



Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Fitotecnia

Doctorado en Ciencias en Horticultura

**MANEJO ALTERNATIVO Y CONVENCIONAL
SOBRE RENDIMIENTO, PROPIEDADES
NUTRACÉUTICAS Y COMPORTAMIENTO POSCOSECHA
DE VAINITA O FRIJOL EJOTERO EN ECUADOR**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA: Edwin Alfredo Cáceres Acosta



APROBADA



Bajo la supervisión de:

DR. ROGELIO CASTRO BRINDIS

Chapingo, Estado de México, marzo de 2022



Instituto de Horticultura

**MANEJO ALTERNATIVO Y CONVENCIONAL SOBRE RENDIMIENTO,
PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS Y COMPORTAMIENTO POSCOSECHA
DE VAINITA O FRIJOL EJOTERO EN ECUADOR**

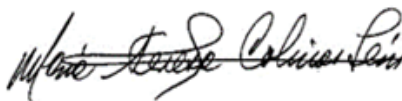
Tesis realizada por **Edwin Alfredo Cáceres Acosta**, bajo la dirección del Dr. Rogelio Castro Brindis, asesorada por la Dra. María Teresa Beryl Colinas León, Dra. Ma. de Jesús Juárez Hernández y Dr. Juan José Almaráz Suárez, tesis que ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



Director:

Dr. Rogelio Castro Brindis



Asesor:

Dra. María Teresa Beryl Colinas León



Asesor:

Dra. Ma. de Jesús Juárez Hernández



Asesor:

Dr. Juan José Almaraz Suarez

Chapingo, Estado de México, marzo de 2022

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIAS.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....	vii
RESUMEN GENERAL.....	viii
GENERAL SUMMARY.....	ix
CAPÍTULO I. Introducción General.....	10
1.1 Objetivos.....	12
1.2 Hipótesis.....	13
CAPÍTULO II. Use of low molecular weight organic acids for agricultural improvement of ecuadorian volcanic soils.....	14
CAPÍTULO III. Edaphic source and tillage systems on yield and nutritional quality of green bean in Ecuadorian volcanic soils	38
CAPÍTULO IV. Recuento de rizobios por el método del número más probable y su efecto en indicadores morfológicos en frijol ejotero (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en Ecuador	53
CAPÍTULO V. Conclusiones Generales.....	74
CAPÍTULO VI. Referencias.....	77
CAPÍTULO VII. Anexos.....	81

DEDICATORIAS

El logro de grandes sueños sin el apoyo de excelentes personas a tu lado, que te impulsan y te dan fortaleza, no sería posible; por eso dedico este trabajo con mis más grandes sentimientos de gratitud y amor a mi esposa Teresa de Jesús Machado Barrera y a mi hija Yadira Maribel Cáceres Machado, quienes, con su amor, apoyo y trabajo arduo, participaron para lograr este objetivo.

A mis queridos padres Jorge Cáceres y Piedad Acosta, a mis hermanos Segundo, Jorge, Wilfrido, María y Wilmer.

A mis tías, tíos, primas, primos y a todas aquellas personas que permanentemente me brindaron su apoyo, sería imposible nombrar a cada uno, pero todos saben mi gratitud por su aporte en mi desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar mi agradecimiento a Dios y a la virgen de Guadalupe, porque soy un testimonio real de un milagro, estar al borde de la muerte, hace que logre entender la grandeza de su misericordia.

Quiero resaltar la grandeza y generosidad de los pueblos mexicano y ecuatoriano, sus buenos corazones y aportes, quienes me brindaron oportunidades para alcanzar un objetivo que sólo existía en mi mente, como un sueño.

A las autoridades de la Universidad Autónoma de Chapingo, México, por su bondad y generosidad, ya que me acogieron para ser parte de una comunidad universitaria de las más importantes de Latinoamérica, siempre estuvieron cuando más, uno, como estudiante, los necesité, no quiero dejar pasar la oportunidad para resaltar particularmente al Dr. Juan Martínez Solís, excoordinador del Instituto de Posgrado y al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo, ex Coordinador del Instituto de Posgrado y al Dr. Alejandro Facundo Barrientos Priego, actual Coordinador, a mis grandes amigas y amigos, personal académico-administrativo de la Coordinación, Rogelio, Ángeles y Anita.

Al Colegio de Postgraduados, México, en donde pude tomar cátedras muy importantes para mi formación profesional y conocer grandes profesores amigos como el Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dr. Alejandro Alarcón, Secretario Académico, M. en C. Ma. Encarnación Lara y a mis grandes amigos y compañeros de curso, mi gratitud.

A la Universidad Central del Ecuador, en especial al Dr. Fernando Efraín Sempértegui Ontaneda, Rector; Dra. María Mercedes Gavilánez Endara, Vicerrectora de Investigación, Doctorados e Innovación; Econ. Marco Arroyo Posso Zumárraga, Vicerrector Administrativo y Financiero; Dra. María Augusta Espín Estévez, Vicerrectora Académica y de Posgrado, Econ. César Hans Bucheli Terán, Secretario Ejecutivo de la Unidad de Gestión y a la señorita Celia Cumandá Yaguana Lafebre. Su don de gente y generosidad, hace que resalte al ingeniero Antonio Gaibor, exdecano, por su apoyo incondicional y desinteresado. A todos mis compañeras y compañeros docentes, administrativos y trabajadores de la Facultad de Ciencias Agrícolas, que brindaron su apoyo en los momentos críticos de mi estancia en México, especial mención de gratitud merecen Juan Borja, José Vazques, Carlos Montufar, Decano y el ingeniero Jaime Pazmiño, expresidente de la Asociación de Profesores.

A todos mis amigos y compañeros del doctorado, en especial de mi promoción: Luis Angel Barrera, Carolina Díaz, Francisca Hernández, Eddi Jiménez, Nereo Martínez, Gabriela Ramírez, Vicente Vázquez, mi agradecimiento por siempre a Grigna Piña y especialmente a Eduardo Galeano, destacando su don de gente y su sentimiento de solidaridad.

A Biosoluciones Agrícolas S.A. (Ecuador), en especial al Gerente General, Ing. Manuel Gallo Egas, por brindarme su amistad, experiencia y por proveer los productos comerciales (Compost y biofertilizantes) aplicados en mi investigación.

A Biofábrica Siglo XXI S.A. DE C.V. (<https://biofabrica.com.mx/>), en especial al Dr. Marcel Morales Ibarra, Director General, y al M. en C. César F. González Monterrubio, Jefe de Investigación y Desarrollo, por brindarme su amistad, asesoría con su experiencia de más de 30 años y por el obsequio de los bioinsumos comerciales, aplicados en mi investigación.

Las estrategias propuestas en el protocolo de investigación para formar un equipo multidisciplinario e internacional de docentes, integrando a estudiantes de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (UCE) y vinculándoles en la realización de las actividades de investigación del proyecto con las tesis de pregrado, se cumplieron al formar un equipo de trabajo de excelencia con las doctoras y los doctores Rogelio Castro Brindis; Ma. de Jesús Juárez Hernández; María Teresa Beryl Colinas León de la Universidad Autónoma de Chapingo, México. Juan José Almaraz Suárez del Colegio de Posgraduados, México. Odón Roberto Montes Colmenares de la Dirección de Producción Sustentable de la Dirección General de la Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural del Gobierno de la Ciudad de México, Xochimilco, Ciudad de México. Lenin Javier Ramírez Cando de la Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay, Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería, San Miguel de Urququí, Imbabura, Ecuador. Washington Padilla del Grupo Clínica Agrícola y Soraya Patricia Alvarado Ochoa de la UCE. Al compañero de doctorado César Omar Montoya García y finalmente a mis excelentes estudiantes y tesis de la UCE: Alejandro Alfredo Aguirre Flores; Paulo Roberto Tamayo Rivera; Karla Estefanía Vásquez Mosquera; Joshua Daniel Cabascango Cabascango; Alexander Patricio Gualotuña Quisalema; Daniel Alexander Chávez Cárdenas; Steven Gibran Cuasapas Suarez; María Belén Ulcuango Arevalo; Samanta Gabriela Bajana Guano; Narcisa Elizabeth Dueñas Murillo; Ángel Josué Ortiz Ramírez, a quienes agradezco por su valiosa contribución.




A mis grandes amigos de Texcoco, México de las familias Sánchez Calles, Reyes Pérez Rangel, especialmete a Félix (QPD), Teresita, Mónica, Oscar, Leopoldo, Olaf, etc. Muchos más estuvieron conmigo en los momentos más difíciles de mi enfermedad e instancia en México y, aunque no incluya sus nombres, saben que de corazón les agradezco. Dios les pague.

A mis profesores del posgrado doctores de altísimo nivel: Juan Porfirio Legaria Solano, Aureliano Peña Lomelí, Juan Enrique Rodríguez Pérez, César Del C. Luna-Morales; Edilberto Avitia García, Natanael Magaña-Lira, etc.

Homenaje y agradecimiento especial a mis maestros y mentores: Carlos Nieto Cabrera, Angel Marcelo Calvache Ulloa, José Espinosa, Francisco Javier Matus, Gonzalo Robalino, Rolando Saenz Andrade, especialmente a la Ing. Mercedes Bolaños (QPD) y al Dr. Nelson Rodríguez Aguirre (QPD), por creer en mí y apoyarme siempre.

Mi agradecimiento a Leticia Herrera Garcés, por su aporte y apoyo permanente, y a Fabián Muñoz Navarro, por su contribución como experto en Estadística.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

	<p>Datos personales: <i>Nombre:</i> Edwin Alfredo Cáceres Acosta</p> <p><i>Fecha de Nacimiento:</i> 11 de septiembre de 1963</p> <p><i>Lugar de Nacimiento:</i> Ambato- Ecuador</p> <p>CURP: CAAE630911HNECCD05</p> <p><i>Profesión:</i> Ingeniero Agrónomo Especialista en Suelos y Nutrición de Plantas Maestro en Ciencias en Protección Vegetal Diplomado en Comercio Internacional de Productos Agropecuarios</p> <p>Desarrollo Académico: <i>Licenciatura:</i> Universidad Central del Ecuador</p> <p><i>Especialización:</i> Universidad Central del Ecuador</p> <p><i>Maestría:</i> Universidad Autónoma de Chapingo</p> <p><i>Doctorado:</i> Universidad Autónoma de Chapingo</p>
<p>ORCID ID:  https://orcid.org/0000-0002-1020-1872</p> <p>PERFIL RESEARCH GATE:  https://www.researchgate.net/profile/Edwin-Caceres-Acosta</p>	

RESUMEN GENERAL

El incremento de la población a nivel mundial nos obliga a aumentar la producción de alimentos de forma sustancial, principalmente las fuentes de proteína; como una opción de bajo costo y al alcance de la población se destacan las leguminosas, que constituyen parte de la canasta básica, especialmente el frijol ecuatoriano consumido en grano fresco, seco o legumbre, lo que además contribuye con la seguridad y soberanía alimentaria en el país. La producción de la vainita o frijol ejotero se ha basado en la tecnología generada en la revolución verde, es decir, el uso a gran escala de fertilizantes químicamente sintetizados, aplicación de agroquímicos y uso de variedades mejoradas obtenidas para este propósito. Por otro lado, se ha realizado mucha investigación sobre la fijación biológica de nitrógeno con la simbiosis frijol y bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*; sin embargo, el uso de esta alternativa es muy limitado con escasa transferencia de estas tecnologías al campo. En la búsqueda de incrementar los bajos rendimientos y alcanzar una producción rentable, el sector agroproductivo ha tratado de utilizar los métodos y principios de la agricultura convencional pero no ha logrado cumplir con su objetivo, debido a que el costo de producción es alto frente a rendimientos bajos, y sin considerar el impacto en el ambiente. El objetivo general de la presente tesis fue determinar los efectos del manejo agroecológico con aplicación de fertilizantes, materia orgánica y *Rhizobium* bajo sistemas de labranza mínima y labranza convencional sobre las propiedades del suelo, rendimiento, propiedades nutraceuticas y comportamiento poscosecha en cultivo de frijol ejotero. La tesis se desarrolló en tres fases, en el primer artículo denominado “*Use of low molecular weight organic acids for agricultural improvement of ecuadorian volcanic soils*” se promueve el uso de ácidos orgánicos aplicados en enmiendas orgánicas enriquecidas y semillas inoculadas para el mejoramiento agrícola de los suelos volcánicos ecuatorianos. En el segundo artículo denominado “*Edaphic source and tillage systems on yield and nutritional quality of green bean in ecuadorian volcanic soils*” se determina los efectos de cuatro fuentes edáficas y dos sistemas de labranza sobre el rendimiento y las propiedades nutricionales del frijol verde en suelo volcánico de los Andes ecuatorianos. Finalmente, en el tercer artículo denominado “*Recuento de rizobios por el método del número más probable y su efecto en indicadores morfológicos en frijol ejotero (Phaseolus vulgaris L.) en Ecuador*”, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas, atribuibles al tipo de biofertilizante y concentración empleada, donde los indicadores morfológicos evaluados demuestran mejores características con el biofertilizante de origen ecuatoriano, cuyo rango óptimo de concentración de diluciones fue de 10^{-7} a 10^{-9} , independientemente del tipo de biofertilizante empleado.

Palabras clave: Andisoles, Ecuador, ácidos orgánicos, biofertilizantes, *Rhizobium*.

¹ Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Edwin Cáceres Acosta. Director: Dr. Rogelio Castro Brindis.

GENERAL SUMMARY

The increase of the world population forces us to increase food production substantially, mainly protein sources; as a low-cost option and affordable to the population, legumes stand out, and are part of the basic food basket, especially Ecuadorian beans consumed in fresh, dried grains or legume, which also contribute to food security and sovereignty in the country. The production of green beans has been based on the technology generated during the green revolution, that is, the large-scale use of chemically synthesized fertilizers, application of agrochemicals and use of improved varieties obtained for this purpose. On the other hand, much research has been done on biological nitrogen fixation with the bean and *Rhizobium* symbiosis; however, the use of this alternative is very limited and with little transfer of these technologies to the field. In the search to increase low yields and achieve profitable production, the agro-productive sector has tried to use the methods and principles of conventional agriculture but has not been able to achieve its objective due to the high costs of production compared to low yields, and without considering the impact on the environment. The general objective of this thesis was to determine the effects of agroecological management with application of fertilizers, organic matter and *Rhizobium* under minimum tillage and conventional tillage systems on soil properties, yield, nutraceutical properties and postharvest performance of green beans. The thesis was developed in three phases. The first article, "*Use of low molecular weight organic acids for agricultural improvement of Ecuadorian volcanic soils*", promotes the use of organic acids applied in enriched organic amendments and inoculated seeds for agricultural improvement of Ecuadorian volcanic soils. The second article, "*Edaphic source and tillage systems on yield and nutritional quality of green bean in Ecuadorian volcanic soils*", determines the effects of four edaphic sources and two tillage systems on yield and nutritional properties of green bean in volcanic soils of the Ecuadorian Andes. Finally, in the third article entitled "*Rhizobia count by the most probable number method and its effect on morphological indicators in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ecuador*", it was determined that there are statistically significant differences, attributable to the type of biofertilizer and concentration used, where the morphological indicators evaluated show better characteristics with the biofertilizer of Ecuadorian origin, which optimum concentration range of dilutions was from 10^{-7} to 10^{-9} , regardless of the type of biofertilizer used.

Keywords: Andisols, Ecuador, organic acids, biofertilizers, *Rhizobium*.

¹ Thesis, Ph.D. in Horticultural Sciences. Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Edwin Cáceres Acosta. **Advisor:** Dr. Rogelio Castro Brindis.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El incremento de la población a nivel mundial obliga al incremento de la producción de alimentos de forma sustancial, principalmente las fuentes de proteína; como una opción de bajo costo y alcance de la población, se destacan las leguminosas que constituyen parte de la canasta básica, como: frijol (*Phaseolus vulgaris*) consumido en grano fresco, seco o legumbre; maní (*Arachis hypogaea*); soya (*Glycine max*); haba (*Vicia faba*); chocho (*Lupinus mutabilis*); lenteja (*Lens culinaris*); alfalfa (*Medicago sativum*); arveja (*Pisum sativum*), y garbanzo (*Cicer arietinum*), que contribuyen con la seguridad y soberanía alimentaria. La producción de leguminosas requiere del uso de agroecosistemas sobre los cuales, desde la revolución verde, ha primado la producción industrial, este modelo ha sido fuertemente criticado por el uso excesivo e inadecuado de agroquímicos y variedades mejoradas (transgénicos) que se asocian con la crisis de la agricultura moderna y el cambio climático (FAO, 2004a; Gaybor, 2014; Sans, 2007). Otros investigadores han propuesto el uso de nuevas estrategias como la aplicación de microorganismos benéficos que ayudan en la nutrición de los cultivos, especialmente leguminosas (Ferrera, 2007; Grageda *et al.*, 2012).

La familia Fabaceae ofrece importantes ventajas en los sistemas de producción, como aporte de nitrógeno (N), aumento de la cobertura vegetal, fuente de carbono y reducción de la erosión edáfica, contribuyendo así a mejorar la salud del suelo. Para potenciar la fijación biológica de N en el suelo, los cultivos leguminosos pueden ser inoculados con bacterias nodulíferas fijadoras de N (BNFN), especialmente del género *Rhizobium* (Ferguson *et al.*, 2020; Hansen *et al.*, 2017; Vincent, 1981). En Ecuador, el consumo de frijol y frijol ejotero o vainita es protagonista en la dieta, constituyéndose como una leguminosa que forma parte de la canasta básica de muchas familias, además de otras leguminosas que en sí mismas se consideran como alimentos funcionales (Alcántara, 2012; Estévez, 2018; Jones, 1999; Silveira *et al.*, 2003). En el Ecuador según estadísticas del INEC (2018), la superficie plantada a nivel nacional de fréjol tierno en vaina es 10.052 ha, la superficie cosechada es de 9.392 ha, la producción es de 21.610 toneladas y el rendimiento es 2,30 t ha⁻¹.

El cultivo de la vainita se produce en una gran diversidad de sistemas y entornos de cultivo en múltiples regiones en todos los continentes. El principal productor y consumidor de frijol es América Latina, por ser un alimento que forma parte de la tradición (Estévez, 2018; Hernández *et al.*, 2013; Jones, 1999). El rendimiento, por su parte, se define como la cantidad de productos que un agricultor obtiene por cada unidad de superficie cosechada, expresada en kilogramos por hectárea en el sistema métrico decimal; la magnitud de un rendimiento depende de la combinación de factores que influyen sobre la cosecha (Bastida, 2017; FAO, 2004b; Nieto & Endara, 2019). En los campos se asocian muchas circunstancias adversas que determinan rendimientos agrícolas bajos. A estas causas naturales se agregan situaciones históricas, sociales, tecnológicas y económicas, que contribuyen a mantener los rendimientos agrícolas en niveles inferiores. Los rendimientos del cultivo de vainita en América Latina son notoriamente bajos, en comparación con los rendimientos de las regiones templadas de Norteamérica y Europa (Jones, 1999; Malla & Vásquez, 2018).

En Ecuador existen varias clases de suelos de origen volcánico (Bravo, 2014; Córdova & Valverde, 2001). Estos suelos se caracterizan por poseer minerales de tipo amorfo (Espinosa *et al.*, 2018; Gardi *et al.*, 2014) con una alta capacidad de fijar fosfatos y amonio (NH_4^+); por esta razón, estos nutrientes deben ser aplicados en cada ciclo de cultivo, encareciendo el costo de producción (Gómez, 2013). Por ejemplo, los suelos andinos contienen una gran cantidad de materia orgánica (MO) estabilizada en el suelo (Matus *et al.*, 2014). La producción de alimentos, por tanto, requiere la comprensión de la biogeoquímica del suelo y los servicios ambientales que éste proporciona, así como también los efectos de su manejo sobre la calidad del agua, la resistencia a la erosión y resiliencia a los efectos del cambio climático (Schmidt *et al.*, 2011). El uso de biofertilizantes y la adición de MO en el suelo no sólo contribuye a mejorar los rendimientos de los cultivos, sino que también garantiza su “salud” (Barrera *et al.*, 2012; Bautista *et al.*, 2004; Ghisolfi, 2011).

