde se diferencian las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.

**Tabla 5.**

Lecturas de conteos directos de *Rhizobium etli*

Tiempo (h)	cel/ml	Tiempo (h)	cel/ml	Tiempo (h)	cel/ml
0	$1,00 \times 10^7$	20	$3,47 \times 10^8$	46	$1,59 \times 10^9$
2	$3,10 \times 10^7$	22	$5,39 \times 10^8$	48	$1,49 \times 10^9$
4	$5,60 \times 10^7$	24	$6,58 \times 10^8$	50	$1,63 \times 10^9$
6	$7,75 \times 10^7$	26	$7,95 \times 10^8$	52	$1,42 \times 10^9$
8	$8,00 \times 10^7$	28	$9,03 \times 10^8$	54	$1,40 \times 10^9$
10	$7,08 \times 10^7$	30	$1,09 \times 10^9$	62	$1,47 \times 10^9$
14	$8,13 \times 10^7$	36	$1,40 \times 10^9$	68	$1,43 \times 10^9$
16	$8,85 \times 10^7$	38	$1,49 \times 10^9$	70	$1,39 \times 10^9$
18	$1,55 \times 10^8$	44	$1,51 \times 10^9$	72	$1,35 \times 10^9$

Fuente: Elaboración propia, marzo 2014.

Se observa la cinética de crecimiento de la cepa *Rhizobium* durante 72 horas, la cuantificación se realizó en cámara de Neubauer.

**Anexo 5.** Cálculo del tiempo de generación (G) de *Rhizobium etli*

$$G=t/n$$

Donde:

t= tiempo transcurrido en la fase exponencial para llegar de x a y

n= n° de generaciones

$$n= 3,3 \log y/x$$

Donde:

x= n° de bacterias en tiempo 0

Y= n° de bacterias al tiempo t

De acuerdo a lo obtenido en la Figura 2 y la Tabla 5, se tiene que:

$$x= 1,55 \times 10^8 \text{ cel/ml}$$

$$y= 1,59 \times 10^9 \text{ cel/ml}$$

$$t= 28 \text{ horas}$$

$$n= 3,3 \log \frac{1,59 \times 10^9}{1,55 \times 10^8}$$

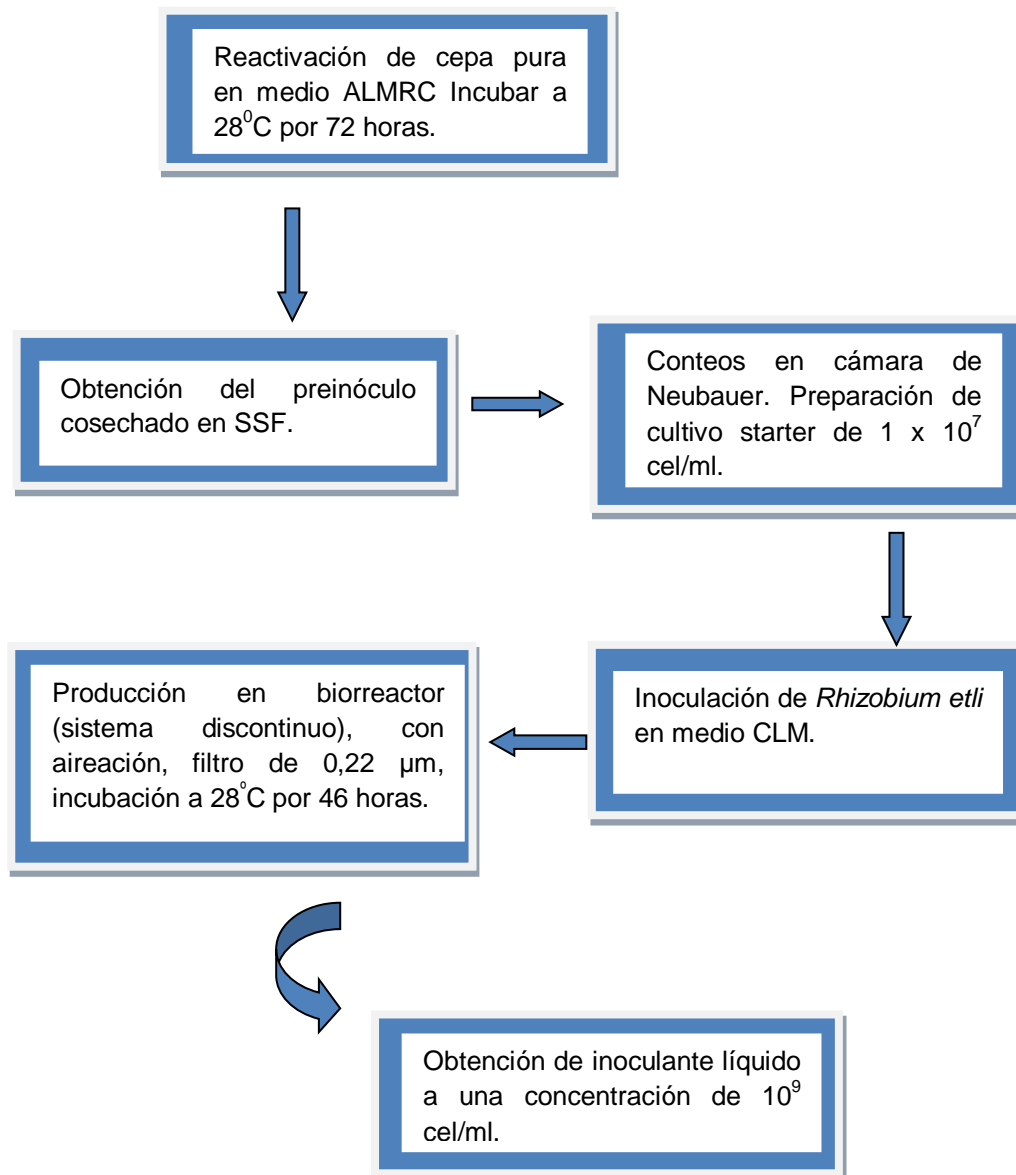
$$n= 16,537 \text{ generaciones}$$

Finalmente, G (tiempo requerido para que una célula se divida en dos) fue el siguiente:

$$G = \frac{28}{16,537}$$

$$G= 1,69 \text{ horas } \sim 101,590 \text{ minutos.}$$

## Anexo 6.



**Figura 3.** Esquema de la producción a escala de laboratorio (1 l) de biofertilizante de *Rhizobium etli*

Fuente: Elaboración propia, setiembre 2014.

**Anexo 7.**

**Tabla 10.**

Nódulos efectivos e inefectivos en raíces de plantas de vainita

Tratamientos	Nódulos		
	Efectivos	Inefectivos	Totales
	Nº	Nº	Nº
1	12	6	18
2	31	11	42
3	265	66	331
4	45	9	54
5	36	27	63
6	18	15	33

Fuente: Elaboración propia, mayo 2014.

Se observan diferencias en la nodulación presentada en los tratamientos, esta evaluación representa los parámetros de fijación de nitrógeno, destacándose que el mayor número de nódulos efectivos se reportó en el T3.

## Anexo 8.

**Tabla 11.**

Composición química del biol

Componente	Unidad	Resultado
pH	ud.	7,69
C.E.	dS/m	19,80
Sólidos totales	g/l	12,96
M. O. en solución	g/l	5,88
N	mg/l	1 799,00
P	mg/l	50,22
K	mg/l	2 312,50
Ca	mg/l	229,50
Mg	mg/l	218,80
Na	mg/l	1 250,00

Fuente: Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, setiembre 2013.

Se observan los resultados de la composición química del biol aplicado foliarmente en *Phaseolus vulgaris* L. para esta investigación.

## Anexo 9.

**Tabla 24.**

Rendimiento en kilogramos por hectárea del cultivo de vainita

Tratamientos	Bloques			Promedios cm
	I	II	III	
T1	2 031,950	2 125,000	1 777,800	1 978,25
T2	2 067,000	3 075,000	2 570,600	2 570,87
T3	2 899,350	2 962,500	3 255,000	3 038,95
T4	1 523,500	1 569,000	1 340,250	1 477,58
T5	3 250,500	2 507,500	3 760,400	3 172,80
T6	1 327,450	990,500	1 055,850	1 124,60

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

## Anexo 10.

**Tabla 25.**

Rendimiento por planta de vainita (g)

Tratamientos	Bloques			Promedios cm
	I	II	III	
T1	40,639	42,500	35,556	39,57
T2	41,340	61,500	51,412	51,42
T3	57,987	59,250	65,100	60,78
T4	30,470	31,380	26,805	29,55
T5	65,010	50,150	75,208	63,46
T6	26,549	19,810	21,117	22,49

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

### Anexo 11.

#### Tabla 26.

Longitud de vaina (cm)

Tratamientos	Bloques			Promedios cm
	I	II	III	
T1	13,97	14,76	13,78	14,17
T2	13,77	14,42	14,57	14,25
T3	13,98	14,63	13,91	14,17
T4	13,84	13,81	13,74	13,80
T5	14,35	14,38	14,52	14,42
T6	13,50	13,84	13,28	13,54

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

### Anexo 12.

#### Tabla 27.

Peso promedio de vaina (g)

Tratamientos	Bloques			Promedios cm
	I	II	III	
T1	6,33	6,04	5,54	5,97
T2	6,09	6,02	5,74	5,95
T3	6,04	6,36	5,72	6,04
T4	5,67	5,61	5,92	5,73
T5	6,21	6,57	6,22	6,33
T6	5,07	5,67	5,75	5,50

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

### Anexo 13.

**Tabla 28.**

Número de vainas por planta

Tratamientos	Bloques			Promedio
	I	II	III	
T1	7,30	8,50	7,40	7,73
T2	12,26	14,20	9,70	12,05
T3	10,00	13,80	12,78	12,19
T4	6,10	5,80	5,50	5,80
T5	12,65	10,60	15,30	12,85
T6	5,20	4,00	4,00	4,40

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

### Anexo 14.

**Tabla 29.**

Altura de la planta a los 60 días (cm)

Tratamientos	Bloque			Promedio
	I	II	III	
T1	19,72	24,75	16,90	20,46
T2	18,03	27,47	18,55	21,35
T3	24,95	23,30	20,78	23,01
T4	14,43	13,21	16,95	14,86
T5	20,58	22,20	27,94	23,57
T6	14,85	14,23	15,18	14,75

Fuente: Elaboración propia, julio 2014.