Los microorganismos y sus productos en la rizosfera reaccionan a los muchos metabolitos que son liberados por las raíces. Dichas interacciones pueden influir en el crecimiento y desarrollo de la planta, cambiar la dinámica de los nutrientes y alterar la susceptibilidad

de la planta a las enfermedades y al estrés abiótico (Cáceres *et al.*, 2020). Una de las simbiosis más estudiadas es aquella que se establece entre las bacterias del suelo y las plantas de la familia Fabaceae (Cerrato & Alarcón, 2001; Ferrera, 2007). Los rizobios son de particular interés debido a su asociación simbiótica con miembros de las leguminosas (Hansen *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2016; Somasegaran & Hoben, 1985).

Afortunadamente, la innovación en las técnicas agrícolas inspiradas en la agroecología responden satisfactoriamente en el aumento de los rendimientos por hectárea, sin excesiva dependencia de los combustibles fósiles, así como de los productos agroquímicos. Estas técnicas comprenden la asociación de cultivos con necesidades fisiológicas diferenciadas que optimizan la eficiencia del uso de la radiación solar, cubriendo mayores superficies, en consecuencia, protegiendo al suelo de la erosión, disminuyendo la incidencia de agentes patógenos y, por tanto, el uso de agentes de control químico; comprende también la integración de leguminosas (frijol, haba, soya, trébol, alfalfa, etc.) en las asociaciones y rotaciones de cultivos, permitiendo beneficiar al suelo con la fijación de N atmosférico empleado en la producción proteica de los cultivares, a través de las interacciones simbióticas de las bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces de las leguminosas (Dufumier, 2019). Sin embargo, no es nada despreciable el uso de las tecnologías disponibles como los insumos químicos, orgánicos y biofertilizantes de forma complementaria, con el objetivo de satisfacer las necesidades nutricionales del cultivo y obtener el máximo del potencial genético de rendimiento.

1.1 Objetivos

Objetivo General

Determinar los efectos del manejo agroecológico del sistema Suelo-Planta debido a la aplicación de fertilizantes químicos, materia orgánica y bacterias nitrificantes del género *Rhizobium* en un sistema de labranza mínima y labranza convencional, sobre las propiedades del suelo, rendimiento y calidad nutracéutica del cultivo de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Blue Lake.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la inoculación de bacterias nitrificantes del suelo del género *Rhizobium* en un experimento con labranza mínima y convencional sobre el rendimiento y calidad nutraceútica del frijol ejotero, en un suelo volcánico de la Sierra central del Ecuador.
- Investigar los cambios en las características de la planta, nutricionales y nutraceúticas, de la legumbre en cada uno de los tratamientos.
- Buscar información sobre el efecto positivo de ácidos orgánicos de bajo peso molecular para el mejoramiento de suelos hortícolas volcánicos.
- Determinar el efecto positivo de bacterias fijadoras de nitrógeno para el mejoramiento de suelos hortícolas volcánicos.

1.2 Hipótesis General

Se puede incrementar los rendimientos de frijol ejotero con el uso de materia orgánica y bacterias del género *Rhizobium*, al mejorar las propiedades en los suelos volcánicos de la Sierra central del Ecuador, principalmente en la agricultura familiar del sector rural.

La producción de frijol ejotero se ha basado en la tecnología generada en la revolución verde, es decir, con el uso a gran escala de fertilizantes químicamente sintetizados y aplicación de agroquímicos, con el uso de variedades mejoradas obtenidas para este propósito; por otro lado, se ha realizado mucha investigación sobre la fijación biológica de nitrógeno con la simbiosis frijol y *Rhizobium*; sin embargo, el uso de esta alternativa es muy limitado, con escasa transferencia de estas tecnologías al campo.



Universidad Autónoma Chapingo

Doctorado en Ciencias en Horticultura

CAPÍTULO II.

Uso de ácidos orgánicos de bajo peso molecular para el mejoramiento agrícola de suelos volcánicos ecuatorianos

Indian Journal of Pure & Applied Bioscience

ISSN: 2282-2845

DOI: <http://dx.doi.org/10.18782/2582-2845.8159>

Year: 2020, Volume: 8. Issue: 4

www.ijpab.com

CAPÍTULO II. USO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE BAJO PESO MOLECULAR PARA EL MEJORAMIENTO AGRÍCOLA DE SUELOS VOLCÁNICOS ECUATORIANOS

CAPÍTULO II. USE OF LOW MOLECULAR WEIGHT ORGANIC ACIDS FOR AGRICULTURAL IMPROVEMENT OF ECUADORIAN VOLCANIC SOILS

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es promover el uso de ácidos orgánicos aplicados en enmiendas orgánicas enriquecidas y semillas inoculadas para el mejoramiento agrícola de los suelos volcánicos ecuatorianos. Las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos derivados de cenizas volcánicas están fuertemente influenciadas por el grado de meteorización de los materiales piroclásticos; los andisoles ecuatorianos son suelos derivados de materiales de cenizas volcánicas, cuya característica única es la presencia de minerales silicatos amorfos y de fácil meteorización. La presencia de microorganismos autóctonos en el suelo como *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Yarrowia* spp., *Streptosporangium* spp., *Pectobacterium* spp., etc. juega un papel importante en la tasa, no solo de estabilización de carbono y nitrógeno, sino también de estabilización de minerales, ya que tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular; los cuales terminan formando materiales humificados estables en andisoles.

Palabras clave: Nitrógeno, Andisoles, alofana, meteorización, nutrimentos.

ABSTRACT

The main objective of this paper is to promote the use of organic acids applied in enriched organic amendments and inoculated seeds for agricultural improve volcanic Ecuadorian soils. The physical, chemical and biological properties of soils derived from volcanic ash are strongly influenced by the degree of weathering of the pyroclastic materials, the Ecuadorian andisols are soils derived from volcanic ash materials, which unique characteristic is the presence of amorphous and easily weathered silicate minerals. The presence of the indigenous microorganisms in the soil such as *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Yarrowia* spp., *Streptosporangium* spp. and *Pectobacterium* spp. plays an important role on the rate not only of carbon and nitrogen stabilization but also of mineral stabilization, since they have the capacity to produce low molecular weight organic acids; which end up forming stable humified materials in andisols.

Keywords: Nitrogen, Andisols, allophane, weathering, nutrients.

Use of low molecular weight organic acids for agricultural improvement of Ecuadorian volcanic soils

Edwin Caceres^{1-2*}, Rogelio Castro¹, Soraya Alvarado², Washington Padilla³ and Odón Montes¹

¹Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México Texcoco, Chapingo, 56230, México.

²Universidad Central del Ecuador, Av. Universitaria, Quito 170129, Ecuador.

³Grupo Clínica Agrícola, N49- y Gonzalo Zaldumbide & Luis Calisto, Quito, Ecuador.

*corresponding Author E-mail: edwincaceresacosta@gmail.com

Received: 21.06.2020 | Revised: 28.07.2020 | Accepted: 4.08.2020

Abstract

The main objective of this paper is to promote the use of organic acids applied in enriched organic amendments and inoculated seeds for agricultural improve volcanic Ecuadorian soils. The physical, chemical and biological properties of soils derived from volcanic ash are strongly influenced by the degree of weathering of the pyroclastic materials, the Ecuadorian andisols are soils derived from volcanic ash materials, which unique characteristic is the presence of amorphous and easily weathered silicate minerals. The presence of the indigenous microorganisms in the soil such as *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Yarrowia* spp., *Streptosporangium* spp. and *Erwinia* spp. plays an important role on the rate not only of carbon and nitrogen stabilization but also of mineral stabilization, since they have the capacity to produce low molecular weight organic acids; which end up forming stable humified materials in andisols.

Keywords: Amorphous Materials, Weathering, Mineral Stabilization, Carbon Stabilization, Nitrogen Stabilization.

Introduction

Low molecular weight organic acids (LMWOAs) are distributed widely in nature, they are mainly derived from the decomposition of organic matter and secretion of plant roots and microbes (Wang *et al.*, 2012), these are vital intermediate products during metabolic pathways of organic matter and participate in the tricarboxylic acid cycle during life activities, and are prevalent on the earth's surface (Xiao *et al.*, 2014), for agriculture proposes LMWOAs play important roles in the soil-forming process and the cycling of nutrients, especially nitrogen (N), phosphorous (P) and sulphur (S) (Li *et al.*, 2012), moreover the potential influences of LMWOAs on the dissolution of soil minerals, and the stabilization of organic compounds by complexation with minerals or weathering products are well characterized (Heckman *et al.*, 2013).

The most common LMWOAs identified in soils are oxalic, succinic, tartaric, fumaric, malic, citric, sinapic, caffeic, syringic, salicylic, gallic, p-coumaric, gentisic, protocatechuic, vanillic, p-hydroxybenzoic, and ferulic (Kaurichev

et al., 1963), specifically organic acids, such as malate, citrate and oxalate, have been proposed to be involved in many processes operating in the rhizosphere, including nutrient acquisition and metal detoxification, alleviation of anaerobic stress in roots, mineral weathering and pathogen attraction (Jones, 1998) .

The LMWOAs in the root system has been explained by the fact that these compounds can influence on the solubility of essential and nonessential elements directly through acidification, chelation, precipitation, and oxidation-reduction processes in the rhizosphere, and so indirectly on the soil physical properties and the dynamics of root growth by the effects on microbial activity (Baetz *et al.*, 2014; González *et al.*, 2008), these compounds have recently come to attention because conventional approaches to sustainable agriculture largely rely on increasing efficient use of external nutrient sources, and research has shown that even in the presence of sufficient macronutrients, crop production and soil fertility may be deficient, emphasizing the need to understand broader ecological dynamics

in soil to ecologically intensify agriculture (Wood *et al.*, 2018).

In another hand, it's known that about 600 volcanoes have had known eruptions recording, while about 50 - 70 volcanoes are active (erupting), and about 20 volcanoes can erupting in any time (Pfeiffer, 2014), these eruptions have formed approximately 124 million hectares (0.84 % of the earth's land surface) of volcanic ash soils cover (Tsai *et al.*, 2010), a significant part of this surface is on Central and South America (Espinosa, 2004) , and most of this soils have been classified as Andisols (Delmelle *et al.*, 2015). This soils developed from volcanic ash deposits vary extremely in physical and chemical soil properties and are known to degrade easily through erosion or soil compaction, which limits intensive utilization (Bachmann *et al.*, 2020).

The Andisols represent the 30 % of the Ecuadorian soils, which are located mainly in the highland area mainly and used to crop barley, oat, wheat, corn, quinoa, amaranto, and Andean tubers such as potato, mashua, melloco, ocas, among others. There are many studies

about Ecuadorian soils; however, the mineralogy and the physical and chemical properties of Ecuadorian Andisols still need to be investigated, the lithological, geomorphologic and bioclimatic characteristics of Ecuador, and the time and space variation are able to condition the development of formation factors for Andisols, so that the pedogenetic processes are the result of the combination of these factors and determine the geographic distribution of the different type of soils in the landscape (Villegas *et al.*, 2007), and the andolization process (Espinosa *et al.*, 2018).

Although the effects of organic acids are diverse, there is strong evidence that organic acids accelerate the dissolution of some minerals (Lawrence *et al.*, 2014), the great interest on the role of organic acids in mineral dissolution has continued to grow, especially with the increased popularity of a surface-reaction-controlled model for dissolution kinetics. Also, the research on organic acids and weathering has been stimulated by the question of the effect of plants and mineral weathering on the global carbon cycle (Drever *et al.*, 1994), so that, the

main objective of this paper is to promote the use of organic acids applied in enriched organic amendments and inoculated seeds for agricultural improve volcanic Ecuadorian soils. The search for scientific papers was performed between april 2019 and march 2020, at Universidad Autónoma Chapingo Mexico, considering publications on agroforestry systems with a horticultural component, using SCOPUS, Web of Science and SciELO databases.

Ecuadorian volcanic ash soils:

Volcanic ash is chemically - mineralogically distinct from most other soil parent materials (Grunwald, 2015), soils formed from volcanic ejecta have many distinctive physical, chemical, and mineralogical properties that are rarely found in soils derived from other parent materials. These distinctive properties are largely attributable to the presence of noncrystalline materials (e.g., allophane, imogolite, ferrihydrite and complex humus-Al) containing variable surface charge colloids, and the accumulation of organic matter. Formation of noncrystalline materials is directly related to the properties of volcanic ejecta as a parent material, namely the

rapid weathering of glassy particles (Dahlgren *et al.*, 2004).

Adicionally, the environmental conditions, notably vegetation and soil moisture regime together with chemical composition (Al:Si ratio, base status, pH, etc.) strongly influence weathering pathways of volcanic glass (Asio, 2014; Espinosa *et al.*, 2015). The composition of the colloidal fraction forms a continuum between pure aluminum - humus complexes and pure allophane - imogolite, depending on the pH and organic matter characteristics of the weathering environment. For soil management purposes, volcanic soils are often divided into two groups based on the colloidal composition of the surface horizons: 1) allophanic soils, which are dominated by allophane and imogolite, and 2) nonallophanic soils dominated by aluminum - humus complexes and 2:1 layer silicates (Dahlgren *et al.*, 2004).

Allophane, imogolite and humus complexes are generally transformed under leaching conditions, in Si-rich environments, halloysite formation is favored; under more basic conditions gibbsite is favored. In non-allophanic

ashes, 2:1 clays occur although their pathways of formation are not well-defined. Soil moisture regimes influence transformation rates. Crystalline clay formation is favored under regimes that include dry seasons and moist regimes favor persistence of amorphous complexes (Espinosa *et al.*, 2015).

Fundamentally, the formation factors determine the spatial distribution of the different types of soils in Ecuador, particularly the parent materials that originated the soils (García *et al.*, 2004), however, this distribution is independent of the natural regions into which the country is divided. From the point of view of soil classification, the Ecuadorian Sierra is divided into three regions:

a) Sierra Norte: correspond to soils that have recently received contributions of ash and lapilli, contributing to the formation of soils of volcanic origin (Cordova *et al.*, 2001), derived from andesite and basalt classified as Andisols, are dominated by allophane, imogolite and humus-Al complexes and are characterized by being black colored soils, with medium texture, low average

fertility and slightly acidic, located on the internal and external flanks of the mountain ranges and the interior nodes, while the valleys, pits and Basins are formed by colluvial alluvial materials of different granulometry and of medium and low fertility (Moreno *et al.*, 2016), in their formation and development, the formative factors such as parental material and climate, and the formation processes, transformations and losses are of paramount importance, because they are what regulate the specific process of andolization (Espinosa *et al.*, 2015). These soils are characterized by possessing amorphous type minerals with X-ray diffraction such as allophane, ferrihydrite and imogolite (Gardi *et al.*, 2014; Neculman *et al.*, 2013), and have a high capacity to fix phosphorus (P), for this reason, this nutrient must be applied in each crop cycle, which makes production more expensive (Gómez, 2013).

b) Sierra Central: are soils that have not received recent contributions of volcanic materials and that have developed from metamorphic rocks that have been transformed into a variety of soils depending on altitude; In the highest

altitude sectors, Ultisols can be found; in the middle sections, Molisols and Vertisols; and in the lower part, poorly developed soils such as Inceptisols and Entisols.

c) Sierra Sur: are very irregular surface soils formed on granite deposits and metamorphic formations along with colluvial deposits. Finally, the central Sierra and towards the south of the country have evolved a diversity of non-volcanic soils, generally clayey, randomly distributed dominated by ferrous complexes and 2: 1 type clays such as montmorillonite and vermiculite. The fertility of these soils varies with the dominant clay type (Moreno *et al.*, 2016).

Soils derived from volcanic ashes have peculiar properties resulting, in fact, from their high SOM content and the presence of amorphous clays material (allophane and imogolite) (Broquen *et al.*, 2004), the large amount of stabilized SOM observed on soils derived from volcanic ash apparently resides in the formation of Al-humus complexes and the adsorption of humic substances to the

allophane and imogolite (Matus *et al.*, 2014).

Organic acids of low molecular weight: Organic acids of low molecular (LMWOAs) weight compounds are released into the ground by any type of organisms (López *et al.*, 2012), and are characterized by the possession of one or more carboxyl groups (Fox *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 2014), these compounds are intermediate products during metabolic pathways of organic matter (Table 1), participate in the tricarboxylic acid cycle during life activities, and provide food and energy to the microorganisms (González *et al.*, 2008), and a range of LMWOAs are produced in soils from the decomposition of organic matter, root exudates, and microbial metabolites (Bolan *et al.*, 1994), it is known that up to 40 % of the photosynthetically fixed C can be released by plants as root exudates (Baetz *et al.*, 2014), and that plant roots exude an enormous range of compounds composed mainly of LMWOAs (González *et al.*, 2008).

The LMWOAs such as oxalic, citric, butyric, malonic, lactic, succinic, malic, gluconic, acetic, glycolic, fumaric,

adipic, indolacetic y 2-cetogluconic, can be produced by the rhizobacterias is one of the most widely known mechanisms of soil phosphate solubilization, a process that makes phosphorus available for plant nutrition. Also, among the organisms with the capacity to produce organic acids that are nutrients soluble bacteria are *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarowia*, *Streptosporangium* and *Erwinia* (Beltrán, 2014; Van Hees *et al.*, 2000; Paredes *et al.*, 2010).

The LMWOAs are broken down slowly by microorganisms producing an accumulation in the soil. So consequently, these compounds exist in dynamic balance; rapidly produced and consumed by microorganisms. Concentrations of organic acids are generally highest in the organic layer at the top of the soil profile and decrease with depth (Drever *et al.*, 1994), moreover, the concentration of organic acids in the soil solution is regularly low, it varies between 1 to 50 μM and they have one or more carboxylic groups. Depending on the properties of

dissociation and the number of carboxylic groups, the organic acids have a negative charge, for this reason they can form complex metallic cations and displace the anions from the soil solution (Fox *et al.*, 1990; Sagoe *et al.*, 1997), additionally, moreover the release of organic acids from roots can operate by multiple mechanisms (Jones, 1998).

Mineral andisols weathering: The andisols are dominated by short-range-order compounds (e.g. allophane, imogolite), including organo-metallic complexes, ferrihydrite, and aluminosilicates, that are formed largely *in situ* (Herrera *et al.*, 2007), which high buffer capacity due to mineral and organic colloids resulting from the weathering of volcanic ash (allophane, imogolite and complex humus-Al); and have variable surface charge, so changes in pH modified their ion exchange capacity (Qafoku *et al.*, 2004), weathering products such as Al, iron (Fe), and non-crystalline aluminosilicates stabilize humic substances and render them recalcitrant to decomposition, i.e., humic acids are accumulated (humification). Aluminum and Fe-humus complexes are only

sparingly soluble and therefore they accumulate at the surface, forming dark thick surface horizon especially under grass vegetation and humid climate (histic or melanic epipedons). The

formation of Al, Fe-humus complexes is associated with a change in soil color (black color - organic matter), which is called melanization (Grunwald, 2015).

Table 1. Organic acids in some organism and their biosynthetic routes.

Organism producer	Type of organic acid	Biosynthetic routes	Reference
BACTERIA			
<i>Acetobacter aceti</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i>	acetic	Incomplete oxidation of sugars (fermentation acetic)	(Paredes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus liqueniformis</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	lactic	(Glycolysis) Fermentation primary lactic	(Bano <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	oxalic	Tricarboxylic acids	(Paredes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Erwinia herbicola</i> and <i>Yarrowia lipolytica</i>	citric	Tricarboxylic acids	(Vassileva <i>et al.</i> , 2000)
<i>Bacillus liqueniformis</i> and <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	butyric	Anaerobic oxidation of pyruvate	(Paredes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas putida</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i>	succinic	Glyoxylate and acid cycle tricarboxylic	(Liu <i>et al.</i> , 1992)
<i>Bacillus megaterium</i>	malic	Tricarboxylic acids	(Paredes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>	gluconic	Direct oxidation of the glucose	(Paredes <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	fumaric	Tricarboxylic acids	(Harrison <i>et al.</i> , 1972)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> and <i>Bacillus firmus</i>	2-Cetoglucónico	Direct oxidation of the glucose	(Anderson <i>et al.</i> , 1985)
FUNGUS			
<i>Talaromyces flavus</i> (S73), <i>T. flavus</i> var <i>flavus</i> (TM), <i>Talaromyces helicus</i> (L7b) y <i>T. helicus</i> (N24), <i>Penicillium janthinellum</i> (PJ) y <i>Penicillium purpurogenum</i> (POP)	gluconic acid, citric and valeric, malic, succinic, fumaric, and lactic acids		(Scervino <i>et al.</i> , 2010)

Actinobacteria <i>Streptomyces</i> , <i>Kitasatospora</i> and <i>Streptacidiphilus</i>	oxalic acid, citric acid and gluconic acid		(Prada, 2013)
PLANT <i>Zea mays</i>	citric, malic Amino acids: Aspartic and glycine	Ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos).	(Ibarra, 2011; Nigam <i>et al.</i> , 2001; Srivastava <i>et al.</i> , 1999)
<i>Festuca rubra</i>	Amino acids: histidine, proline, valine, alanine, glycine, aspartic acid, arginine, tyrosine, methionine. Carbohydrates: mannose, galactose, glucose, glucuronate, xylose and arabinose, cítrico, oxálico, málico, malónico, maléico, fumárico, tartárico and succínico		(Ibarra, 2011)

Allophane and imogolite are common early-stage residual weathering products of volcanic glass and both have poorly-ordered structures. Allophane forms inside glass fragments where silica concentration and pH are high and has a characteristic spherule shape. Imogolite tends to form on the exterior of glass fragments under conditions of lower pH and silica concentration, and has a characteristic thread-like morphology. Both allophane and imogolite may complex with organic matter. In some instances, where organic matter is rapidly accumulating, neither allophane or imogolite form in large amounts. Instead, opaline silica and aluminum-

humus complexes are formed, which appear to inhibit allophane and imogolite formation (Grunwald, 2015; Levard *et al.*, 2012; Parfitt, 2009).