## Anexo 15.

### Tabla 30.

Diferencias entre nodulación efectiva e inefectiva

Nódulos efectivos	Nódulos inefectivos
Pocos y situados sobre todo en la raíz primaria y las raíces superiores secundarias.	Numerosos y repartidos en todo el sistema radical.
Voluminosos de superficie lisa o rugosa.	Pequeños de superficie lisa, con presencia de gránulos de almidón.
Actividad meristemática y nodular prolongada.	Actividad meristemática y nodular corta.
Infección generalizada, zona grande bacteriana con bacteroides.	Pocas células infectadas, pocos o sin bacteroides.
Interior rojo o rosado por la leghemoglobina	No pigmentados de rojo

Fuente: Frioni, 1999.

## Anexo 16.

**Tabla 31.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 1

Plantas/ha: 50 000			Moneda: Nuevo Sol	
Marco de siembra: 1 x 1 m			Edad cultivo: 60 días	
Nivel tecnológico: Alto				
Sistema de conducción: Riego por goteo				
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
<b>I. Horas maquinaria</b>				
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00
				<b>315,00</b>
<b>II. Mano de obra</b>				
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00
Fertilización	Jornal	2	50,00	100,00
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00
Cosecha	Jornal	44	50,00	2 200,00
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00
				<b>4 350,00</b>
<b>III. Insumos</b>				
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00
Estiércol	Kg	10 000,00	0,10	1 000,00
Biofertilizante <i>Rhizobium etli</i> (10 <sup>8</sup> cel/ml)	l	0,0717	5,023	0,3601
Fosfato diamónico	Kg	173,90	1,70	295,63

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Sulfato de potasio	Kg	34,00	3,00	102,00
Superwet	l	1,23	19,00	23,37
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65
Furia	l	0,36	120,00	43,20
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,18	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>2 981,98</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m <sup>3</sup>	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				442,36
			<b>Totales</b>	<b>8 089,34</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				404,47
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 493,80</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 17.

**Tabla 32.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 2

Plantas/ha:		50 000	Moneda:		Nuevo Sol
Marco de siembra:		1 x 1 m	Edad cultivo:		60 días
Nivel tecnológico:		Alto			
Sistema de conducción:		Riego por goteo			
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.	
<b>I. Horas maquinaria</b>					
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00	
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00	
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00	
<b>II. Mano de obra</b>					<b>315,00</b>
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00	
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00	
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00	
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00	
Fertilización	Jornal	2	50,00	100,00	
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00	
Cosecha	Jornal	44	50,00	2200,00	
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00	
<b>III. Insumos</b>					<b>4 350,00</b>
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00	
Estiércol	Kg	10 000,00	0,10	1 000,00	
Biofertilizante <i>Rhizobium etli</i> (10 <sup>9</sup> cel/ml)	l	0,0717	50,23	3,600	
Fosfato diamónico	Kg	173,90	1,70	295,63	
Sulfato de potasio	Kg	34,00	3,00	102,00	
Superwet	l	1,23	19,00	23,37	

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65
Furia	l	0,36	120,00	43,20
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,179	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>2 985,22</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m <sup>3</sup>	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				<b>442,36</b>
			<b>Totales</b>	<b>8 092,58</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				<b>404,63</b>
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 497,20</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 18.

**Tabla 33.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 3

Plantas/ha:		50 000	Moneda:		Nuevo Sol
Marco de siembra:		1 x 1 m	Edad cultivo:		60 días
Nivel tecnológico:		Alto			
Sistema de conducción:		Riego por goteo			
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.	
<b>I. Horas maquinaria</b>					
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00	
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00	
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00	
<b>II. Mano de obra</b>					<b>315,00</b>
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00	
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00	
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00	
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00	
Fertilización	Jornal	2	50,00	100,00	
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00	
Cosecha	Jornal	44	50,00	2200,00	
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00	
					<b>4 350,00</b>
<b>III. Insumos</b>					
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00	
Estiércol	Kg	10 000,00	0,10	1 000,00	
Biofertilizante <i>Rhizobium etli</i> (10 <sup>10</sup> cel/ml)	l	0,0717	502,30	36,00	
Fosfato diamónico	Kg	173,90	1,70	295,63	
Sulfato de potasio	Kg	34,00	3,00	102,00	

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Superwet	l	1,23	19,00	23,37
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65
Furia	l	0,36	120,00	43,20
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,179	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>3 017,62</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m3	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				<b>442,36</b>
			<b>Totales</b>	<b>8 124,97</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				<b>406,25</b>
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 531,22</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 19.