Mechanisms for increasing rates of weathering involve formation of “surface complexes” with ions on the surface of the mineral, and lowering of the pH of the soil solution. However, neither mechanism is likely to have a significant effect on the dissolution rates of primary minerals of granitic rocks, but may have an effect on more mafic rock types. There will also be significant effects in the microenvironments around rootlets or fungal hyphae, where organic acid

concentrations may be much higher than in bulk soil solution (Drever *et al.*, 1994).

The addition of organic matter to the soil can improve the development of soil microbiology, increase production of root exudates, and therefore enhance the presence of LMWOA (Cama *et al.*, 2006). Soil organic matter (SOM) represents the main edaphic reserve of carbon (C). It has molecules with properties and differentiated composition, which makes to SOM responsible for fundamental activities in the soil. The relationship of SOM within and with edaphic life creates a group of emergent properties that generate resilience, and promote fertility and biodiversity in the soil, nowadays, the multi functionality of SOM in agro-ecosystems has been recognized and use to improve their management (Labrador, 2012; Zunino *et al.*, 1985).

Organic matter importance: The thick A horizon of Andisols contains large quantities of soil organic matter. The principal reason for the extraordinary accumulation of organic matter in Andisols has been explained by the stable combination of soil organic matter with

amorphous materials such as allophone (Ishizuka *et al.*, 1977). Under the changes in land management, soil has historically played the roles of both source and sink of carbon (Torbert *et al.*, 1997), protection of organic matter occurs through adsorption of organics on mineral surfaces, complexation of organics with metals in solution, the formation of soil aggregates and/or other processes that limit the microbes' access to organic compounds or increase the energy required to initiate decomposition (Six *et al.*, 2002; Sollins *et al.*, 2007; Sollins *et al.*, 1996).

The organic matter subjected to microbial decay in soil comes from several sources. Vast quantities of plant remains and forest litter decompose above the surface. Subterranean portions of the plant and the above-ground tissue that are mechanically incorporated into the soil body become food of the microorganisms. Animal tissue and excretory products are also subjected to attack. In addition the cells of the microorganisms serve as a source of carbon and nitrogen for succeeding generations of the microscopic population (Kögel-Knabner *et al.*, 2018),

and the organic matter affects the majority of the soil chemical, physical and biological properties that are linked with its quality, sustainability, and productive capacity (Carter, 2002; Martínez *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2004).

The increase in stability of SOM has been hypothesized to be gained from the protection of SOM from mineralizing agents, thus increasing C mean residence time, up to millennial time periods. The amount of SOM stabilized by soil minerals is known to be influenced by the mineral size, surface functional groups, specific surface area and porosity of the minerals involved. However, there is still a lack of understanding of the mineralogy and chemistry of organic-mineral compounds, and the stabilizing mechanisms involved in the protection of SOM in-situ (Han *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Kögel-Knabner *et al.*, 2008).

Discussion

Soil properties are a result of interaction between nature and behavior soil components: minerals (45 %), water (25 %), and air (25 %), soil organic matter (5 %), microorganisms (0,01 %), organic

matter in soil requires processes of carbon stabilization, which have been explained by soil aggregation as a physical mechanism, and by chemical and biochemical means, where the dominant presence of carboxylic groups plays a key role in the formation of complex and recalcitrant carbon compounds, as well as, in the level of interaction with mineral colloids (Six *et al.*, 2002; Larson *et al.*, 1990).

Biological inputs and organic matter cycling have long been regarded as important factors in the physical and chemical development of soils. In particular, the extent to which LMWOA, such as oxalate, influence geochemical reactions has been widely studied (Lawrence *et al.*, 2014), the mineral weathering is enhanced through several processes including ligand promoted dissolution; the influence of organic-metal complexation on dissolution reaction affinity; and/or the changes in soil pH resulting from organic acid dissociation and the production of carbon dioxide (CO₂) through the decomposition of organic products. Organic acids affect the mineralogy of soils mostly through their ability to

complex and transport Fe and Al, resulting in a characteristic profile development of humid regions. There is considerable controversy as to whether organic acids at natural concentrations significantly accelerate the rate of dissolution of primary silicate minerals (Drever *et al.*, 1994).

The Al in volcanic ash soils forms stable bonds with SOM, which enhances with the increase of humification. The accumulation mechanism of humus is attributed to the interaction clay-humus specifically allophane-humus (Broquen *et al.*, 2004; Cascaredo *et al.*, 2001), these processes are very important during the formation of melanic and fulvic horizons (Shoji *et al.*, 1990; Shoji *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2002). Moreover, the high buffer capacity (resistance to pH change) of Andisols is due to the fact that the clays resulting from the weathering of volcanic ash (allophane, imogolite and humus-Al complexes) have a very reactive surface, and small changes in pH increase cation exchange capacity (CIC); for this reason, these soils are known as variable load soils (Fox, 1985; Uehara *et al.*, 1985).

One of the most important characteristics of Andisols is their capacity of fixing phosphate, so that is nutrient is in a plant-unavailable form. The highest P fixation is found in those Andisols that are fine-textured and have relatively high Al/Si ratios. The phosphate is apparently bound by the Al via an anion exchange for hydroxyl that acts as a chelating agent (Espinosa *et al.*, 2015), phosphorus (P) immobilize (fix) on the surface of amorphous minerals. This is perhaps the main chemical limiting factor of the Andisols, however, the Andosols' P-fixing capacity varies with the type of clay present, a condition that in turn seems to be determined by the height at which the ash deposits that formed the soil are found. The mechanisms of P fixation in allophane and imogolite include processes such as chemisorption, structural silicon (Si) displacement, and precipitation. So, the importance of humus-Al complexes in this process has been recognized (Espinosa, 2008).

In another hand, nitrogen is one of the most important nutrients in the ecosystems and often its availability limits net primary production as well as

stabilization of SOM. The long-term storage of N on SOM was classically attributed to chemical complexity of plant and microbial residues that retarded microbial degradation. Recent advances have revised this framework, with the understanding that persistent SOM consists largely of chemically labile, microbial processed organic compounds (Kögel-Knabner *et al.*, 2018).

The potential transformation of these amorphous materials from one form to another under varying environmental conditions, and to other clays has been extensively debated in the literature. The generally accepted model would be that “short range order clays” SROCs are intermediary steps between the hydrolysis of volcanic glass and feldspars to more ordered clay mineral like halloysite, kaolinite, gibbsite and montmorillonite (Neall, 2009).

The clay fraction of volcanic soils is dominated by the presence of non-crystalline aluminosilicate-type minerals in which allophane, imogolite, ferrihydrite, and complexes of humus-aluminum. The study of the physical, chemical and biological properties of

these soils is essential to search for sustainable management alternatives that allow increasing yields (Cascaredo *et al.*, 2001). So that, root exudates and microbial communities drive mineral dissolution and the formation of nano-size minerals in soils, which are critical for soil C storage (Yu, 2018).

On the other hand, a lot of research has been done on soil aggregate stability; elucidating that microorganisms are capable of generate substances, like organic acids and its components, to promote soil aggregation and consequently improving soil structure. The implementation of soil conservation practices, such as no tillage, has been developed in order to control, or at least, minimize the agricultural soil loss, by increasing SOM and so enhancing soil structure, improving water availability, and reducing soil erosion (Mikha *et al.*, 2013).

Major mature Andisols are so highly weathered that their clay content often reaches to about one-half of total soil mass. Most of special properties of Andisols are a consequence of the characteristics of amorphous materials,

main mineral silicate of clay fraction in this type of soils is allophane, with some other minerals such as imogolite and halloysite, clay mineral fraction of Ecuadorian Andisol was dominated (> 85 %) by amorphous materials with allophane being predominant and is more stable under rainfall impact than an Colombian Oxisol and a Mollisol from USA; which was explained by greater aggregate stabilization of the Andisol due to the strong interaction between amorphous materials and high stable soil organic matter (Larson *et al.*, 1990; Espinosa, 1991).

Conclusion

For agronomic goals, the application of organic acids via organic amendments and inoculated seeds may influence on the solubility of essential and nonessential elements (especially nitrogen, phosphorous and sulphur) directly through acidification, chelation, precipitation, and oxidation-reduction processes in the rhizosphere in consequently accelerating the weathered and stabilization process of volcanic soils of Ecuador. we propose to promote the use of microorganisms are capable of

generating substances, like organic acids and its components, to promote soil aggregation and consequently improving soil structure. The presence of the indigenous microorganisms in the soil such as *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Yarrowia* spp., *Streptosporangium* spp. and *Erwinia* spp. plays an important role on the rate not only of carbon and nitrogen stabilization but also of mineral stabilization, since they have the capacity to produce low molecular weight organic acids; which end up forming stable humified materials in andisols.

Cite this article

Cáceres, E., Castro, R., Alvarado, S., Padilla, W., & Montes, O. (2020). Use of LowMolecular Weight Organic Acids for Agricultural Improvement of Ecuadorian Volcanic Soils, *Indian Journal of Pure & Applied Bioscience*. 8(4), 1-13. doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2582-2845.8159>

References

- Anderson, S., Marks, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W., & Estell, D. (1985). Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science*, *230*(4722), 144–149.
- Asio, V. (2014). Research productivity in soil science in the Philippines. *Scientometrics*, *100*(1), 261–272.
- Bachmann, J., Goebel, M.-O., Krueger, J., Fleige, H., Woche, S. K., Dörner, J., & Horn, R. (2020). Aggregate stability of south Chilean volcanic ash soils—A combined XPS, contact angle, and surface charge analysis. *Geoderma*, *361*, 114022.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, *19*(2), 90–98.
- Bano, N., & Musarrat, J. (2003). Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. *Letters in Applied Microbiology*, *36*(6), 349–353.
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *15*(1), 101–113.
- Bolan, N. S., Naidu, R., Mahimairaja, S., & Baskaran, S. (1994). Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*, *18*(4), 311–319.
- Broquen, P., Candan, F., Lobartini, J. C., & Girardin, J. L. (2004). Relaciones entre el carbono orgánico y propiedades edáficas y del sitio en suelos derivados de cenizas volcánicas, sudoeste de Neuquén (Argentina). *Ciencia Del Suelo*, *22*, 73–82.
- Cama, J., & Ganor, J. (2006). The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *70*(9), 2191–2209.
- Carter, M. R. (2002). Soil quality for sustainable land management. *Agronomy Journal*, *94*(1), 38–47.
- Cascaredo, A. C., Oleschko, K., Huerta, L. C., Etchevers, J. D., & Hidalgo,

- C. (2001). Estimación de a lofano y su relación con otros parámetros químicos en Andisoles de montaña del volcán Cofre de Perote. *Terra*, 19(2), 105–116.
- Cordova, J., & Valverde, F. (2001). Potato Response to Potassium Application in Volcanic Soils. *Better Crops International*, 15(1), 16–18.
- Dahlgren, R., Saigusa, M., & Ugolini, F. (2004). The nature, properties and management of volcanic soils. *Advances in Agronomy*, 82, 113–182.
- Delmelle, P., Opfergelt, S., Cornelis, J.-T., & Ping, C.-L. (2015). Chapter 72 - Volcanic Soils A2 - Sigurdsson, Haraldur. In *The Encyclopedia of Volcanoes (Second Edition)* (pp. 1253–1264). Academic Press. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385938-9.00072-9>
- Drever, J. I., & Vance, G. F. (1994). Role of soil organic acids in mineral weathering processes. In *Organic acids in geological processes* (pp. 138–161). Springer. <https://www.researchgate.net/publication/226491517/download>
- Espinosa, J. (1991). Los suelos volcánicos del Ecuador. *El Paisaje Volcánico de La Sierra Ecuatoriana. Geomorfología, Fenómenos Volcánicos y Recursos Asociados*, 55–60.
- Espinosa, J. (2004). Suelos volcánicos, dinámica del fosforo y producción de papa. *Memorias Del XVI Congreso Latinoamericano de La Ciencia Del Suelo. SCCS, Cartagena, Colombia*.
- Espinosa, J, Moreno, J., & Bernal, G. (2018). *The Soils of Ecuador*. <https://books.google.com.mx/books?id=pnQ7DwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=soil+ecuador&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjWrcrcu-zgAhVCG6wKHQshA7cQ6AEILDAA#v=onepage&q=soil+ecuador&f=false>
- Espinosa, J, & Sanabria, Y. (2015). Procesos específicos de formación en Andisoles, Alfisoles Y Ultisoles en Colombia. *Revista EIA*, 2, 85–97.
- Espinosa, José. (2008). Distribución, uso y manejo de los suelos de la Región Andina. In J Espinosa (Ed.), *XI Congreso Ecuatoriano de la*

- Ciencia del Suelo*. Sociedad Ecuatoriana de la Ciencia del Suelo.
- Fox, R. (1985). Soils with variable charge: agronomic and fertility aspects. In B. Theng (Ed.), *Soils with variable charge* (pp. 195–224). New Zealand Society of Soil Science.
- Fox, T., & Comerford, N. (1990). Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the southeastern USA. *Soil Science Society of America Journal*, 54(4), 1139–1144.
- García-Rodeja, E., Nóvoa, J. C., Pontevedra, X., Martínez-Cortizas, A., & Buurman, P. (2004). Aluminium fractionation of European volcanic soils by selective dissolution techniques. *CATENA*, 56(1), 155–183.
- Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz Gaistardo, C., Encina Rojas, A., Jones, A., Krasilnikov, P., Mendonça Santos Brefin, M. L., Montanarella, L., Muniz Ugarte, O., Schad, P., Vara Rodríguez, M. I., & Vargas, R. (2014). *Atlas de suelos de América Latina y el Caribe* (Issues L–2995, p. 176). Comisión Europea - Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
- Gómez Sánchez, M. (2013). *Absorción, extracción y manejo nutricional específico en el cultivo de papa en la planicie cundiboyacense*. Fedepapa; ingepant.com/fedepapa.pdf.
- González, M., & Zapata-Pérez, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 82, 53–61.
- Grunwald, S. (2015). *Andisols*. Soil and Water Science Department; University of Florida. <http://soils.ifas.ufl.edu/faculty/grunwald/teaching/esoilscience/andisols.shtml>
- Han, L., Sun, K., Jin, J., & Xing, B. (2016). Some concepts of soil organic carbon characteristics and mineral interaction from a review of literature. *Soil Biology and Biochemistry*, 94, 107–121. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.11.023>
- Harrison, M. J., Pacha, R. E., & Morita, R. Y. (1972). Solubilization of Inorganic Phosphates by Bacteria Isolated from Upper Klamath Lake

- SEDIMENT1. *Limnology and Oceanography*, 17(1), 50–57.
- Heckman, K., Grandy, A. S., Gao, X., Keiluweit, M., Wickings, K., Carpenter, K., Chorover, J., & Rasmussen, C. (2013). Sorptive fractionation of organic matter and formation of organo-hydroxy-aluminum complexes during litter biodegradation in the presence of gibbsite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 121, 667–683.
- Herrera, M. C., Lizcano, A., & Santamarina, J. C. (2007). Colombian volcanic ash soils. In T. Tan, K. Phoon, D. Hight, & S. Leroueil (Eds.), *Characterization and engineering properties of natural soils* (pp. 2385–2409).
- Ibarra Rubio, A. (2011). *Caracterización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular presentes en exudados radiculares de zea mays: aplicaciones para la remediación de suelos contaminados por metales pesados*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ishizuka, Y., & Black, C. A. (1977). *Soils derived from volcanic ash in Japan*.
- Jones, D. (1998). Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil*, 205(1), 25–44.
- Jones, E., & Singh, B. (2014). Organo-mineral interactions in contrasting soils under natural vegetation. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 1–15.
- Kaurichev, I., Ivanova, T., & Nozdrunova, Y. M. (1963). Low molecular organic acid content of water-soluble organic matter in soils. *Soil Sciences and Plant Analysis*, 22, 223–229.
- Kögel-Knabner, I., & Rumpel, C. (2018). Advances in Molecular Approaches for Understanding Soil Organic Matter Composition, Origin, and Turnover: A Historical Overview. In *Advances in Agronomy* (Vol. 149, pp. 1–48). Elsevier.
- Kögel-Knabner, I., Guggenberger, G., Kleber, M., Kandeler, E., Kalbitz, K., Scheu, S., Eusterhues, K., & Leinweber, P. (2008). Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171(1), 61–82.
- Labrador, J. (2012). Avances en el conocimiento de la dinámica de la

- materia orgánica dentro de un contexto agroecológico. *Agroecología*, 7(1), 91–108.
- Larson, W. E., & Padilla, W. A. (1990). Physical properties of a Mollisol, an Oxisol and an Inceptisol. *Soil and Tillage Research*, 16(1), 23–33.
- Lawrence, C., Harden, J., & Maher, K. (2014). Modeling the influence of organic acids on soil weathering. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 139, 487–507. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016703714003329>
- Levard, C., Doelsch, E., Basile-Doelsch, I., Abidin, Z., Miche, H., Masion, A., Rose, J., Borschneck, D., & Bottero, J. Y. (2012). Structure and distribution of allophanes, imogolite and proto-imogolite in volcanic soils. *Geoderma*, 183–184, 100–108. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.03.015>
- Li, X., Chen, X., Liu, X., Zhou, L., & Yang, X. (2012). Characterization of soil low-molecular-weight organic acids in the Karst rocky desertification region of Guizhou Province, China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 6(2), 195–203.
- Liu, S., Lee, L., Tai, C., Hung, C., Chang, Y., Wolfram, J. H., Rogers, R., & Goldstein, A. H. (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5814–5819.
- López-Reyes, L., Hernández-Espinosa, M. Á., Ruiz-Careaga, J., Carcaño-Montiel, M. G., de la Rosa, G. M., Portillo-Reyes, R., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Adsorción de ácidos carboxílicos de origen vegetal y bacteriano en un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*, 30(3), 261–270.
- Martínez, E., Fuentes, J. P., & Acevedo, E. (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de La Ciencia Del Suelo y Nutrición Vegetal*, 8(1), 68–96.
- Matus, F., Rumpel, C., Neculman, R., Panichini, M., & Mora, M. L. (2014). Soil carbon storage and

- stabilisation in andic soils: A review. *CATENA*, 120, 102–110.
- Mikha, M. M., Vigil, M. F., & Benjamin, J. G. (2013). Long-term tillage impacts on soil aggregation and carbon dynamics under wheat-fallow in the central Great Plains. *Soil Science Society of America Journal*, 77(2), 594–605.
- Moreno, J., Yerovi, F., Herrera, M., Sánchez, D., & Espinosa, J. (2016). Soils from the ecuadorian highlands. In José Espinosa, J. Moreno, & G. Bernal (Eds.), *Soils of Ecuador*. Springer.
- Neall, V. E. (2009). Volcanic soils. *Land Use, Land Cover and Soil Sciences. Encyclopedia of Life Support Systems, EOLSS Publishers, Oxford*, 23–45.
- Neculman, R., Rumpel, C., Matus, F., Godoy, R., Steffens, M., & Mora L, M. (2013). Organic matter stabilization in two Andisols of contrasting age under temperate rain forest. *Biology and Fertility of Soils*, 49(6), 681–689. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00374-012-0758-2#page-1>
- Nigam, R., Srivastava, S., Prakash, S., & Srivastava, M. M. (2001). Cadmium mobilisation and plant availability—the impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant and Soil*, 230(1), 107–113.
- Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fósforo: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61–70.
- Parfitt, R. L. (2009). Allophane and imogolite: role in soil biogeochemical processes. *Clay Minerals*, 44(1), 135–155.
- Pfeiffer, T. (2014). *How many volcanoes are there in the world?* <https://www.volcanodiscovery.com/home.html>
- Prada, L. D. (2013). Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. In *Facultad de ciencias- instituto de biotecnología*. <http://www.bdigital.unal.edu.co/10706/1/luisdanielpradasalcedo.2013.pdf>
- Qafoku, N. P., Ranst, E. Van, Noble, A.,

- & Baert, G. (2004). Variable Charge Soils: Their Mineralogy, Chemistry and Management. In *Advances in Agronomy: Vol. Volume 84* (pp. 159–215). Academic Press. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)84004-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(04)84004-5)
- Sagoe, C. I., Ando, T., Kouno, K., & Nagaoka, T. (1997). Effects of organic-acid treatment of phosphate rocks on the phosphorus availability to Italian ryegrass. In *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment* (pp. 619–624). Springer.
- Sanchez, J. E., Harwood, R. R., Willson, T. C., Kizilkaya, K., Smeenk, J., Parker, E., Paul, E. A., Knezek, B. D., & Robertson, G. P. (2004). Managing soil carbon and nitrogen for productivity and environmental quality. *Agronomy Journal*, *96*(3), 769–775.
- Scervino, J. M., Mesa, M. P., della Mónica, I., Recchi, M., Moreno, N. S., & Godeas, A. (2010). Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. *Biology and Fertility of Soils*, *46*(7), 755–763. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0482-8>
- Shoji, S., Kurebayashi, T., & Yamada, I. (1990). Growth and chemical composition of Japanese pampas grass (*Miscanthus sinensis*) with special reference to the formation of dark-colored andisols in northeastern Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, *36*(1), 105–120.
- Shoji, S., Nanzyo, M., & Dahlgren, R. A. (1994). *Volcanic ash soils: genesis, properties and utilization* (Vol. 21). Elsevier.
- Six, J., Conant, R. T., Paul, E. A., & Paustian, K. (2002). Stabilization mechanisms of soil organic matter: implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil*, *241*(2), 155–176.
- Six, Johan, Feller, C., Denef, K., Ogle, S., Sa, J. C. D. M., & Albrecht, A. (2002). Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils-Effects of no-tillage. *Agronomie*, *22*(7–8), 755–775.
- Sollins, P., Homann, P., & Caldwell, B. A. (1996). Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, *74*(1–2), 65–105.