**Tabla 34.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 4

Plantas/ha: 50 000				Moneda:	Nuevo Sol
Marco de siembra: 1 x 1 m				Edad cultivo:	60 días
Nivel tecnológico: Alto					
Sistema de conducción: Riego por goteo					
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.	
<b>I. Horas maquinaria</b>					
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00	
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00	
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00	
				<b>315,00</b>	
<b>II. Mano de obra</b>					
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00	
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00	
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00	
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00	
Fertilización	Jornal	2	50,00	100,00	
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00	
Cosecha	Jornal	44	50,00	2200,00	
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00	
				<b>4 350,00</b>	
<b>III. Insumos</b>					
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00	
Estiércol	Kg	10000,00	0,10	1000,00	
Fosfato diamónico	Kg	173,90	1,70	295,63	
Sulfato de potasio	Kg	34,00	3,00	102,00	
Superwet	l	1,23	19,00	23,37	

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65
Furia	l	0,36	120,00	43,20
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,179	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>2 981,62</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m <sup>3</sup>	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				<b>442,36</b>
			<b>Totales</b>	<b>8 088,98</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				<b>404,45</b>
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 493,42</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 20.

**Tabla 35.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 5

<b>Plantas/ha: 50 000</b> <b>Marco de siembra: 1 x 1 m</b> <b>Nivel tecnológico: Alto</b> <b>Sistema de conducción: Riego por goteo</b>				<b>Moneda: Nuevo Sol</b> <b>Edad cultivo: 60 días</b>
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
<b>I. Horas maquinaria</b>				
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00
				<b>315,00</b>
<b>II. Mano de obra</b>				
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00
Fertilización	Jornal	4	50,00	200,00
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00
Cosecha	Jornal	44	50,00	2 200,00
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00
				<b>4 450,00</b>
<b>III. Insumos</b>				
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00
Estiércol	Kg	10 000,00	0,10	1 000,00
Urea	Kg	84,10	1,40	117,74
Fosfato diamónico	Kg	173,90	1,70	295,63
Sulfato de potasio	Kg	34,00	3,00	102,00
Superwet	l	1,23	19,00	23,37
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Furia	l	0,36	120,00	43,20
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,179	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>3 099,36</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m <sup>3</sup>	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				<b>442,36</b>
			<b>Totales</b>	<b>8 306,72</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				<b>415,34</b>
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 722,05</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 21.

**Tabla 36.**

Costo de producción del cultivo de vainita en el tratamiento 6

Plantas/ha:		50 000	Moneda:		Nuevo Sol
Marco de siembra:		1 x 1 m	Edad cultivo:		60 días
Nivel tecnológico:		Alto			
Sistema de conducción:		Riego por goteo			
Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.	
<b>I. Horas maquinaria</b>					
Arado	h/máquina	4	45,00	180,00	
Rastra	h/máquina	2	45,00	90,00	
Surqueo	h/máquina	1	45,00	45,00	
					<b>315,00</b>
<b>II. Mano de obra</b>					
Siembra	Jornal	8	50,00	400,00	
Deshierbo	Jornal	11	50,00	550,00	
Desahije	Jornal	2	50,00	100,00	
Tendido de cintas	Jornal	2	50,00	100,00	
Aplicaciones de biol	Jornal	3	50,00	150,00	
Control fitosanitario	Jornal	8	50,00	400,00	
Cosecha	Jornal	44	50,00	2 200,00	
Riegos	Jornal	10	50,00	500,00	
					<b>4 400,00</b>
<b>III. Insumos</b>					
Semilla	Kg	43,00	12,00	516,00	
Estiércol	Kg	10 000,00	0,10	1 000,00	
Biol	l	105,45	2,00	210,91	
Superwet	l	1,23	19,00	23,37	
Farmathe	Kg	0,89	85,00	75,65	
Furia	l	0,36	120,00	43,20	
Lorsban 4E	l	0,54	45,00	24,30	

Descripción	Unidad	Cantidad	P. unitario S/.	Subtotal S/.
Abamex	l	0,54	95,00	51,30
Gerónimo	Kg	0,13	600,00	78,00
Proclaim	Kg	0,36	600,00	216,00
Coragen	l	0,179	1230,00	220,17
Confi BT ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki)	Kg	0,60	60,00	36,00
<i>Crisoperla carnea</i>	millar	30	7,00	210,00
Trampa amarilla	ud.	60	1,50	90,00
				<b>2 794,90</b>
<b>IV. Otros gastos</b>				
Agua de riego	m <sup>3</sup>	819,00	0,0224	18,35
Movilidad		192	0,70	134,40
Electricidad	KW	659,54	0,4391	289,60
				<b>442,36</b>
			<b>Totales</b>	<b>7 952,25</b>
<b>V. Imprevistos 5%</b>				<b>397,61</b>
<b>Total (Costo producción por ha)</b>			<b>S/.</b>	<b>8 349,87</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre del 2014.

Costo agua m<sup>3</sup>: S/. 0,02240939

Costo KWh S/. 0,4391 motor INPREX

## Anexo 22.

Tabla 37.

Costo de producción de biofertilizante de *Rhizobium etli* a escala piloto (100 l)

Actividad	Descripción	Cantidad	Precio unitario s/.	Subtotal S/.
Reactivación y conteo microbiano	<b>Medio ALMRC y SSF + tween al 0,1%</b>			
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 500 g	0,0525	200,00	0,021
	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O x 500 g	0,021	200,00	0,008
	CaCl <sub>2</sub> x 500 g	0,042	200,00	0,017
	NaCl x 500 g	0,5205	45,00	0,047
	Extracto de levadura x 500 g	0,0525	180,00	0,019
	D-Manitol x 500 g	1,05	120,00	0,252
	Agar agar x 500 g	2,1	265,00	1,113
	Rojo Congo x 5 g	0,002625	120,00	0,063
	Tween x 1000 g	0,036	250,00	0,009
	<b>Subtotal</b>			<b>1,549</b>
	Producción de preinóculo	<b>Medio CLM</b>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 500 g		0,50	200,00	0,200
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O x 500 g		0,20	200,00	0,080
CaCl <sub>2</sub> x 500 g		0,40	200,00	0,160
NaCl x 500 g		0,10	45,00	0,009
Extracto de levadura x 500 g		0,50	180,00	0,180
Manitol x 500 g		10,00	120,00	2,400
<b>Subtotal</b>				<b>3,029</b>
Producción de biofertilizante	Medio LM modificado			
	Sales y extracto de levadura	100	0,629	62,900
	Azúcar rubia x 1000 g	2,00	3,50	7,000
	<b>Subtotal</b>			<b>69,900</b>

Actividad	Descripción	Cantidad	Precio unitario s/.	Subtotal S/.	
<b>Costos de energía*</b>	Incubadora	1,00	5,009	5,009	
	Horno	1,00	0,391	0,391	
	Autoclave	1,00	2,033	2,033	
	Desionizador	1,00	2,033	2,033	
	Motores	2,00	19,515	19,515	
	Centrífuga	1,00	1,694	1,694	
	Liofilizador	1,00	3,557	3,557	
	Vórtex	1,00	0,002	0,002	
	Microscopio	1,00	0,067	0,067	
	pHmetro	1,00	0,002	0,002	
	Balanza	1,00	0,004	0,004	
	Refrigeradora	1,00	5,236	5,236	
	<b>Subtotal</b>				<b>39,544</b>
	<b>Costo de uso del equipo</b>	Incubadora	1,00	3,625	3,625
Horno		1,00	0,032	0,032	
Autoclave		1,00	0,023	0,023	
Desionizador		1,00	0,123	0,123	
Vórtex		1,00	0,001	0,001	
Microscopio		1,00	0,014	0,014	
pHmetro		1,00	0,008	0,008	
Biorreactor		1,00	24,658	24,658	
Centrífuga		1,00	0,822	0,822	
Liofilizador		1,00	2,055	2,055	
Balanza		1,00	0,004	0,004	
Refrigeradora		1,00	3,970	3,970	
Moviliario		1,00	17,260	17,260	
<b>Subtotal</b>					<b>52,594</b>
<b>Honorarios</b>	Profesional y asistente		1 000,000	1 000,000	
<b>Alquiler</b>	Local	1,00	125,000	125,000	
	<b>Subtotal</b>			<b>1 125,000</b>	
<b>Otros</b>	Materiales de aseo y desinfección (detergente, lejía, alcohol y otros)		5,500	5,500	

Actividad	Descripción	Cantidad	Precio unitario s/.	Subtotal S/.
	Materiales de bioseguridad (guantes, mascarillas y gorros)		7,000	7,000
	Subtotal			12,500
	Suma de subtotales			1 304,116
<b>Imprevistos 5%</b>				65,206
<b>Costo total de producción**</b>				<b>1 369,321</b>

Fuente: Elaboración propia, octubre 2014.

\*KWh= S/. 0,3388

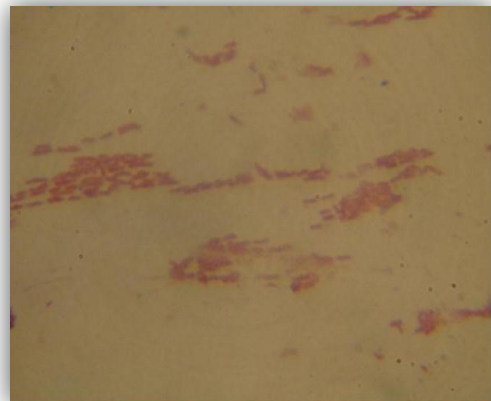
\*\*Costo de 1 batch por semana de 100 l ~ S/.13,69/l