- Sollins, P., Swanston, C., & Kramer, M. (2007). Stabilization and destabilization of soil organic matter—a new focus. *Biogeochemistry*, *85*(1), 1–7.
- Srivastava, S., Prakash, S., & Srivastava, M. M. (1999). Studies on mobilization of chromium with reference to its plant availability—Role of organic acids. *Biometals*, *12*(3), 201–207.
- Takahashi, T., & Shoji, S. (2002). Distribution and classification of volcanic ash soils. *GLOBAL ENVIRONMENTAL RESEARCH-ENGLISH EDITION*-, *6*(2), 83–98.
- Torbert, H., Roger, H., Prior, S., Schlesinger, W., & Runion, B. (1997). Effects of elevated atmospheric CO₂ in agroecosystems on soil carbon storage. *Global Change Biology*, *3*(6), 513–521.
- Tsai, C. C., Chen, Z. S., Kao, C. I., Ottner, F., Kao, S. J., & Zehetner, F. (2010). Pedogenic development of volcanic ash soils along a climosequence in northern Taiwan. *Geoderma*, *156*(1), 48–59.
- Uehara, G., & Gillman, G. (1985). The mineralogy, chemistry, and physics of tropical soils with variable charge clays. *Soil Science*, *139*(4), 380.
- Van Hees, P. A. W., Lundström, U. S., & Giesler, R. (2000). Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution—composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. *Geoderma*, *94*(2–4), 173–200.
- Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.-M., & Vassilev, N. (2000). Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, *35*(7), 693–697.
- Villegas, D. C., Pereyra, F. X., & Ferrer, J. A. (2007). Suelos, factores de formación y procesos pedogenéticos en el centro oeste de la provincia de Santa Cruz. *Revista de La Asociación Geológica Argentina*, *62*(3), 366–374.
- Wang, C., Wang, Z., Lin, L., Tian, B., & Pei, Y. (2012). Effect of low molecular weight organic acids on phosphorus adsorption by ferric-alum water treatment residuals. *Journal of Hazardous Materials*, *203–204*, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2>

011.11.084

Wood, S. A., & Bradford, M. A. (2018). Leveraging a New Understanding of how Belowground Food Webs Stabilize Soil Organic Matter to Promote Ecological Intensification of Agriculture. In *Soil Carbon Storage* (pp. 117–136). Elsevier.

Xiao, M., & Wu, F. (2014). A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 26(5), 935–954.

[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60570-7)

1016/S1001-0742(13)60570-7

Yu, G. (2018). Root Exudates and Microbial Communities Drive Mineral Dissolution and the Formation of Nano-size Minerals in Soils: Implications for Soil Carbon Storage. In *Root Biology* (pp. 143–166). Springer.

Zunino, H., Borie, F., & Tosso, J. (1985). Materia orgánica y procesos biológicos en suelos alofánicos. *Suelos Volcánicos de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile*, 434–490.



Universidad Autónoma Chapingo

Doctorado en Ciencias en Horticultura

CAPÍTULO III.

Fuentes edáficas y sistemas de labranza sobre el rendimiento y la calidad nutricional del frijol ejotero en suelos volcánicos ecuatorianos

Bioscience Research

ISSN: 1811-9506. Online ISSN: 2218-3973

Year: 2021, Volume: 18. Issue: 4

www.isisn.org

[https://www.isisn.org/BR18\(4\)2021/3132-3142-18\(4\)2021BR21-442.pdf](https://www.isisn.org/BR18(4)2021/3132-3142-18(4)2021BR21-442.pdf)

CAPÍTULO III. FUENTES EDÁFICAS Y SISTEMAS DE LABRANZA SOBRE EL RENDIMIENTO Y LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL FRIJOL EJOTERO EN SUELOS VOLCÁNICOS ECUATORIANOS

CAPÍTULO III. EDAPHIC SOURCE AND TILLAGE SYSTEMS ON YIELD AND NUTRITIONAL QUALITY OF GREEN BEAN IN ECUADORIAN VOLCANIC SOILS

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar los efectos de cuatro fuentes edáficas y dos sistemas de labranza sobre el rendimiento y las propiedades nutricionales del frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) en suelo volcánico de los Andes ecuatorianos. Para ello se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar en campo según los tratamientos en parcelas divididas, donde las parcelas principales fueron los sistemas de labranza y las subparcelas las fuentes edáficas (fuentes abastecedoras de nutrimentos) como fertilizantes químicos, orgánicos y biofertilizantes. Se realizó la evaluación del rendimiento, la altura de la planta y el contenido nutricional del frijol ejotero. La calidad nutricional no se ve afectada por la fuente de aporte de nutrimentos utilizada, fertilización química, orgánica o biofertilizantes. Sin embargo, los resultados de rendimiento que se obtuvieron para el tratamiento de composta enriquecida con bacterias nitrificantes del género *Rhizobium* sp. mexicano fue de 84.64 g por planta y labranza mínima con la enmienda edáfica de composta enriquecida con *Rhizobium* sp. ecuatoriano fue de 93.49 g por planta. La aplicación de rizobios y composta no presentó diferencias estadísticamente significativas en la variable respuesta de crecimiento de las plantas. La cepa de rizobios ecuatoriana tuvo un mejor comportamiento que la cepa mexicana, lo cual está relacionado con su nivel de adaptación a las condiciones agroclimáticas.

Palabras clave: biofertilizantes, composta, labranza, *Rhizobium*, Andisoles.

ABSTRACT

The main objective of this paper was to determine the effects of four edaphic sources and two tillage systems on the yield and nutritional properties of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in volcanic soil in the Ecuadorian Andes. For this propose, an experimental design of complete random blocks was established in the field according to the treatments in divided plots, where the main plots were the tillage systems and the subplots the following: edaphic sources (sources of nutrients) such as chemical, organic fertilizers, and biofertilizers. The evaluation of the yield, the plant height, and the nutritional content of the green beans was carried out. Nutritional quality is not affected by the nutrient supply source used, chemical fertilization, organic or biofertilizers. However, the yield results obtained for the treatment of compost enriched with nitrifying bacteria of the genus *Rhizobium* sp. of Mexican origin, was 84.64 g per plant and minimum tillage with the edaphic amendment of compost enriched with Ecuadorian *Rhizobium* sp. was 93.49 g per plant. The application of rhizobia and compost did not present statistically significant differences in the plant growth response variable. The Ecuadorian rhizobia strain had a better performance than the Mexican strain, which is related to its level of adaptation to agroclimatic conditions.

Keywords: biofertilizers, compost, tillage, *Rhizobium*, Andisols.



Available online freely at www.isisn.org

Bioscience Research

Print ISSN: 1811-9506 Online ISSN: 2218-3973

Journal by Innovative Scientific Information & Services Network



RESEARCH ARTICLE Bioscience Research, 2021 volume 18(4):3132-3142. OPEN ACCESS

Edaphic sources and tillage systems on yield and nutritional quality of green bean in ecuadorian volcanic soils

Cáceres-Acosta, Edwin^{1,2}; Castro-Brindis, Rogelio¹; Colinas-León, María¹; Juárez-Hernández, Ma. de Jesús¹; Almaraz-Suárez, Juan³; Ramírez-Cando, Lenin⁴; Aguirre-Flores, Alejandro²; Montoya-García, Cesar¹ & Montes-Colmenares, Odón⁵.

¹Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, 56230, **México**

² Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Ciudadela Universitaria, Quito, Pichincha, **Ecuador**

³Colegio de Posgraduados Montecillo, Texcoco, Estado de México. 56230, **México**

⁴Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay. Escuela de Ciencias Biológicas e Ingeniería. San Miguel de Urcuquí, Imbabura, **Ecuador**

⁵Dirección de Producción Sustentable. Dirección General de la Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural. Gobierno de la Ciudad de México. Xochimilco, **México**

*Correspondence: Montes.horticulture@outlook.com Received 00-00-2021, Revised: 00-00-2021, Accepted: 00-00-2021 e-Published: 00-00-2021

The main objective of this paper was to determine the effects of four edaphic sources and two tillage systems on the yield and nutritional properties of green beans in volcanic soil in the ecuadorian Andes. For this propose, an experimental design of complete random blocks was established in the field according to the treatments in divided plots, where the main plots were the tillage systems and the subplots the following: edaphic sources such as chemical, organic fertilizers, and biofertilizers. The evaluation of the yield, the plant height, and the nutritional content of the green beans was carried out. Nutritional quality is not affected by the nutrient supply source used, chemical fertilization, organic or biofertilizers. However, the best yield results were obtained for the treatment of compost enriched with Mexican *Rhizobium spp.* (84.64 g per plant), and minimum tillage with the edaphic amendment of compost enriched with Ecuadorian *Rhizobium spp.*, (93.49 g per plant). The application of rhizobia and compost did not present statistically significant differences in the plant growth response variable. The Ecuadorian rhizobia strain had a better performance than the Mexican strain, which is related to its level of adaptation to agroclimatic conditions.

Keywords: fertilization sources, organic fertilizers, biofertilizers, *Rhizobium spp.*, ecuadorian strain

INTRODUCTION

The population increase at the global level, foreseen for this century, requires urgent attention and solutions; in the coming years, agricultural production should be increased in a more sustainable and environmentally friendly way (Del Pozo, 2020). The debate about the technologies that should be applied, for example, in the search for profitable production, a sector of farmers has tried to use the methods and principles of conventional agriculture, which require high use of external inputs, particularly synthetic fertilizer sources, but they have not been able to meet their objective because the cost of production is high compared to relatively low yields, especially in legumes. However, without the proper technology, the potential for environmental damage is significant. Another productive sector has tried to adopt agroecological principles of production, particularly organic production systems (Altieri & Nicholls, 2007a; Altieri & Uphoff, 1999; Paliouff & Gornitzky, 2012; Palm *et al.*, 2014); however, the returns are disappointing, due to the limitations of this production concept.

The challenge is to find management systems that favor the fertility, conservation, and potentiation of soil microorganisms. In the last 20 years, a large amount of scientific literature on topics related to plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and, different microorganisms that act in a wide variety of plants and the mechanisms of plant growth promotion are described. However, it is unknown which of the different mechanisms of action of biofertilizers is responsible for the positive effects in the field.

In the last decade, analyzes of both molecular and morphological traits, including nodulation, have led to important changes in our understanding of legume taxonomy. In parallel, there has been an explosion in the number of genus and species of rhizobia that are known to nodule in symbiosis with legumes. (Vincent, 1981; Somasegaran & Hoben, 1985; Granda Mora, 2010; Hansen *et al.*, 2017; Tong *et al.*, 2018; Tang & Capela, 2020). However, its practical application in horticulture is very

limited and its dissemination to farmers is inefficient.

The volcanic soils of the Ecuadorian highlands represent 30 % of the total surface of the country, they are soils where the main crops that constitute the basic basket of Ecuadorian families are located, such as: beans, broad beans, peas, barley, oats, andean wheat, corn, and tubers (Calvache, 2020). To increase yields, it is necessary to carry out research with the application of conventional and unconventional techniques, in this research it is proposed to enrich the debate on the transition of production systems by evaluating the effects of tillage systems and edaphic sources on production and nutritional quality of green beans (*Phaseolus vulgaris*), in the volcanic soil of the Ecuadorian Andes, contrasting conservation agriculture, such as the minimum tillage system and the application of organic fertilizer (compost) and compost enriched with biofertilizers, opposite to conventional tillage and application of chemical fertilization, techniques typical of the conventional production system.

Legumes are a low-cost, accessible food, and relatively easy to grow, not to mention the positive impact that these crops have with reference to soil maintenance (García *et al.*, 2009). Green bean are one of the most important crops due to their nutritional quality, but since they register low yields, it is necessary to investigate strategies that allow increasing their yield per hectare; For this, the integrated use of fertilizers, organic matter, and efficient microorganisms in agricultural practices has been chosen to provide nutrients in sufficient quantities, balanced proportions, in the available form and in the period that the plants require it to favor the good development of the crop and finally, improve the yield and quality of the product (Estévez Ayala, 2018; FAO & IFA, 2002). The main objective of this paper was to determine the effects of four edaphic sources and two tillage systems on the yield and nutritional properties of green beans in volcanic soil in the Ecuadorian Andes.

MATERIALS AND METHODS

Study site

This study was conducted in lot 4.2 of the Experimental Teaching Field "La Tola" (CADET) of the Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador, located at S 0°13'28.04545'', W 78°22'16.74608'', at 2 457 masl, during the period 2019 to 2021. The CADET is located in the ecological transition zone of low montane dry forest and low montane humid forest (Cañadas, 1983; MAGAP, 2013).

The taxonomic characterization of the CADET soils corresponds to soils of the great group Durustolls (Mejía, 1986), soils that are generally eroded, shallow, are found on a hard sedimented layer (cangahua) less than one meter deep, located between 2,400 - 2,800 meters above sea level, dark brown to black in color, generally clay-sandy loam texture and neutral pH, they are found in dry climates. In the plot understudy, studies of the soil profile of 1.50 m by 150 width in length and 1.00 m in depth were carried out, using the guide for the description of soils of the FAO (2009) and keys to soil taxonomy (USDA & NRCS, 2014). Horizon A is a 25 cm molisol epipedon, taxonomically corresponding to Molisol of volcanic origin (Quispe Mamani, 2017).

The climatological data were taken from the Meteorological Station M002 "La Tola" of the National Institute of Meteorology and Hydrology of Ecuador (INAMHI); Figure 1 shows the average, maximum, and minimum temperature (Figure 1. A) as well as the rainfall regime (Figure 1. B) of the area during the period 2013 to 2020.

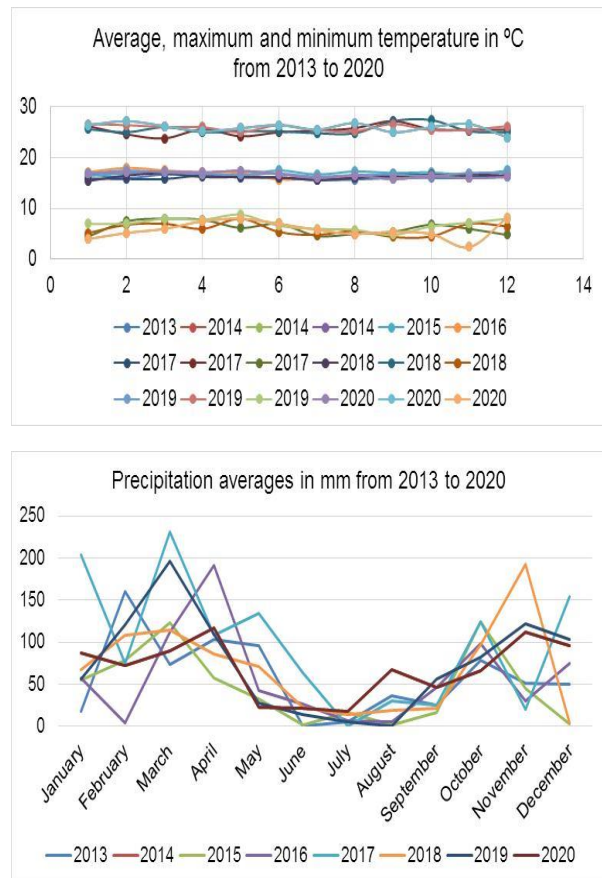


Figure 1: (A) Average, maximum and minimum temperature in ° C. (B) Average precipitation in millimeters. Data for the period 2013 - 2020. Source: INAMHI (2021).

The maximum temperatures fluctuate between 25 °C, the minimum temperatures fall between 10 to 5 °C, on average the temperatures are between 15 to 18 ° C. On the other hand, in terms of rainfall regime, it is observed that the period with the highest rainfall is between January to May, with a maximum between March and April; when rainfall exceeds 200 mm, it begins to decrease in the dry season that occurs between June to August, then in the last four months of the year, rainfall increases progressively. These sources of temporary space variability are important considerations in the cultivation cycles in the ecuadorian Andes, temperatures below 10 °C and high rainfall negatively affect the cultivation of green beans (Toledo, 2003).

Experimental design

The experiment consisted of a conventional tillage system versus a minimum tillage system with four sources or edaphic amendments: complete chemical fertilizer 10 % N, 29 % P₂O₅, 11 % K₂O, 0 % Ca, 3 % MgO, 10 % S, and 0.71 % Zn, in doses of 190 N - 30 P - 120 K - 18 Ca - 20 Mg - 30 Zn, Compost 2 - 2.5 %, N 1.8 %, P 1.3 - 1.8 % K and two commercial strains of *Rhizobium* spp. , one from Mexico and another from Ecuador. The randomized complete blocks (DBCA) experimental design was used with four replications and the treatments were distributed in an arrangement of divided plots, with net plots of 25 m², rows separated at 0.60 and 0.30 m between plants, where bean seed was sown. of the Blue Like variety, imported from the United States of North America.

Yield, plant height and, proximal and mineralogical analysis

Proximal and mineralogical analysis of green beans was carried out to determine their nutritional profile, in order to determine the effects of tillage systems and edaphic sources; in the same way, the variable response, yield, and plant height was evaluated during its development, whose values are discussed in the results section.

Statistic analysis

For the productivity analysis of the different treatments, a full factor analysis model was used according to the $Y \sim X$ model, where Y corresponds to the weight of the green beans and X to a matrix with the following description: X₁ = days to harvest with two levels (55 days and 65 days after sowing); X₂ = type of tillage with two levels (conventional tillage and minimum tillage); and, X₃ = fertilization with four levels (chemical fertilization, compost, compost + *Rhizobium* (mexican strain) and compost + *Rhizobium* (ecuadorian strain), from which the first, second and third-level effects were obtained to find the optimal region around to the variables that made up the model. The variance analyzes were carried out

using the SAS Studio computer tool and the proposed model through the R-Studio computer tool. Additionally, the unidirectional growth analysis of the plants was considered using the height of the plant as variable Y in a covariance analysis (ANCOVA) regression model as follows $Y \sim X_1 + X_2 + X_3$, according to the recommendations of several authors, so that the linear relationship between growth and time can be estimated, and observed if the factors under study caused significant changes during plant development (Heijungs y Frischknecht, 2005; FAO, 2013; Matteo et al., 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

Yield and plant height

Table 1 shows that the Compost + Rh. Mexico presents highly significant differences, with a positive increase over the mean of 15.4638 g at 65 days after sowing, and minimal tillage with the compost + Rh. Mexico treatment, presents an increase of 6.4688 g; with these data it is shown that the biofertilizer strains from Mexico gave better results in the productivity of green beans.

It is important to consider that the model applied for the productivity analysis is of the Full Factorial Design type, which requires that the variable Y be balanced in such a way that $Y \sim X_1 + X_2 + X_3$. The Compost + Rh treatment. Total Mexico results from the sum of the intercept, days after sowing 65 (DDS65), DDS65: Compost + Rh Mexico and Compost + Rh. Mexico, that is $76.7588 \text{ g} + 5.3412 \text{ g} + 15.4638 \text{ g} - 7.9238 \text{ g} = 84.6400 \text{ g}$ total for Compost enriched with *Rhizobium* spp. of Mexican origin.

For minimum tillage with total compost, the values of the intercept are added, days after sowing 65 (DDS65), Minimum tillage, DDS65: Minimum tillage: Compost and Compost, that is: $76.7588 \text{ g} + 5.3412 \text{ g} + 3.7962 \text{ g} + 13.5532 - 4.6038 \text{ g} = 94.8456 \text{ g}$ total g for Minimum Tillage with Compost amendment. Finally, regarding minimum tillage with Compost + Rh, total Ecuador is obtained from the sum of the Intercept, Days after sowing 65

(DDS65), Compost + Rh. Ecuador and DDS65: Minimum tillage: Compost + Rh Ecuador, that is: $76.7588 \text{ g} + 5.3412 \text{ g} - 0.7138 \text{ g} + 12.1112 \text{ g} = 93.4974 \text{ g}$ total. In this way, the compared real averages are obtained. Figure 2 shows the validation of the ANCOVA Regression model with an adjusted R² equal to 0.92. The standard error of the residuals is equal to 2.29 over 87 degrees of freedom. In figure 2 you can see the validation graphs of the model of both the Frequency vs. Residuals (Figure 2. A) as well as the distribution of the predicted data based on the measured data (Figure 2. B).

In table 2 it can be seen that there are only significant differences in the plant height response variable in the minimum tillage system, this is probably due to the bioavailability of organic matter and the continuous and slow mineralization process, a characteristic factor of soils, and climatic systems of the Ecuadorian Andes. The cultivation of green beans in the open field is not efficient since it is a crop that prefers the greenhouse or tropical places; some efficient cultivars may respond to inoculation, which negatively affects nitrogen and nitrogen content accumulated by the sprout, but can increase the number of nodules, specific nodulation, and the efficiency of nitrogen utilization (Viçosi *et al.*, 2020).

Organic farmers recognize the importance of using bio-inputs to meet the N-fertility needs of crops and to reduce the use of chemical fertilizers. These results clearly indicate that the symbiotic yield and dry bean grain yield can be significantly increased by using *Rhizobium* inoculation in organic farming systems. (Abou-Shanab *et al.*, 2019). That they can even exceed the yields achieved with the application of chemical fertilizers, under certain conditions of technical handling, as we confirm with the present investigation. It should also be considered that under the agrometeorological conditions of CADET, it is possible to carry out up to three cultivation cycles per year and therefore triple the yield reports of a single annual crop of the countries that present four seasons.

Nutrimental quality

In Ecuador and Mexico there is a strong culture and tradition around the consumption of beans, not so for green beans also called green beans or green beans, despite their high content of proteins, carbohydrates, fibers, calcium, and vitamins (Fernández & Sánchez, 2017; Ramírez *et al.*, 2008; Salinas *et al.*, 2012; Salinas-Ramírez *et al.*, 2013); if this legume is compared with the mature grain produced by the same plant, there is greater benefit since the green bean is also attributed nutraceutical properties (Fernández & Sánchez, 2017), have a low calorie content (Adsule, Deshpande & Sthe 2004), For this reason it is considered an ally food in the management of overweight and obesity; In a complementary way, the high values of fiber content allow to reduce the time of intestinal transit, the absorption of fats and optimal values in the postprandial blood glucose rate, this food is included in the list of preventive foods for gastrointestinal diseases (Yvestirilly, 2002).

Therefore, in table 3 the p-value obtained for the proximal analysis of the green beans can be observed, where for humidity they do not present significant differences between the tillage systems, sources of nutrients, or interaction; for ash, ether extract and N-free extract, highly significant differences associated with tillage systems are observed; Regarding protein and crude fiber, relevant parameters in nutraceuticals, significant differences are observed associated with tillage systems, contradicting what was stated by Altieri and Nicholls (2007), who mention that fertilization practices can change the composition of nutrients in the crop.

When performing the Tukey test, Table 3 identifies two ranges of statistical significance; placing the minimum tillage system in the first range and conventional tillage in the second, this response is surely related to the availability of water and nutrients due to the accumulation of organic matter and its slow mineralization (Estévez Ayala, 2018; IPNI, 2013; Ghisolfi, 2011; Julca-Otiniano *et al.*, 2006 & Peixoto *et al.*, 2002).

The values of the means in Table 3 are comparable with the results of Salinas *et al.* (2012), who mention that the caloric content of green beans is low, as well as high quality and protein concentration, this makes it a food that promises to contribute to the problems of overweight and obesity that today affect Mexico, Ecuador and other countries; It is observed that the protein and fiber contents are high and comparable with the values reported in the literature, there are significant differences between the tillage systems for the protein and fiber values, with minimum tillage being the factor with the highest protein content (22.43 g) and fiber (15.86 g) followed by conventional tillage with 21.01 g and 11.77 g respectively, values that, as evidenced in the ANOVA table, are not associated with the edaphic source used. The reported values confirm that the consumption of these foods provides opportunities to fight malnutrition and obesity, considering that the fiber concentration in legumes is much more significant than in grain, as shown in values reported by Fernández and Sánchez (2017), who affirm that the whole bean has a fiber concentration of 18.60%, its pod without grain 13.24 %, so they are statistically different, compared to the beans of other varieties such as Bayo (5.55 %), Pinto (7.18 %), Peruvian (7.09 %) or Flor de Mayo (7.57 %); However, it does not present statistical differences of significance in the Bean variety (19.86 %).

The Health and Nutrition Survey of Ecuador states that one in 10 children under the age of five suffers from overweight or obesity conditions, this figure increases with age, for example, 1 in 3 school-age children and 1 in 4 adolescents records this abnormal health condition associated with bad eating habits (Ministerio de Salud Pública & Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2014), This condition is associated with the consumption of foods with high caloric content. When the power supply; That is, the number of calories provided by food exceeds the immediate needs of the body, it tends to store its excess in the form of fat or carbohydrates, as a result of this the individual gains body weight (Youdim, 2019). In this context, green beans have low caloric value as reported Fernández and Sánchez (2017) of 221.55 kcal, a

value that is statistically lower than the bean beans of the Bayo and Pinto varieties (337.46 and 326.56 kcal, respectively).

The Spanish Food Composition Database (BEDCA) reports an even lower content for green beans (green beans), of 28 kcal per 100 g of edible portion (BEDCA, 2021c), differing from the energy content of white beans in grain, which present 242 kcal and 21.1 g of protein per 100 g of edible portion (BEDCA, 2021b). Regarding protein content, Fernández y Sánchez (2017) report for whole beans 36.33 g (for every 100 g of edible portion); The protein value reported for green beans in this study, per plant, is 21.01 g in conventional tillage and 22.43 g in minimum tillage, these values are quite close to the report for raw beef, 23.5 g per 100 g edible portion (BEDCA, 2021g). Differences in protein and calories are also evident when green beans are contrasted with important cereals such as quinoa (13.8 g - 306 kcal) (BEDCA, 2021e), raw whole wheat (11.7 g - 314 kcal) (BEDCA, 2021f), raw corn on the cob (8.4 g - 392 kcal) (BEDCA, 2021d) and rye (14.8 g - 408 kcal) (BEDCA, 2021a), demonstrating that green beans exceed their protein content in grain as well as several staple cereals and is equated with beef, but with a much lower caloric value, confirming that it is a key food In food sovereignty as well as the fight against obesity and other diseases associated with human nutrition, this food is part of the basic basket legumes.

Table 4 shows the p-value with α of 0.05 obtained from the mineral analysis of P, K, Ca, Mg, and Na of the green bean samples, it is observed that there are no statistical differences, which allows confirming that it is more importantly the application of the principle of the 4Rs of plant nutrition; that is, the most appropriate nutrient source (Right source), with the correct doses (Right rate), at the right time (Right time), in the right way and place of application (Right place) (IPNI, 2013) to guarantee adequate nutrition of the bean crop, maximizing the absorption of the cultivation system, mainly of the macronutrients in the green beans that the way

Table 1: Coefficients for the factorial model $Y \sim X$, where the intercept corresponds to the levels 55 days, conventional tillage, chemical fertilization (of the matrix X of viable regressors), and the variable weight of green beans as a response (Y).

	Estimator	Standard error	T value	p-value
Intercept	76.7588	2.2973	33.413	< 2e-16 ***
Days after sowing 65 (DDS65)	5.3412	3.2447	1.646	0.099840 •
Minimum tillage	3.7962	3.2447	1.170	0.242106
Compost	-4.6038	3.2447	-1.419	0.156042
Compost + Rh. Mexico	-7.9238	3.2447	-2.442	0.014659 *
Compost + Rh. Ecuador	-0.7138	3.2447	-0.220	0.825897
DDS65: Minimum tillage	-6.6012	4.5859	-1.439	0.150118
DDS65: Compost	-3.3712	4.5859	-0.735	0.462316
DDS65: Compost + Rh. Mexico	15.4638	4.5859	3.372	0.000755 ***
DDS65: Compost + Rh. Ecuador	-2.4662	4.5859	-0.538	0.590765
Minimum tillage: Compost	2.7788	4.5859	0.606	0.544594
Minimum tillage: Compost + Rh. Mexico	6.4688	4.5859	1.411	0.158464
Minimum tillage: Compost + Rh. Ecuador	-1.4412	4.5859	-0.314	0.753337
DDS65: Minimum tillage: Compost	13.5532	6.4834	2.091	0.036615 *
DDS65: Minimum tillage: Compost + Rh. Mexico	-2.4938	6.4834	-0.385	0.700527
DDS65: Minimum tillage: Compost + Rh. Ecuador	12.1112	6.4834	1.868	0.061849 •
Signif. Codes: 0 "****" 0.001 "***" 0.01 "**" 0.05 "*" 0.1 "•" 1 " " "				
Standard Residual Error: 32.41 of 3189 degrees of freedom				

* The asterisks (*) indicate the existence of statistically significant differences between sources of variation and the evaluated parameters. Difference between sources of variation and the evaluated parameters.

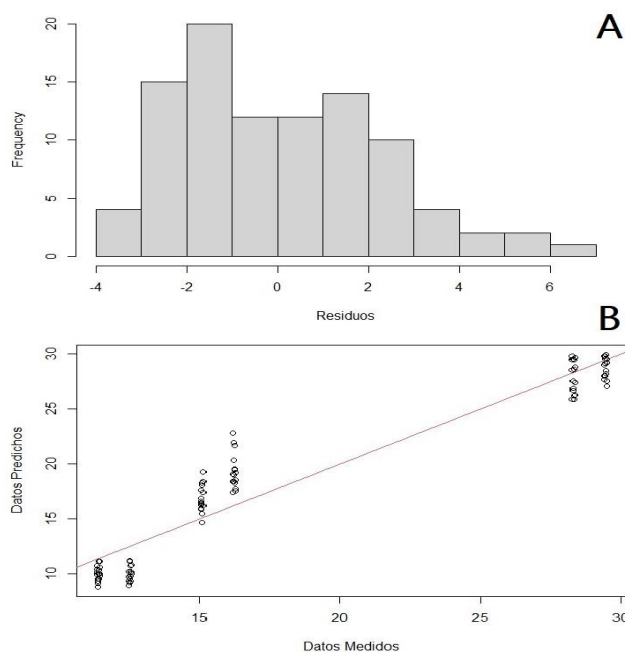


Figure 2: Validation charts. (A) Histogram of Frequencies vs. Residuals. (B) Distribution of predicted data vs. Measured data.

Table 2: Coefficients for the factorial model $Y \sim X$, where the intercept corresponds to the levels 55 days, conventional tillage, chemical fertilization (of the matrix X of viable regressors) and the variable plant height as a response (Y).

	Estimator	Standard error	T value	p-value
Intercept	7.19185	0.62803	11.451	< 2e-16 ***
DDS	0.53001	0.01688	31.399	<2e-16***
Minimum tillage	1.12844	0.46370	2.434	0.0169*
Compost	-0.01604	0.65578	-0.024	0.9805
Compost + Rh. Mexico	-0.12042	0.65578	-0.184	0.8547
Compost + Rh. Ecuador	-0.06667	0.65578	-0.102	0.9193
Signif. Codes: 0 "****" 0.001 "***" 0.01 "**" 0.05 "*" 0.1 "****" 1 " " "				
Standard Residual Error: 32.41 of 3189 degrees of freedom				

* The asterisks (*) indicate the existence of statistically significant differences between sources of variation and the evaluated parameters.

Table 3: ANOVA and Tukey's test in the proximal analysis of green beans, p-value with α of 0.05.

ANOVA						
Fuente de variación	Humidity	Ashes	Ethereal Extract	Protein	Crude fiber	N-free extract
Model	0,99ns	0,07ns	0,09ns	0,31ns	0,40ns	0,15ns
Tillage system	0,50ns	0,00**	0,04*	0,03*	0,03*	0,00**
Edaphic source	0,98ns	0,47ns	0,69ns	0,84ns	0,76ns	0,80ns
Sistema x Source	0,93ns	0,52ns	0,07ns	0,47ns	0,78ns	0,56ns
CV	1,54	11,26	22,00	8,00	8,65	8,18
Tukey's test						
Tillage system	Humidity (%)	Ashes	Ethereal Extract	Protein	Crude fiber	N-free extract
(g 100 g ⁻¹ edible portion)						
Conventional	91,77	8,94b	1,77b	21,01b	14,77b	53,50a
Minimum	92,11	10,16a	2,09a	22,43a	15,86a	49,08b
DMS	1,04	0,78	0,31	1,27	0,97	3,06

* The asterisks (*) indicate the existence of statistically significant differences and (**) indicates a high significant difference between sources of variation and the evaluated parameters. The initials (ns) indicate that statistically significant differences were not determined. Means with different letters (a and b) are different according to Tukey's test with $P \leq 0.05$.

Table 4: Results of the ANOVA of macronutrient analysis of green beans, p-value with α of 0.05.

Variation source	Phosphorus (P)	Potassium (K)	Calcium (Ca)	Magnesium (Mg)	Sodium (Na)
Model	0,81ns	0,61ns	0,91ns	0,59ns	0,00**
Tillage system	0,76ns	0,14ns	0,35ns	0,21ns	0,02*
Edaphic source	0,75ns	0,90ns	0,89ns	0,76ns	0,00**
System X Source	0,51ns	0,48ns	0,79ns	0,43ns	0,00**
CV	20,02	18,18	14,22	14,36	29,21

* The initials ns indicate that no statistically significant differences were determined.

Table 3. Results of the ANOVA of the micronutrient analysis of the green beans, p-value with α of 0.05.

Variation source	Copper (Cu)	Iron (Fe)	Manganese (Mn)	Zinc (Zn)
Model	0,26ns	0,00**	0,00**	0,05*
Tillage system	0,02*	0,06ns	0,00**	0,75ns
Edaphic source	0,90ns	0,26ns	0,02*	0,12ns
System X Source	0,41ns	0,00**	0,21**	0,04*
CV	26,63	16,32	13,31	13,39

* The asterisks (*) indicate the existence of statistically significant differences and (**) indicates a high significant d

We apply these fertilizers to the soil; that is, edaphic amendments of a different nature, chemical, organic or biofertilizer in order to reduce losses and, therefore, mitigate negative impacts on the environment.

In tables 3 and, 4 the p values with a significance alpha of 0.05 from the mineralogical analysis show highly significant statistical differences for the model, for the edaphic source factor and system-by-source interaction; for the factor under study tillage system in Na and Cu there are significant differences; for Fe highly, significant differences for the model and interaction. In Mn highly, significant differences are observed for the model, tillage system and interaction and significant for the nutrient source; finally, in Zn significant differences are observed only for the model and nutritional source. In this analysis, the effect of tillage systems and nutrient sources is evidenced, for which means comparison is made. In the case of the Tukey significance test for the variables of the mineral analysis of the green beans, only ranges are presented in the tillage systems for Cu, in the range (a) the minimum tillage. BEDCA reports for raw green beans the following macronutrient values per 100 g of edible portion: 38 mg of P, 243 mg of K, 39 mg of Ca and 25 mg of Mg, as well as the micronutrient values: 4 mg of Na, 1 mg of Fe and 0.2 mg of Zn (BEDCA, 2021c), consistent with the low values obtained in this investigation.

Beans, according to Janssen (1988), provide the vitamins and minerals that other basic foods do not contain, being a product with an upward trend in world consumption. Unfortunately, overall yields for both beans and green beans are low. Despite the great importance of the protein content of this vegetable for human nutrition, in Ecuador, there is no detailed information on this product, so it is worth strengthening this line of research. This is most likely the result of millennia of stable performance selection, and as such is a problem that can be solved using modern genetic techniques together with an

adequate management of soil fertility (Broughton *et al.*, 2003).

Janssen (1988), in addition, it makes a comparison of the nutritional composition of dry beans, green beans (green beans), bean leaves and tender beans, the results indicate that the percentage of protein in dry beans is 20.4 %, 7.0 - 10.5 % for green beans, 3.6 % of foliar origin and 2.1 % in tender beans; however, the differences in vitamin A become noticeable in the foliar composition of beans with 10 to 20 %, compared to 0 % in dry grain and 0.4 % for green beans. Fernández y Sánchez (2017) determined that the content of Cu and Zn in the pod also presents minimum concentrations, the authors conclude by mentioning that the bean seed presented the maximum concentrations in protein, N, P, K, Mg, Fe and Zn, while the bean varieties of grain studied excelled in fiber (Beans), proteins (Pinto and Bay Beans) and in Fe (Flor de Mayo Beans).

Along with the chlorophyll content, green beans also provide other phytonutrients like carotenoids, phenols, and flavonoids. All of these phytochemicals function as antioxidant and anti-inflammatory agents in the metabolism of the human body (Coronado *et al.*, 2015). Within this research, the quantification of these substances was not considered, which leaves open an opportunity to deepen the nutraceutical study of green beans in what has to do with their phytochemical profile. Additionally, several research studies suggest that these phytonutrients help reduce the risk of a wide range of chronic diseases including cardiovascular disease, high blood pressure, arthritis, diabetes, Alzheimer's disease, and cancer (Chaurasia, 2020), increasing interest in this type of crop as a source of nutrients in environments that are increasingly vulnerable to access to high-value food sources, especially basic basket legumes.

CONCLUSION

The parameters related to the nutritional quality of the green beans were not affected by the source of supply of the nutrient used in their production, that is, chemical, organic fertilization or biofertilizers do not present significant differences between them in the mentioned parameters, the best recommendation is the comprehensive management of nutrient sources with the application of the principle of the 4Rs of plant nutrition, that is, use of the most appropriate nutrients, in the correct doses, at the right time as well as in the form and place of application suitable.