**Anexo 23.** Purificación y caracterización de la cepa *Rhizobium etli*

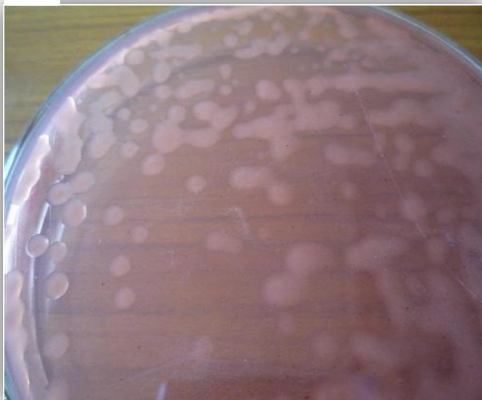
A



B



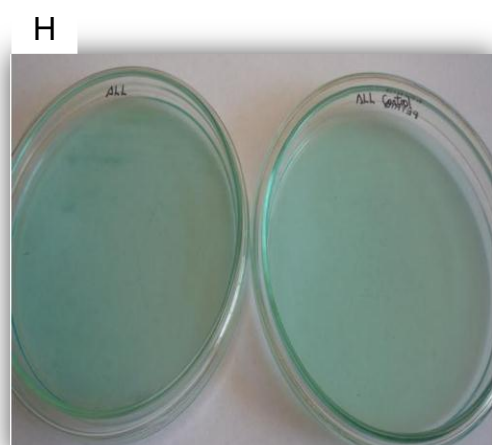
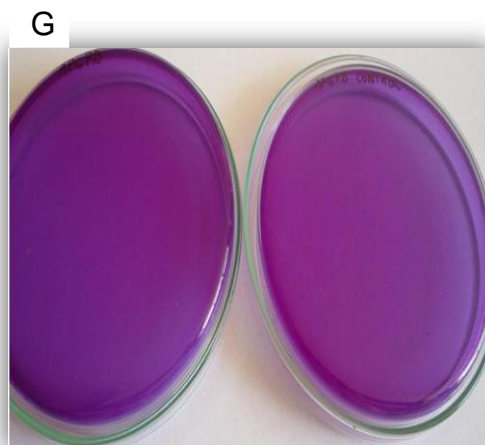
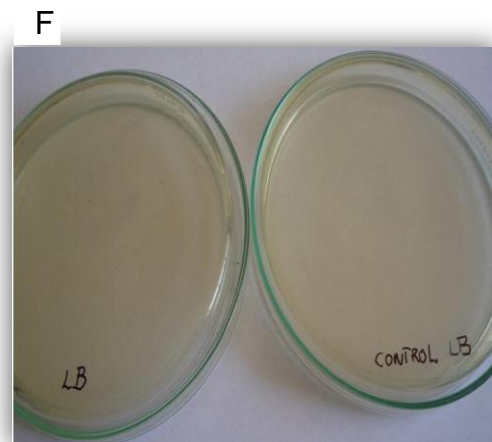
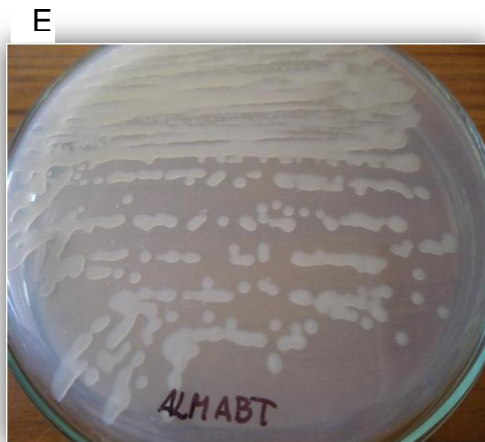
C



D

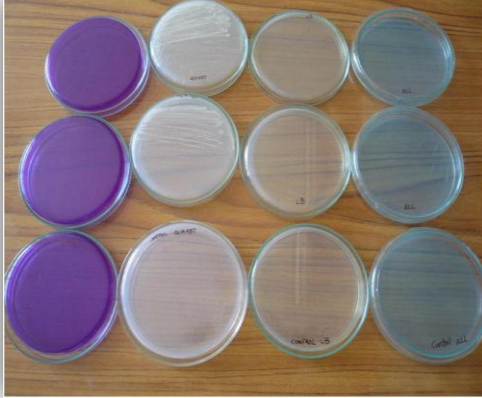


- A) Siembra en medio Levadura Manitol Rojo Congo (ALMRC).
- B) Morfología microscópica, bacilos gramnegativos.
- C) Colonias de cepa pura en medio ALMRC a las 72 horas.
- D) Placa inferior de ALMAB con viraje a acidez, placa superior es control, a las 48 horas.



- E) Crecimiento en medio ALMBT con viraje a acidez a las 48 horas.
- F) Placa izquierda sin crecimiento en medio Luria Bertani, placa derecha control, a las 48 horas.
- G) Placa izquierda sin crecimiento en medio PGPBC, placa derecha control, a las 48 horas.
- H) Placa izquierda con crecimiento en LLA, no se observa cambio de color al reactivo Benedict, placa derecha control, a las 48 horas.