The yield obtained for the edaphic amendment of Compost enriched with *Rhizobium* spp., of Mexican origin, was 84.64 g per plant. For minimum tillage with edaphic amendment of Compost enriched with *Rhizobium* spp., of Ecuadorian origin, an increase of 93.49 g per plant is obtained, so the positive impact of the application of biofertilizers on the yield of basic basket legumes is evident. When complementing the rhizobia inoculation with compost applications, no statistically significant differences were observed in the variable plant growth response.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that present study was performed in absence of any conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their gratitude to the Central University of Ecuador for the support received for the execution of this research as part of the Ph.D. program in Horticultural Sciences, gratitude that is extended to the authorities of the Universidad Autónoma Chapingo and Central University of Ecuador.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CÁCERES, CBR, CLM, JHMa.J, ASJ, AFA & MCO desingn and preparation of research, monitoring, evaluation and execution of research in the field and laboratory phase. RCL collaborated in Data Curation, Methodology, Writing and Original Draft Preparation. MGC elaboration of the experimental design, treatments and statistical analysis. All authors read and approved the final version.

Copyrights: © 2021@ author (s).

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

REFERENCES

- Abou-Shanab R. A. I., Wongphatcharachai M., Sheaffer C. C., Sadowsky, M. J., 2019. Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial *Rhizobium* strains under organic farming systems in Minnesota. *Symbiosis*, 1–10.
- Adsule R. N., Deshpande S. S., Sthe S. K., 2004. *Tratado de Ciencias y Tecnología de las Hortalizas*, Ed. 2. Editorial, Acribia, S.A. México.
- Altieri M. A., Nicholls C. I., 2007. Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. *Ecosistemas*, 16(1): 3–12. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=457>
- Altieri M., Uphoff N., 1999. Alternativas de la agricultura moderna convencional para enfrentar las necesidades de alimentos en el

- próximo siglo. Informe de La Conferencia Sobre Agricultura Sostenible: Evaluación de Los Nuevos Paradigmas y Las Prácticas Antiguas, 26–30.
- BEDCA, 2021a. Información detallada del alimento: Centeno crudo. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021b. Información detallada del alimento: Judía blanca. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021c. Información detallada del alimento: Judía verde, cruda (Green bean, raw). Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021d. Información detallada del alimento: Maíz en mazorca crudo. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021e. Información detallada del alimento: Quinoa cruda. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021f. Información detallada del alimento: trigo entero, crudo. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- BEDCA, 2021g. Información detallada del alimento: Vaca/buey, solomillo, crudo. Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <https://www.bedca.net/bdpub/> Consultado el 2 de junio de 2021.
- Broughton W. J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J., 2003. Beans (Phaseolus spp.)—model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1): 55–128.
- Calvache M., 2020. El suelo y la productividad agrícola. In Marcelo Calvache. Ed. 1., XIV Congreso de las Secs. El suelo y la matriz productiva. Universidad Técnica Equinoccial. https://www.academia.edu/9324382/LOS_SUELOS_DEL_ECUADOR.
- Cañadas L., 1983. Valle de Tumbaco. In El Mapa Bioclimático y Ecológico del Ecuador. Auspicio especial Banco Central del Ecuador (pp. 171–173; 148–149). Banco Central del Ecuador.
- Chaurasia S., 2020. Chapter 17 - Green beans. In A. K. Jaiswal. Ed. 1. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables (pp. 289–300). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00017-9>
- Coronado M., Vega y León S., Gutiérrez R., Vásquez M., Radilla C., 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana Antioxidants: present perspective for the human health. *Rev Chil Nutr*, 42(2): 212. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>
- Del Pozo J. C., 2020. Producir más alimentos de forma sostenibles es posible. Fertilización biotecnológica y sostenible ante el problema del crecimiento poblacional. *Métode Science Studies Journal*, 104: 59–65. <https://doi.org/10.7203/metode.11.15576>
- Estévez Ayala E. S., 2018. Evaluación del rendimiento de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad INIAP 484 centenario, bajo fertilización química, micronutrientes, y orgánica más *Rhizobium* sp. Quito: UCE.
- FAO, 2009. Guía para la descripción de suelos FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/3/a-a0541s.pdf>
- FAO, 2013. FAO Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture. In FAO

- Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- FAO, I. F. A., IFA, A. I., 2002. Los fertilizantes y su uso. Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación, Asociación Internacional de La Industria de Los Fertilizantes.
- Fernández A., Sánchez E., 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova Scientia*, 9(18): 133–148.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/ns/v9n18/2007-0705-ns-9-18-00133.pdf>
- García O., Infante R., Rivera C., 2009. Las leguminosas, una fuente importante de fibra alimentaria: Una visión en Venezuela. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 10(1).
http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-04772009000100008&script=sci_arttext&lng=en
- Ghisolfi E., 2011. Contenidos de materia orgánica: relación con la fertilidad del suelo en siembra directa. *Eduvim - Editorial Universitaria Villa María*.
<http://site.ebrary.com/lib/ufrosp/docDetail.action?docID=10552588>
- Graham P., 1978. Some problems and potentials of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Latin America. *Field Crops Research*, 1: 295 – 317.
- Granda Mora K., 2010. Caracterización e identificación de aislados de *Rhizobium*: comportamiento en genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Hansen A., Choudhary D., Agrawal P., Varma A., 2017. *Rhizobium Biology and Biotechnology*.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-64982-5.pdf>
- Havlin J., Beaton J., Tisdale S. Nelson W. L., 2014. *Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management*. Vol. 515. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Heijungs R., Frischknecht R., 2005. Representing Statistical Distributions for Uncertain Parameters in LCA. Relationships between mathematical forms, their representation in EcoSpold, and their representation in CMLCA (7 pp). *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 10(4): 248–254.
<https://doi.org/10.1065/lca2004.09.177>
- INAMHI, 2021. Estación Meteorológica M002 “La Tola.” Red de Estaciones Automáticas | INAMHI.
<http://186.42.174.236/InamhiEmas/#>
- IPNI, 2013. *Manual de Nutrición de Plantas 4R: Un Manual para Mejorar el Manejo de la Nutrición de plantas* (T.W. Bruulsema, P.E.Fixen, & G.D. Sulewski, Eds.). International Plant Nutrition Institute.
- Janssen W., 1988. Snap beans in the developing world. http://ciat-library.ciar.org/Articulos_ciat/2015/29937.pdf#page=10
- Jones J., Benton J., 2012. *Plant nutrition and soil fertility manual*. CRC press.
- Julca-Otiniano A., Meneses-Florián L., Blas-Sevillano R., Bello-Amez, S., 2006. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1): 49–61.
- MAGAP, 2013. Mapa Ecológico de la provincia de Pichincha, Escala 1:50.000, Año 2004. SIGTIERRAS | MAG.
<https://online.fliphtml5.com/wtae/rnjm/#p=1>
- Matteo R., D’Avino L., Ramirez-Cando L. J., Pagnotta E., Angelini L. G., Spugnoli P., Tavarini S., Ugolini L., Foschi L., Lazzeri L., 2020. Camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) under low-input management systems in northern Italy: Yields, chemical

- characterization and environmental sustainability. *Italian Journal of Agronomy*. <https://doi.org/10.4081/ija.2020.1519>
- Mejía L., 1986. Mapa general de suelos del Ecuador. IGM. PRONAREC.
- Ministerio de Salud Pública, Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2014. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Tomo 1. ENSANUT ECU 2012.
- Paliouff M., Gornitzky C., 2012. El camino de la transición agroecológica / Mariana Edith Marasas, et.al. Ed. 1. – Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA, 2012.
- Palm C., Blanco-Canqui H., DeClerck F., Gatere L., Grace P., 2014. Conservation agriculture and ecosystem services: An overview. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 187: 87–105. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.010>
- Peixoto N., Braz L. T., Banzatto D. A., Moraes E. A. F., Moreira M., 2002. Resposta de feijão-vagem a diferentes níveis de fertilidade. *Hortic. Bras.* 20(4). <https://doi.org/10.1590/S0102-05362002000400016>
- Quispe Mamani V., 2017. Comportamiento agronómico del cultivo de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) con la aplicación de tres niveles de estiércol de ovino a diferentes densidades de siembra. Tesis.
- Ramírez N. S., Estrada J. A. E., González M. T. R., Montes E. S., 2008. Rendimiento y calidad nutrimental de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) en fechas de siembra. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(3): 235 – 241.
- Salinas N., Escalante A., Rodríguez Ma. T., Sosa E., 2012. Rendimiento y Calidad Nutrimental de Frijol Ejotero en Dos Ambientes. *Rev. Fitotec. Mex*, 35(4): 317 – 323. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n4/v35n4a8.pdf>
- Salinas-Ramírez N., Escalante-Estrada J. A. S., Rodríguez-González M. T., Sosa-Montes E., 2013. Rendimiento, calidad nutrimental y rentabilidad del frijol ejotero de temporal en San Pablo Ixayoc, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 19(3): 333–342. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2010.08.031>
- Somasegaran P., Hoben HJ, 1985. Métodos en tecnología leguminosa-Rhizobium (p. 365). Paia, Maui: Proyecto NifTAL de la Universidad de Hawaii y MIRCEN, Departamento de Agronomía y Ciencias del Suelo, Instituto de Agricultura Tropical y Recursos Humanos de Hawaii, Facultad de Agricultura Tropical y Recursos Humanos.
- Tang, M., Capela, D., 2020. Rhizobium diversity in the light of evolution. In *Advances in Botanical Research*. Vol. 94, pp. 251 – 288. Elsevier.
- Toledo J. H., 2003. Cultivo de la Vainita. http://repositorio.inia.gov.pe/bitstream/inia/865/1/Toledo-Cultivo_vainita.pdf
- Tong W., Li X., Huo Y., Zhang L., Cao Y., Wang E., Chen W., Tao S., Wei G., 2018. Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4): 300 – 310.
- USDA, NRCS, 2014. Claves para la Taxonomía de Suelos (C. Ortiz - Solorio, Ma. del C. Gutiérrez - Castorena, Gutiérrez - Castorena, Eds.; Ed. 12, Vol. 1. https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_051546.pdf
- Viçosi K. A., Peixoto, N. Pelá, A., 2020. Response of snap bean cultivars of determined growing to inoculation with *Rhizobium tropici*. *Agrarian*, 13(49): 352 – 361. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v13i49.10335>
- Vincent J. M., 1981. The genus rhizobium. In *The prokaryotes* (pp. 818–841). Springer.

Youdim A., 2019. Calorías. Manual MSD.
Versión Para Público En General.
<https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/trastornos->

nutricionales/introducci%C3%B3n-a-la-
nutrici%C3%B3n/calor%C3%ADas

Yvestirilly C. M. B., 2002. Tecnología de
Hortalizas. Ed. 1. Acribia, S.A. México



Universidad Autónoma Chapingo

Doctorado en Ciencias en Horticultura

CAPÍTULO IV.

**Recuento de rizobios por el método del número más probable
y su efecto en indicadores morfológicos en frijol ejotero
(*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador.**

Artículo Publicable

Quito - Ecuador

2022

CAPÍTULO IV. RECUENTO DE RIZOBIOS POR EL MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE Y SU EFECTO EN INDICADORES MORFOLÓGICOS EN FRIJOL EJOTERO (*Phaseolus vulgaris* L.) EN ECUADOR

CHAPTER IV. RECOVERY OF RHIZOBIES BY THE MOST PROBABLE NUMBER METHOD AND ITS EFFECT ON MORPHOLOGICAL INDICATORS IN EXOTERO BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) IN ECUADOR.

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el Número Más Probable de células bacterianas de *Rhizobium* spp. procedente de dos productos comerciales, uno de origen ecuatoriano y otro mexicano, en condiciones de invernadero mediante la inoculación directa con diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-10} en pomina esterilizada al vapor donde se cultivó plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake. Además, se evaluó las variables área foliar (cm^2), peso de la planta en húmedo (g), altura de planta (cm) y número de flores (unidades por planta) a los 45 días después de la siembra (DDS), a fin de determinar diferencias estadísticas entre el tipo de biofertilizante y la concentración de cada dilución. Para el análisis estadístico se adecuó a un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcela dividida con tres repeticiones por dilución. Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas atribuibles al tipo de biofertilizante y concentración empleada, donde los indicadores morfológicos evaluados obtienen mejores características con el biofertilizante de origen ecuatoriano. El rango óptimo de concentración de diluciones fue de 10^{-7} a 10^{-9} independientemente del tipo de biofertilizante empleado.

Palabras clave: *Rhizobium*, frijol, sustratos, biofertilizantes, desarrollo.

ABSTRACT

In the present investigation, the Most Probable Number of bacterial cells of *Rhizobium* spp. from two commercial products, one of Ecuadorian origin and the other Mexican under greenhouse conditions by direct inoculation with serial solutions from 10^{-1} to 10^{-10} in steam sterilized pomina where green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of the Blue Lake variety were grown. In addition, the variables leaf area (cm^2), wet plant weight (g), plant height (g) and number of flowers (units per plant) at 45 days after planting (DAS) were evaluated in order to determine statistical differences between the type of biofertilizer and the concentration of each solution. For the statistical analysis, a randomized complete block design with split plot arrangement with three replications per dilution was used. It was determined that there are statistically significant differences attributable to the type of biofertilizer and concentration used, where the morphological indicators evaluated obtain better characteristics with the biofertilizer of Ecuadorian origin. The optimal range of concentration of dilutions was from 10^{-7} to 10^{-9} regardless of the type of biofertilizer used.

Keywords: *Rhizobium*, bean, substrates, biofertilizers, development.


Recuento de rizobios por el método del número más probable y su efecto en indicadores morfológicos en frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) en Ecuador.

Rhizobial counts by the most probable number method and their effect on morphological indicators in green bean (Phaseolus vulgaris L.) in Ecuador.

Edwin Alfredo Cáceres-Acosta¹, Rogelio Castro-Brindis², Juan José Almaraz-Suárez³,
María Teresa Colinas-León⁴, Ma. de Jesús Juárez-Hernández⁵, Alejandro Alfredo
Aguirre-Flores⁶, Roberto Odón Montes-Colmenares⁷


¹ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Ciudadela Universitaria. 170521. Quito, Pichincha, Ecuador. edwcaceres@yahoo.com.mx.  <https://orcid.org/0000-0002-1020-1872>

² Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, Estado de México, México. rcbrindis69@gmail.com.  <https://orcid.org/0000-0002-8668-8621>

³ Colegio de Posgraduados. Carretera México-Texcoco km. 36.5, 56230 Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. jalmaraz@hotmail.com.  <https://orcid.org/0000-0002-2696-2684>

⁴ Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, Estado de México, México. lozcol@gmail.com.  <https://orcid.org/0000-0003-2617-5928>

⁵ Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5. 56230. Texcoco, Estado de México, México. juarezhma@yahoo.com.mx.  <https://orcid.org/0000-0002-7843-0575>

⁶ Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. 170521. Ciudadela Universitaria. Quito, Pichincha, Ecuador. aaaguirre@uce.edu.ec.  <https://orcid.org/0000-0002-2759-4377>

⁷ Dirección de Producción Sustentable. Dirección General de la Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural. Gobierno de la Ciudad de México. Av. Año de Juárez 9700 Quirino Mendoza, Pueblo de San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, Distrito Federal. 16610. Ciudad de México, Estado de México, México.

Montes.horticulture@outlook.com.  <https://orcid.org/0000-0002-5330-3991>

Autor de correspondencia.: Edwin Alfredo Cáceres Acosta, edwcaceres@yahoo.com.mx

Resumen

El nitrógeno (N) en el suelo es un elemento limitante en la agricultura, su deficiencia se relaciona directamente con un bajo rendimiento en los cultivos requiriendo la adición de fertilizantes nitrogenados sintéticos, sin embargo, su uso inadecuado ha provocado daños ambientales y altos costos económicos y energéticos en la producción de alimentos. Las bacterias nodulíferas fijadoras de N, como las del género *Rhizobium*, son simbioses radiculares de leguminosas que permiten la fijación de N en formas biodisponibles y la disminución del uso de fertilizantes sintéticos. La presente investigación determinó el número más probable de células de *Rhizobium* spp. procedente de dos productos comerciales (ecuatoriano y mexicano), en condiciones de invernadero mediante la inoculación directa con disoluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) en pomina esterilizada al vapor donde se germinaron plantas de vainita o frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake. Se evaluó a los 45 días después de la siembra los indicadores morfológicos: área foliar, peso de la planta en húmedo, altura de planta y número de flores

para determinar diferencias estadísticas entre el tipo de biofertilizante y la concentración de cada disolución. El experimento se adecuó a un diseño de bloques completos al azar con arreglo de parcela dividida con tres repeticiones por dilución. Se determinó que existen diferencias estadísticas por el tipo de biofertilizante y concentración empleada. Los mejores indicadores morfológicos se obtuvieron con el biofertilizante de origen ecuatoriano. El rango óptimo de concentración de diluciones fue de 10^{-7} a 10^{-9} independientemente del tipo de biofertilizante empleado.

Palabras clave: Rhizobium, leguminosas, dilución, vainita, sustratos.

Abstract

Nitrogen in the soil is a limiting element in agriculture; its deficiency is directly related to low crop yields, requiring the addition of synthetic nitrogen fertilizers; however, its inadequate use has caused environmental damage and high economic and energy costs in food production. N-fixing noduliferous bacteria, such as those of the genus *Rhizobium*, are root symbionts of legumes that allow the fixation of N in bioavailable forms and the reduction of the use of synthetic fertilizers. The present investigation determined the most probable number of *Rhizobium* spp. cells from two commercial products (Ecuadorian and Mexican), under greenhouse conditions by direct inoculation with serial dilutions (10^{-1} to 10^{-10}) in steam sterilized pomina where plants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) of the Blue Lake variety were germinated. Morphological indicators were evaluated 45 days after sowing: leaf area, wet plant weight, plant height and number of flowers to determine statistical differences between the type of biofertilizer and the concentration of each solution. The experiment was adapted to a randomized complete block design with a split plot arrangement with three replicates per dilution. It was determined that there are statistical differences by type of biofertilizer and concentration used. The best morphological indicators were obtained with the biofertilizer of Ecuadorian origin. The optimum range of dilution concentration was from 10^{-7} to 10^{-9} regardless of the type of biofertilizer used.

Keywords: Rhizobium, legumes, dilution, vainita, substrates.

1. Introducción

El nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo del ciclo fenológico de las plantas, su biodisponibilidad resulta limitante en la productividad de los cultivos, ya que es requerido para la síntesis de macromoléculas como proteínas y ADN (Cerón & Aristizábal,

2012; Morales-Morales *et al.*, 2019), sin embargo, pese a ser abundante en la atmósfera en forma de N gaseoso (N_2), no está biodisponible para las plantas, limitándose a las reservas de N inorgánico en forma de amonio y nitratos (NH_4^+ y NO_3^-), formas presentes en el suelo y en las que es disponible para el

desarrollo vegetal (Pankievicz *et al.*, 2019). La deficiencia de este elemento es suplida mediante la adición de fertilizantes nitrogenados (Mahmud *et al.*, 2020), sin embargo, la producción de fertilizantes sintéticos demanda un elevado consumo de energía y altos costos (Cherkasov *et al.*, 2015), sin mencionar los efectos negativos en el ambiente como la fuga de N en forma de N₂O hacia la atmósfera y la eutrofización de los cuerpos de agua subterránea y superficial producto de la escorrentía e infiltración de formas químicas reactivas de N (Zhang *et al.*, 2020).

En la naturaleza, determinados microorganismos del suelo cumplen un papel crucial en el ciclo del N (Barrera *et al.*, 2012; Morales-Morales *et al.*, 2019). La interacción microbiana en la transformación del N implica la fijación de N₂ en NH₄⁺, éste posteriormente es asimilado y convertido en N para formar parte de la biomasa (Kuypers *et al.*, 2018). Los microorganismos responsables de la fijación biológica del N atmosférico (FBN) son conocidos diazótrofos que incluyen especies de los dominios Bacteria, Archaea y un limitado grupo de eucariotas (Mahmud *et*

al., 2020), los diazótrofos pueden clasificarse en tres grupos, dependiendo del mecanismo involucrado para la FBN (Kneip *et al.*, 2007). Los diazótrofos simbióticos fijan N únicamente en estructuras especializadas llamadas nódulos, formados por hospederos específicos de la familia Fabaceae, con excepción de *Frankia* spp., que puede formar nódulos en árboles distintos al grupo de las leguminosas (Boyd & Peters, 2013). De igual forma, los diazótrofos endofíticos fijan N al desarrollarse dentro de los tejidos vegetales de leguminosas y no leguminosas, sin presentar estructuras especializadas (Gupta *et al.*, 2019), finalmente, las bacterias diazotróficas asociativas y de vida libre, pueden fijar N mientras se desarrollan en la superficie de las raíces o en el suelo rizosférico (Nag *et al.*, 2020).