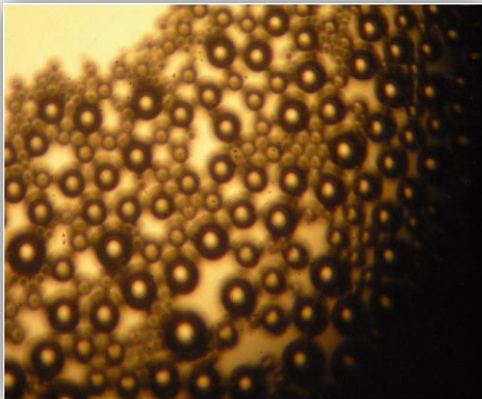
I



J



K

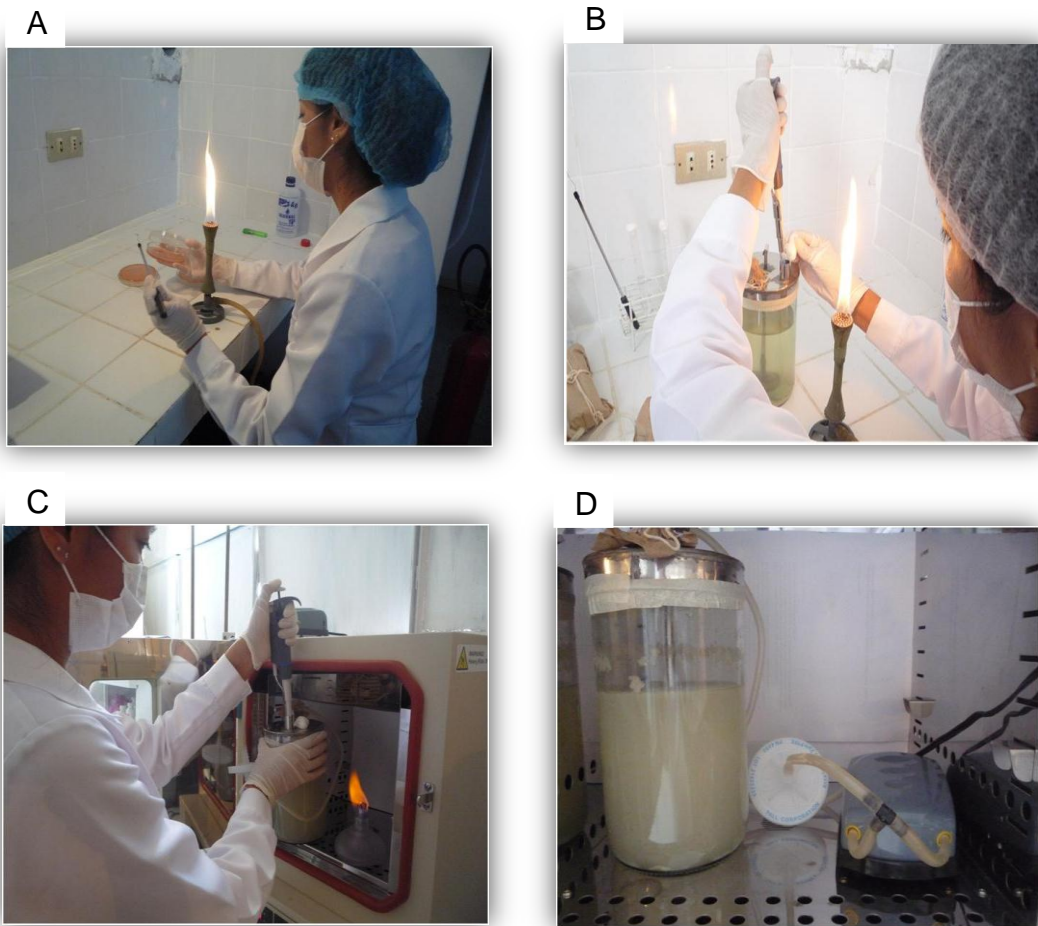


L



- I) Pruebas de pureza por duplicado y control realizadas a la cepa de *Rhizobium etli*.
- J) Prueba izquierda en medio Leche Tornasolada sin cambios, derecha prueba control, a los 15 días.
- K) Prueba de la catalasa, presencia de burbujas.
- L) Crioviales con cepa para conservación a -20°C.

**Anexo 24.** Producción de biofertilizante de *Rhizobium etli*



- A) Reactivación de cepa en medio ALMRC.
- B) Inoculación en biorreactor.
- C) Monitoreo del crecimiento bacteriano.
- D) Sistema para la producción final en 46 horas de crecimiento en Caldo Levadura Manitol.

## Anexo 25. Preparación del terreno para siembra

A



B



C



D



- A) Arado del terreno.
- B) Incorporación de estiércol.
- C) Tendido de cintas.
- D) Terreno regado y listo para la siembra.

## Anexo 26. Preparación y aplicación del biofertilizante

A



B



C

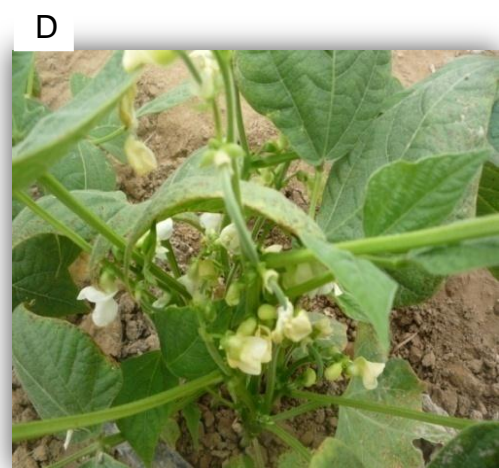
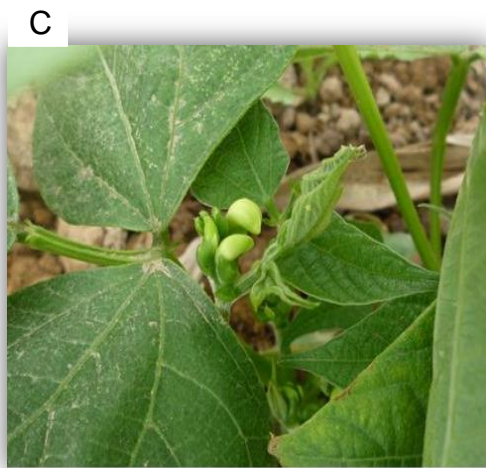
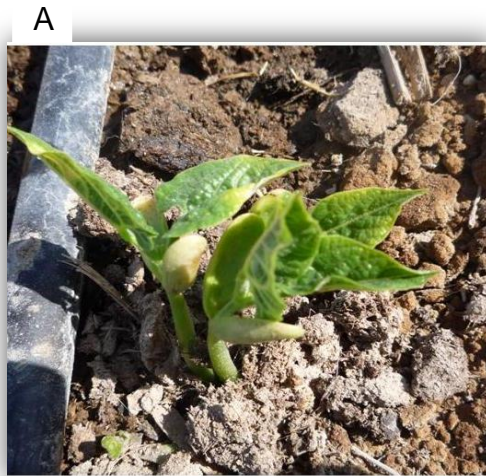


A) Diluciones del biofertilizante.