El sistema de FBN se restringe de forma especial a la relación simbiótica entre leguminosas y bacterias conocidas como “rizobios” (Mus *et al.*, 2016), este término generaliza a las bacterias de los filos α y β -proteobacteria que son capaces de formar nódulos de raíz en sus hospederos (Ferrera-Cerrato, 2007;

Lindström & Mousavi, 2020), este grupo de bacterias comprende 18 géneros de las familias Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium*., *Pararhizobium*, *Neorhizobium*, *Shinella*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*, *Aminobacter*, *Phyllobacterium*), Brucelaceae (*Ochrobactrum*), Methylobacteriaceae (*Methylobacterium*, *Microvirga*) Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*), Xanthobacteraceae (*Azorhizobium*), Hyphomicrobiaceae (*Devosia*) y Burkholderiaceae (*Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Trinickia*) (Jaiswal *et al.*, 2021; Lindström & Mousavi, 2020).

La asociación entre bacterias nodulíferas fijadoras de N (BNFN) y la planta hospedera depende del intercambio de carbono provisto a través de los fotosintatos de la planta como fuente de energía para los microorganismos, además de N en forma de NH_4^+ , que es retornado a la planta mediante la actividad de la nitrogenasa microbiana (Lindström & Mousavi, 2020). El proceso de nodulación se da lugar bajo condiciones de escasez de N en el sistema edáfico produciéndose interacciones a nivel molecular entre la

raíz de la planta y los rizobios (Maróti & Kondorosi, 2014). Esta interacción se produce gracias a compuestos polifenólicos, llamados flavonoides, exudados por la raíz hacia la rizosfera, estos actúan como quimio-activantes para los rizobios (Masson-Boivin *et al.*, 2009), en consecuencia, sus genes responsables de la nodulación (*nod*) actúan (Walker *et al.*, 2020). Esta interacción es específica, de tal suerte que los flavonoides exudados por un espectro limitado de leguminosas hospederas serán recibidos por determinadas cepas de rizobios.

El efecto de las BNFN en el desarrollo vegetal y el aumento de la producción ha sido ampliamente descrito (Giller & Cadisch, 1995; Herridge, 2008). Por ejemplo, la fijación biológica de N, producto de la inoculación de *Bradyrhizobium japonicum*, contribuye al aumento significativo del número de vainas en plantas de soya (*Glycine max* L. Merrill) (Mahmud *et al.*, 2020). La aplicación de *Rhizobium* spp., en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tiene un efecto positivo en indicadores morfológicos y productivos como el aumento del número de hojas, mayor

altura de planta, mayor número de legumbres por planta y mayor masa de granos por legumbre (Calero et al., 2019). Van Sambeek & Garrett (2004) reportaron el aumento del 28 % de N disponible en suelo de bosque gracias al efecto de la rizodeposición de las leguminosas noduladas por rizobios. De la misma manera, la alfalfa (*Medicago sativa* L.), una leguminosa forrajera, que se utiliza como cultivo asociado de diferentes especies vegetales, es capaz de proveer de N asimilable al suelo gracias al mecanismo simbiótico rizobios-leguminosa (Adhikari & Missaoui, 2017; Heichel et al., 1981). Es por esto que, los rizobios representan una potencial herramienta biotecnológica de fácil aplicación agrícola sin los efectos nocivos por el mal uso de los fertilizantes químicamente sintetizados ejerce sobre el ambiente (Crews & Peoples, 2004).

La infección y formación de nódulos en las raíces de una leguminosa es el único criterio confiable para la diferenciación de los rizobios de otros microorganismos edáficos de forma cualitativa (Matos & Zúñiga, 2003). Cuando se requiere hacer un recuento de los rizobios presentes en una muestra que contenga varios tipos de

microorganismos, como por ejemplo muestras de suelos o ensayos en sustratos no estériles, es necesario contar los rizobios indirectamente por los nódulos que se hayan formado en plantas estériles de una especie leguminosa mediante el método del Número Más Probable (NMP) (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988).

El objetivo de esta investigación fue determinar el Número Más Probable (NMP) por unidad de masa de sustrato de diez diluciones seriadas a partir de dos biofertilizantes comerciales enriquecidos con *Rhizobium* spp., uno de origen mexicano y otro ecuatoriano, empleados en el cultivo de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Blue Lake en condiciones de invernadero.

2. Materiales y Métodos

Se preparó para cada recuento una serie de diez diluciones a partir de una dilución madre de dos biofertilizantes comerciales enriquecidos con *Rhizobium* spp., uno de origen ecuatoriano y otro mexicano, se inocularon tres plantas, es decir, tres repeticiones por cada dilución (10^{-1} a 10^{-10}), según recomendación de Moreira (2012). La unidad experimental

fue una maceta de polietileno expandido con capacidad de 1 dm³ sin perforaciones, en la cual se colocó 400 g de pomina esterilizada al vapor en calidad de sustrato. El riego fue dosificado a razón de 3 ml por planta de forma diaria y fue aumentando semanalmente hasta alcanzar los 10 ml diarios por planta. Las macetas fueron cubiertas con papel film traslúcido hasta la primera semana de emergencia, cuando el hipocótilo empieza a ser visible y comienza su erección, esto con la finalidad de evitar la contaminación de los inóculos. El procedimiento se repitió en diez plantas testigo en las que no existió inóculo. Para el desarrollo de este ensayo se empleó semillas de frijol ejotero, estas fueron inoculadas en el sustrato con 1 ml de suspensión en cada caso (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988; Moreira, 2012). Para el cálculo del NMP se requiere la ecuación [1]:

$$\text{NMP} = \frac{m*d}{v*n} \quad [1]$$

Dónde:

NMP = número más probable de células por gramo de sustrato;

m = número más probable (por ml) en la primera dilución considerada;

d = dilución de la primera dilución considerada;

v = volumen inoculado (1 ml);

n = número de semillas, volumen o peso del suelo, sustrato o del inoculante.

Las variables medidas a los 45 días después de la siembra (DDS) fueron: área foliar (cm²), peso de la planta en húmedo (g), altura de planta (cm) y número de flores (unidades por planta). Para la evaluación de la inoculación de las cepas, por presencia o ausencia de nódulos en la raíz de cada planta se utilizó la tabla de NMP del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (1988) para determinar el NMP de rizobios por unidad de masa de sustrato empleado en función de cada concentración realizada. Para la determinación del área foliar se empleó la herramienta informática ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) versión 1.8.0_172 para Windows 10 en 64 bit. Finalmente, para el análisis estadístico se empleó la herramienta de software RStudio versión 2021.09.0 Build 351. El análisis de los datos de las variables se adaptó a un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con

arreglo de parcela dividida con tres repeticiones por disolución.

3. Resultados y discusión

3.1. Número Más Probable (NMP)

La evaluación de la nodulación de las plantas de frijol ejotero inoculadas con todas las disoluciones a los 45 DDS comprendió el conteo de positivos (existe presencia de nódulos) y negativos (ausencia de nódulos) por maseta, incluyendo plantas testigo, las que no fueron inoculadas y en consecuencia ninguna presentó nodulación como se registra en la tabla 1.

La tabla de NMP publicada por el CIAT (1988) muestra los números más probables para 10, 8, 6 y 4 diluciones (*S*), esta fue validada con un factor del 95 % de los límites de confianza, con este instrumento se evaluaron dos pruebas de nodulación considerando el origen del biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp., existieron diez disoluciones cuyas concentraciones fueron seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Tabla 1. Control de positivos y negativos del ensayo de nodulación en función del biofertilizante y la concentración de la disolución empleada.

Table 1. Control of positives and negatives of the nodulation test depending on the biofertilizer and the concentration of the solution used.

Dilución	<i>Rhizobium</i> spp. (México)			Dilución	<i>Rhizobium</i> spp. (Ecuador)			Plantas testigo	
	R1	R2	R3		R1	R2	R3		
10^{-1}	+	+	+	10^{-1}	+	+	+	1	-
10^{-2}	+	+	+	10^{-2}	+	+	+	2	-
10^{-3}	+	-	+	10^{-3}	+	+	+	3	-
10^{-4}	+	+	-	10^{-4}	+	+	+	4	-
10^{-5}	+	+	+	10^{-5}	+	+	+	5	-
10^{-6}	+	+	+	10^{-6}	+	+	+	6	-
10^{-7}	+	+	+	10^{-7}	+	+	+	7	-
10^{-8}	+	+	+	10^{-8}	-	+	+	8	-
10^{-9}	+	+	+	10^{-9}	-	+	+	9	-
10^{-10}	+	+	+	10^{-10}	+	-	+	10	-

* (+) Plantas con presencia de nódulos, (-) Plantas con ausencia de nódulos. R = Repeticiones.

En el caso del biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* mexicano, se evaluó el NMP considerando ocho diluciones ($S = 8$) tomando como disolución 1 a la concentración 10^{-5} por ser la primera en presentar respuesta positiva a la nodulación en todas las repeticiones. En el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* ecuatoriano, existieron siete disoluciones, de un total de diez que inicialmente fueron consideradas para la evaluación del NMP, no obstante, sólo se consideró para el cálculo un total de seis disoluciones ($S = 6$) siendo la primera aquella que presenta resultados positivos en sus tres repeticiones en la concentración 10^{-4} siguiendo las

recomendaciones descritas de la metodología. En el primer caso se cuentan 22 macetas positivas y en el segundo 18 macetas, es decir, presentaron nódulos, en el caso de las plantas testigo no existió nodulación. El descarte de las tres primeras disoluciones del cálculo se fundamenta en que normalmente, las disoluciones menores, es decir, aquellas que presentan mayor concentración de microorganismos, pueden contaminarse con muchos otros microorganismos que a veces inhiben el crecimiento de la planta o en su defecto la nodulación, o por el contrario siempre tenderán a nodular; mientras que, en las disoluciones mayores, es decir, las más

diluidas, las plantas nodulan como respuesta a un bajo índice de contaminantes, en estos casos, las macetas son contadas como positivos (CIAT, 1988). Los valores de números más probables (m) por mililitro en las primeras disoluciones, según lo consultado en el instrumento, fueron de $5,8 \times 10^4$ células para $S = 8$ en su primera disolución 10^{-5} y de $5,9 \times 10^3$ células para $S = 6$ en su primera disolución 10^{-4} . El cálculo del NMP requiere emplear la ecuación [1] según se detalla en la metodología, los resultados de NMP que se obtuvieron son $4,45 \times 10^7$ rizobios g^{-1} de sustrato de pomina estéril inoculada con el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* de origen mexicano y $1,48 \times 10^5$ rizobios g^{-1} de sustrato de pomina estéril inoculada con el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* de origen ecuatoriano, siendo este último, el NMP con mayor concentración bacteriana por unidad de masa de sustrato.

Las comunidades bacterianas que nodulan la planta hospedera indican si las condiciones del ensayo experimental, tales como temperatura, humedad o concentración de nutrientes son adecuadas para que se lleve a cabo el

proceso de nodulación y en consecuencia la fijación simbiótica de N en las plantas para su desarrollo (Moreira, 2012). En cuanto a la concentración de rhizobia necesaria para obtener resultados positivos en los cultivos, se debe mencionar que no hay estudios que puedan ser extrapolados para este fin así lo afirma Mulas García *et al.* (2018), sin embargo, la dosis de rhizobia necesaria para garantizar la nodulación en plantas leguminosas es 10^4 rizobios g^{-1} de suelo (Hirsch, 1996). El NMP para la inoculación directa en semilla puede variar en función de la calidad de los inoculantes de país a país y por lo general está entre 10^3 y 10^6 UFC semilla $^{-1}$ (Herrmann & Lesueur, 2013).

Los autores Bernal & Graham (2015) reportan un rango de NMP de 10^5 a 10^6 bacterias por gramo de suelo en todos los conteos de NMP de *Rhizobium* en tres suelos del Ecuador, valores independientes del cultivar empleado, donde además la diversidad genética estimada en dos de los tres suelos analizados fue mayor cuando se emplearon cultivares de frijol nativo, los autores reportan un NMP de $3,59 \times 10^3$ bacterias por gramo de suelo en

Cotacachi, Imbabura, Ecuador, para la variedad de frijol Puebla 152, y de forma análoga en la misma localidad, con un NMP de $3,36 \times 10^3$ bacterias por gramo de suelo para la variedad de frijol Bolón 6. En otros cultivares como la soya (*Glycine max* L.), Albareda *et al.* (2009) consiguieron una producción máxima con intervalos de entre 10^5 a 10^6 rhizobia semilla⁻¹, donde además se observaron incrementos en el peso seco del nódulo, el rendimiento de la semilla y el contenido de N de la semilla cuando el número de rizobios aplicados a la semilla aumentó de 10^4 a 10^7 .

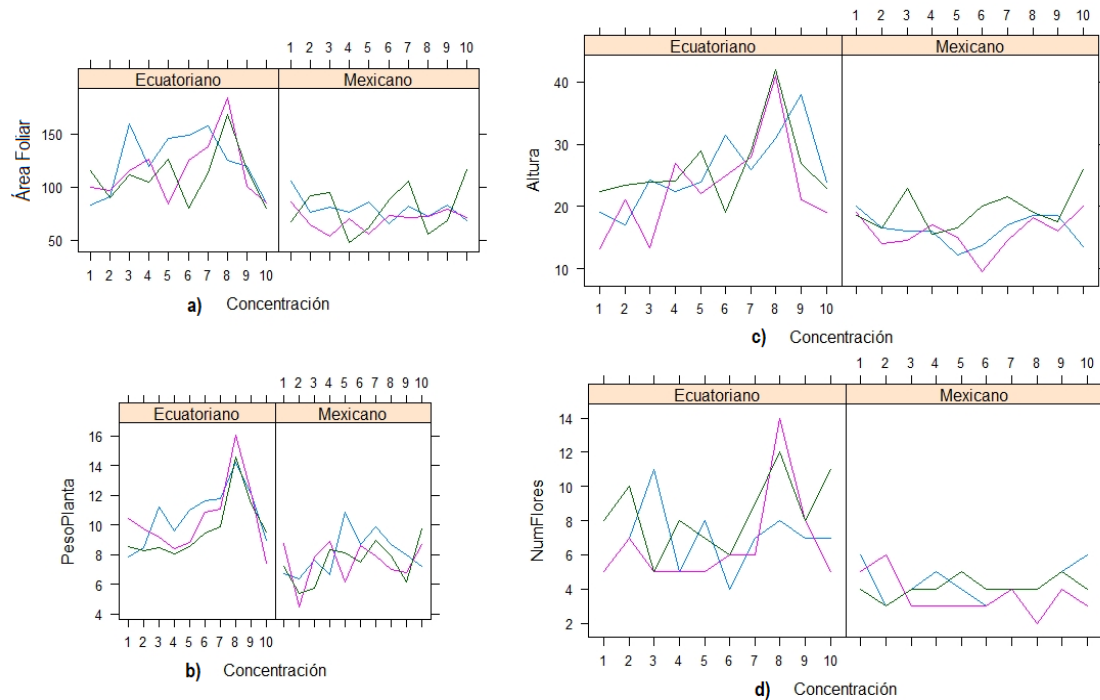
3.2. Respuesta de los indicadores morfológicos al tipo de biofertilizante y concentración

Las plantas inoculadas con *Rhizobium* spp., mismas que fueron empleadas en la determinación del NMP presentan importantes diferencias en las variables área foliar (cm²), peso de la planta en húmedo (g), altura de planta (cm) y número de flores (unidades por planta). En la figura 1 se puede observar cómo se distribuyen los valores medidos de cada variable en función del tipo y

concentración de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. (ecuatoriano y mexicano). En todos los casos se puede observar una respuesta mayor para el biofertilizante de origen ecuatoriano, en donde, las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} demuestran un incremento en área foliar, siendo 10^{-8} la concentración óptima (Figura 1a), peso de la planta (Figura 1b), altura (Figura 1c) y número de flores (Figura 1d), sin embargo, estas concentraciones difieren de las determinadas en condiciones de campo por Bernal & Graham (2015) cuyos NMP varían entre 10^4 y 10^6 bacterias por gramo de suelo, estas diferencias podrían deberse al tipo de sustrato empleado y la naturaleza del inóculo, las características fisicoquímicas del suelo, la humedad y las relaciones climáticas al momento de la toma de las muestras, estos factores condicionan la cantidad de exudados de las raíces y determinan la variación de la presencia de bacterias diazótrofes en las muestras, especialmente en condiciones de campo (Argüello-Navarro *et al.*, 2016).

Figura 1. Respuesta de las variables a) área foliar (cm²), b) peso de la planta en húmedo (g), c) altura de planta (cm) y número de flores a los 45 DDS en función del tipo de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. y su concentración.

Figure 1. Response of the variables a) leaf area (cm²), b) wet plant weight (g), c) plant height (cm) and number of flowers at 45 days after planting as a function of the type of biofertilizer enriched with *Rhizobium* spp. and its concentration.



*Cada color indica una repetición (R), R1 celeste, R2 fucsia y R3 verde, para cada biofertilizante según su origen y para cada concentración.

El análisis de varianza en DBCA con arreglo de parcela dividida demuestra que existen diferencias estadísticas altamente significativas (Tabla 2) en el incremento del área foliar, peso de planta en húmedo, altura de planta y número de flores por efecto del tipo de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* que se empleó en el ensayo de nodulación para un α igual a 0.05, dado que su nivel de

significancia es menor al de α se concluye que la relación es diferente de cero (Morales, 2011) demostrándose las diferencias estadísticas mencionadas. Lo propio sucede con la incidencia de la concentración sobre el incremento del peso en húmedo de la planta y la interacción entre tipo de biofertilizante y concentración propiamente. Se encuentran diferencias estadísticas en la

variable respuesta altura de planta como consecuencia de la concentración empleada en la inoculación del sustrato, así como la interacción entre el tipo de biofertilizante versus concentración, para esta misma fuente de variación se identifica una ligera diferencia para la

variable respuesta área foliar. Los gráficos de validación (QQ-plot) de los residuos y los datos predichos de cada una de las variables se ajustan al modelo propuesto como se demuestra en figura 2 en sus literales correspondientes.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson (valor P) del análisis de varianza con α de 0.05.

Table 2. Pearson correlation coefficients (P value) from analysis of variance with α of 0.05.

Fuente de Variación	Coeficientes de Correlación de Pearson (valor P)			
	Área Foliar (cm ²)	Peso de Planta (g)	Altura de Planta (cm)	Número de Flores (unidad)
Tipo de Biofertilizante	1.25x10 ^{-9***}	5.36x10 ^{-11***}	9.25x10 ^{-9***}	2.54x10 ^{-9***}
Concentración	0.1784	1.03x10 ^{-5***}	0.00751**	0.2116
Tipo de Biofertilizante vs. Concentración	0.0129*	7.21x10 ^{-5***}	0.00903**	0.0697 .
Tipo de Biofertilizante vs. Repetición	0.3486	0.0779 .	0.2318	0.1262
Signif.codes: 0 " *** " 0.001 " ** " 0.01 " * " 0.05 " . " 0.1 " " 1				

La respuesta de las variables medidas confirma el beneficio en el comportamiento de los indicadores morfológicos y productivos del frijol inoculado con BNFN, Calero *et al.* (2019) reportan un incremento en el rendimiento del grano como consecuencia del mejoramiento de los parámetros morfológicos como el número de hojas por planta y el área foliar tras emplearse bacterias diazotróficas, el beneficio de la

inoculación se extiende también a otros componentes del rendimiento como el número de legumbres por planta, consecuencia de un mayor número de flores, mayor cantidad de granos por legumbre y un importante incremento en la masa de cada 100 granos de frijol comestible. Estos efectos corroboran los criterios de Díaz *et al.* (2009) quienes manifiestan que los microorganismos eficientes pueden ser empleados como inoculantes del suelo para la restitución

del equilibrio biológico de la microbiota que compone el suelo, y en consecuencia, una mejora sustancial en la disponibilidad y asimilación de nutrientes que favorece un desarrollo óptimo de los hospederos de estos microsimbiontes. En particular, los beneficios en el cultivo de frijol fueron verificados por González *et al.* (2012) quienes reportan un incremento en el rendimiento con 1,34 t ha⁻¹ más que las plantas sin inoculación con *Rhizobium* spp. Lo propio, sucede con la inoculación con cepas nativas de *Rhizobium* spp. en frijol de la variedad Blanco Molinero que obtiene 2.836 kg ha⁻¹, valor que supera la media nacional de Perú de 2.000 kg ha⁻¹ cultivada de forma convencional, la inoculación de las leguminosas, especialmente de frijol común, tiene un gran potencial para incrementar los rendimientos con menores costos de producción que usando fertilizantes químicamente sintetizados (Cantaro-Segura *et al.*, 2019). Tras rechazarse la hipótesis nula de igualdad de medias mediante por el método de análisis de varianza, para las fuentes de variabilidad: tipo de biofertilizante y concentración, se requiere comparar las medias de los *t* niveles de los factores que obtienen

diferencias estadísticas significativas en las fuentes de variabilidad mencionadas (tabla 2) mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey (HSD Tukey) a fin de establecer los rangos óptimos de las fuentes de variabilidad con un α igual a 0.05 cuyas gráficas se muestran en la figura 2 donde las barras indican las diferencias medias significativas de cada una de las variables.