B) A la izquierda dilución  $10^9$ , a la derecha dilución  $10^8$  cel/ml.

C) Aplicación de biofertilizante + suelo en semillas de vainita.

## Anexo 27. Cultivo de vainita en campo



- A) Plántulas de vainita 6 días después de la siembra.
- B) Control fitosanitario.
- C) Botones florales a la 5ta. semana después de la siembra.
- D) Floración y formación de vainas a la 6ta. semana después de la siembra.

E



F



G



H



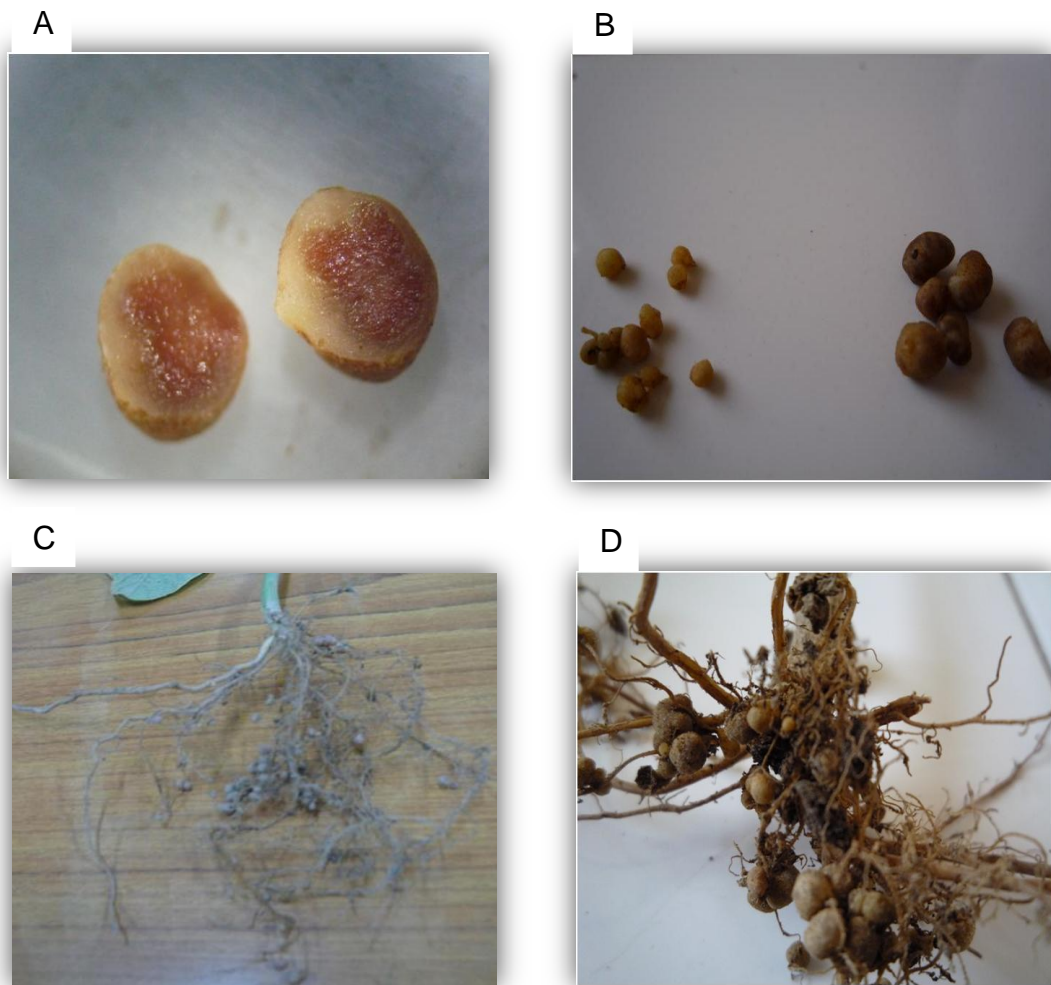
E) Evaluación del cultivar de vainita.

F) Aplicación de *Chrysoperla carnea*.

G) Cultivar de vainita en el campo experimental del INPREX.

H) Vainitas cosechadas.

**Anexo 28.** Evaluación de la nodulación en *Phaseolus vulgaris* L.



A) Corte de un nódulo efectivo donde se evidencia presencia de leghemoglobina.

B) De izquierda se observan nódulos inefectivos y a la derecha nódulos efectivos.

C) y D) Raíces de *Phaseolus vulgaris* L. con nodulación.