El incremento en el área foliar por efecto del tipo de biofertilizante denota que existen diferencias entre las medias calculadas, se determinó dos rangos de significancia, el mayor con una media calculada de 116,55 cm² de área foliar para las plantas inoculadas con *Rhizobium* de origen ecuatoriano frente a 76,25 cm² de media calculada de área foliar para las plantas inoculadas con *Rhizobium* de origen mexicano como se muestra en figura 2 literal a.1. En cuanto al incremento del peso de la planta en húmedo, por efecto del tipo de biofertilizante, se observa dos rangos de significancia (Figura 2. literal b.1), de forma que la media que se obtiene para el producto ecuatoriano es de 10,26 g por planta frente al producto mexicano que

alcanza una media de 7,70 g por planta. Además la variable presenta diferencias estadísticas significativas en función de la concentración de biofertilizante empleada, estableciéndose tres rangos de significancia donde la concentración 10^{-8} presenta mayor incremento en el peso de la planta en húmedo independientemente del tipo de biofertilizante empleado, considerando que las concentraciones 10^{-6} a 10^{-10} con relación a la variable, poseen un mismo rango de significancia podemos afirmar que estos resultados guardan consistencia con los valores de NMP reportados. La variable altura de planta obtiene una media para el producto ecuatoriano de 25,03 cm frente a 17,12 cm obtenidos por efecto del producto mexicano como se evidencia en la figura 2. literal c.1. De manera análoga, el HSD test evidencia dos rangos de significancia entre las concentraciones de biofertilizante, siendo la concentración 10^{-8} la que alcanza mejor respuesta con 28,28 cm de altura, hallándose consistencia con los datos obtenidos en la variable respuesta peso de la planta frente a la concentración 10^{-2} que obtiene la media más baja de altura de planta con 18,08 cm

como se puede observar en la figura 2. apartado c.2. Finalmente, en cuanto al número de flores por planta, se determinó dos rangos de significancia para el tipo de biofertilizante empleado, el producto ecuatoriano obtuvo una media de 7,30 flores frente a 4,03 flores promedio por planta para el biofertilizante de origen mexicano como se puede evidenciar en la figura 2. literal d.1. Los efectos positivos obtenidos en todos estos indicadores morfológicos coinciden con los criterios de Bernal & Graham (2015) y González *et al.* (2012) en el incremento de área foliar, aumento en la altura de la planta (Cantaro-Segura *et al.*, 2019), así como en el número de hojas y flores (Lara-Capistrán *et al.*, 2019).

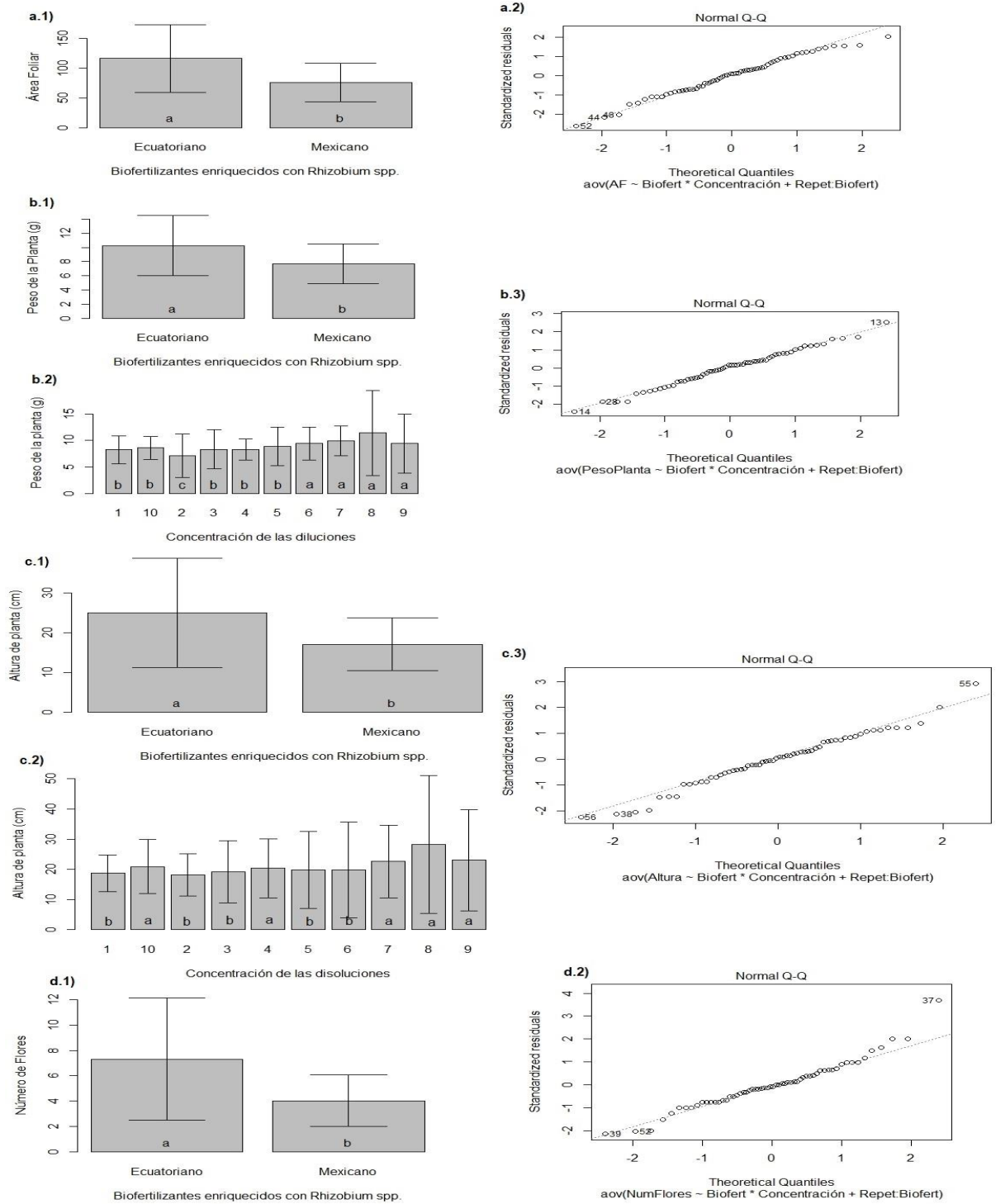


Figura 2. Rangos de significancia de las variables área foliar (a.1), peso de la planta en húmedo (b.1 y b.2), altura de planta (c.1 y c.2) y número de flores por planta (d.1 y d.2).

Figure 2. Significance ranges for leaf area (a.1), plant wet weight (b.1 and b.2), plant height (c.1 and c.2) and number of flowers per plant (d.1 and d.2).

4. Conclusiones

El NMP calculado para el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* de origen mexicano fue de $4,45 \times 10^7$ células de rizobios por cada gramo de pomina estéril frente a $1,48 \times 10^5$ células de rizobios por cada gramo de sustrato en macetas inoculadas con *Rhizobium* de origen ecuatoriano, siendo el producto mexicano el que presenta mayor concentración de rhizobia por gramo de sustrato.

El rango óptimo de concentración de disoluciones de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp., independientemente de su origen, en sustrato de pomina estéril es de 10^{-7} a 10^{-9} .

Se determina que existen diferencias altamente significativas para la fuente de variabilidad: tipo de biofertilizante, es decir, el origen del producto empleado muestra en todos los casos un incremento en las variables respuesta área foliar, peso en húmedo de la planta, altura de planta y número de flores, siendo el producto ecuatoriano el que obtiene mejores indicadores morfológicos frente al producto mexicano a los 45 DDS.

Las variables peso en húmedo de planta y altura de planta demuestran un incremento atribuible a la concentración de biofertilizante empleado, siendo la concentración 10^{-8} la que presenta una media superior en ambos casos. Estas mismas variables junto con el área foliar también presentan diferencias estadísticas en la interacción entre las fuentes de variabilidad tipo de biofertilizante versus concentración por

lo que se recomendaría la replicación del experimento considerando un mayor número de repeticiones y variables agronómicas evaluables.

5. Referencias

- Adhikari, L., & Missaoui, A. M. (2017). Nodulation response to molybdenum supplementation in alfalfa and its correlation with root and shoot growth in low pH soil. *Journal of Plant Nutrition*, 40(16), 1–39. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1264601>
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D., & Temprano, F. J. (2009). Soybean inoculation: Dose, N fertilizer supplementation and rhizobia persistence in soil. *Field Crops Research*, 113(3), 352–356. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2009.05.013>
- Argüello-Navarro, A. Z., Madiedo-Soler, N., & Yolima Moreno-Rozo, L. (2016). Cuantificación de bacterias diazótropas aisladas de suelos cacaoteros (*Theobroma cacao* L.), por la técnica de Número Más Probable (NMP) Quantification of diazotrophs bacteria isolated from cocoa soils (*Theobroma cacao* L.), by the technique of Most Probable Number (MPN). *Rev. Colomb. Biotecnol*, 18(2), 40–47. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.47678>
- Barrera, A. F., Álvarez-Herrera, J. G., Forero, A. F., Salamanca, C., & Pinzón, L. P. (2012). Determinación del Nitrógeno potencialmente

- mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. *Temas Agrarios*, 17(1), 32–43.
- Bernal, G., & Graham, P. H. (2015). La diversidad del *Rhizobium* asociado con *Phaseolus vulgaris* L. en Ecuador, y comparaciones con el *Rhizobium* de México. In 6:526-534 Trabajo publicado en el Canadian Journal of Microbiology. Vol.47 (Ed.), *VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo* (Vol. 47, pp. 526–534). <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/3-Diversidad-del-rhizobium-asociado-phaseolus-Bernal-G.pdf>
- Boyd, E. S., & Peters, J. W. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>
- Calero, A., Pérez, Y., Quintero, E., Olivera, D., & Peña, K. (2019). Effect of the associated application between *Rhizobium leguminosarum* and efficient microorganisms on common bean production. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(2), 295–308. https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num2_art:1460
- Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zuñiga-Dávil, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *IDESIA (Chile)*, 37(4), 73–81. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v37n4/0718-3429-idesia-37-04-73.pdf>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1988). *Simbiosis Leguminosa-Rizobium; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales y Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (camps.).
- Cerón, L., & Aristizábal, F. (2012). Nitrogen and phosphorus cycles dynamics in soils. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285–295. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77624081026.pdf>
- Cherkasov, N., Ibadon, A. O., & Fitzpatrick, P. (2015). A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>
- Crews, T. E., & Peoples, M. B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems and Environment*,

- 102(3), 279–297.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>
- Díaz, O., Montero, D., & Lagos, J. (2009). Effect of efficient microorganisms on cation exchange capacity in acacia seedlings (*Acacia melanoxylon*) for soil recovery in Mondoñedo, Cundinamarca. *Revista Colombiana Forestal*, 12, 141–160.
<http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a10.pdf>
- Ferrera-Cerrato, R. (2007). *Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo* (1ra ed., Issue Sirsi) i9789682478109). México Editorial Trillas.
- Giller, K. E., & Cadisch, G. (1995). Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant and Soil*, 174, 255–277.
- González, R., Núñez, D., & Díaz, R. (2012). Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola*, 39(4), 17–20.
<https://biblat.unam.mx/hevila/CentroAgricola/2012/vol39/no4/3.pdf>
- Gupta, V. V. S. R., Zhang, B., Penton, C. R., Yu, J., & Tiedje, J. M. (2019). Diazotroph Diversity and Nitrogen Fixation in Summer Active Perennial Grasses in a Mediterranean Region Agricultural Soil. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00115>
- Heichel, G. H., Barnes, D. K., & Vance, C. P. (1981). Nitrogen Fixation of Alfalfa in the Seeding Year. *Crop Science*, 21(2), 330–335.
- Herridge, D. F. (2008). Chapter 4: Inoculation Technology for Legumes. In M.J. Dilworth et al. (Ed.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (pp. 77–115). Springer Science+Business Media B.V.,
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8859–8873.
<https://doi.org/10.1007/S00253-013-5228-8>
- Hirsch, P. R. (1996). Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist*, 133(1), 159–171.
<https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1996.TB04351.X>
- Jaiswal, S. K., Mohammed, M., Ibny, F. Y. I., & Dakora, F. D. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(1), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.619676>

- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., & Maier, U.-G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-55>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Lara-Capistrán, L., Hernández-Montiel, L. G., Reyes-Pérez, J. J., Rangel, P. P., & Zulueta-Rodríguez, R. (2019). Respuesta agronómica de *Phaseolus vulgaris* a la biofertilización en campo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(5), 1035–1046. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1842/1/PUB-ARTICULO-4457.PDF>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Maróti, G., & Kondorosi, E. (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis? *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00326>
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
- Matos, G., & Zúñiga, D. (2003). Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Ecología Aplicada*, 2(1), 81–85.
- Morales-Morales, E., Rubí-Arriaga, M., López-Sandoval, J., Martínez-Campos, Á., & Morales-Rosales, E. (2019). Urea (NBPT) una alternativa en la fertilización nitrogenada de cultivos anuales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(8), 1875–1886. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v10n8/2007-0934-remexca-10-08-1875.pdf>
- Morales, P. (2011). *El coeficiente de correlación*. https://ice.unizar.es/sites/ice.unizar.es/files/users/leteo/materiales/01_documento_1_correlaciones.pdf
- Moreira, F. (2012). Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. In F. Moreira, J. Huising, & D. Bignel (Eds.), *Manual de Biología de Suelos Tropicales* (1ra ed., pp. 177–

- 216). Instituto Nacional de Ecología.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/667/cap6.pdf>
- Mulas García, R., González Andrés, F., Brañas Lasala, J., & Mulas García, D. (2018). *Un fertilizante mineral complejo que comprende el microorganismo Rhizobium leguminosarum, procedimiento de producción y usos del mismo* (Patent No. ES 2 687 810 T3). ELZABURU, S.L.P.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/28/75/23/65619860d59322/ES2687810T3.pdf>
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M.-H., Oldroyd, G. E. D., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J.-M., & Peters, J. W. (2016). Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13).
<https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>
- Nag, P., Shriti, S., & Das, S. (2020). Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2).
<https://doi.org/10.1111/jam.14557>
- Pankievicz, V. C. S., Irving, T. B., Maia, L. G. S., & Ané, J.-M. (2019). Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. *BMC Biology*, 17(1).
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0710-0>
- van Sambeek, J. W., & Garrett, H. E. (2004). Ground cover management in walnut and other hardwood plantings. In C. H. Michler, P. M. Pijut, J. W. van Sambeek, M. V. Coggeshall, J. Seifert, K. Woeste, R. Overton, & F. Ponder (Eds.), *Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium* (Vol. 188, pp. 188-). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station.
- Walker, L., Lagunas, B., & Gifford, M. L. (2020). Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585749>
- Zhang, X., Fang, Q., Zhang, T., Ma, W., Velthof, G. L., Hou, Y., Oenema, O., & Zhang, F. (2020). Benefits and trade-offs of replacing synthetic fertilizers by animal manures in crop production in China: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 26(2).
<https://doi.org/10.1111/gcb.14826>

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

La transferencia del conocimiento deberá acompañar a los productores en sus propias innovaciones, donde el papel de las instituciones de educación superior, de financiamiento para la investigación, así como de las diversas entidades de gobierno asociadas al sector agroproductivo, es crucial a la hora de dar solución a las problemáticas que justifican la realización del presente proyecto de investigación, mismo que considera a la interdisciplinariedad como fortaleza al momento de trabajar con una visión integral, sistémica y prospectiva enfocada en la realidad de los productores ecuatorianos, y la incidencia de sus sistemas de producción agrícola sobre los cambios en el futuro de los agroecosistemas en el mediano y largo plazo.

La población mundial aumenta a razón de 84 millones de personas por año según cifras de la ONU, el Fondo de Población de las Naciones Unidas estima que la actual población aumentará en el año 2.050 a 10.000 millones de personas y 11.200 millones para el año 2.100. Este incremento poblacional obliga a aumentar la producción de alimentos de forma sustancial, principalmente las fuentes de proteína. Como una opción de bajo costo y alcance de la población, se destacan las leguminosas, que constituyen parte de la canasta básica, como: frijol (*Phaseolus vulgaris*) consumido en grano fresco, seco o legumbre; maní (*Arachis hypogaea*); soya (*Glycine max*); haba (*Vicia faba*); chocho (*Lupinus mutabilis*); lenteja (*Lens culinaris*); alfalfa (*Medicago sativum*); arveja (*Pisum sativum*), y garbanzo (*Cicer arietinum*), los mismos que contribuyen con la seguridad y soberanía alimentaria y además fortalecen los sistemas de producción agroecológicos y el uso de bioinsumos. En esta investigación se obtuvo que los parámetros relacionados con la calidad nutricional de los ejotes no se vieron afectados por la fuente de suministro de nutrimentos utilizados en su producción, es decir, la fertilización química, orgánica o los biofertilizantes no presentan diferencias significativas entre ellos en los micro y macroelementos, la mejor recomendación es el manejo integral de las fuentes de nutrimentos con la aplicación del principio de las 4R de la nutrición vegetal, es decir, el uso de la fuente edáfica más apropiada, en la dosis correcta, en el momento adecuado así como en la forma y lugar de aplicación adecuados.

El rendimiento obtenido para la enmienda edáfica de Compost enriquecido con *Rhizobium* spp., de origen mexicano, fue de 84,64 g por planta. Para la labranza mínima con enmienda edáfica de Compost enriquecido con *Rhizobium* spp., de origen ecuatoriano, se obtiene un incremento de 93.49 g por planta, por lo que es evidente el impacto positivo de la aplicación de biofertilizantes en el rendimiento de las leguminosas de canasta básica. Al complementar la inoculación de rizobios con aplicaciones de compost, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la variable respuesta de crecimiento de la planta.

La aplicación de ácidos orgánicos a través de enmiendas orgánicas y semillas inoculadas puede influir en la solubilidad de elementos esenciales y no esenciales (especialmente nitrógeno, fósforo y azufre) directamente a través de procesos de acidificación, quelación, precipitación y oxidación-reducción en la rizosfera, acelerando consecuentemente el proceso de meteorización y estabilización de los suelos volcánicos del Ecuador. Se propone promover el uso de microorganismos capaces de generar sustancias, como ácidos orgánicos y sus componentes, para propiciar la agregación del suelo, y consecuentemente, mejorar su estructura. La presencia de microorganismos autóctonos en el suelo como *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Aereobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Yarrowia* spp., *Streptosporangium* spp., *Pectobacterium* spp., entre otras, juega un papel importante en la tasa no solo de estabilización de carbono y nitrógeno sino también de estabilización de minerales, ya que tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular, fijar N₂, solubilizar fosfatos o formar materiales humificados estables.

La familia Fabaceae ofrece importantes ventajas en los sistemas de producción, la fijación simbiótica de N, aumento de la cobertura vegetal, fuente de carbono y reducción de la erosión edáfica, contribuyendo así a mejorar los indicadores de la calidad y salud del suelo.

En Ecuador y México, este alimento es protagonista en la dieta, su consumo va en aumento, constituyéndose como una leguminosa que forma parte de la canasta básica de muchas familias. En la presente tesis doctoral, el número más probable (NMP) calculado

para el biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* de origen mexicano fue de 4.45×10^7 células de rizobios por cada gramo de pomina estéril frente a 1.48×10^5 células de rizobios por cada gramo de sustrato en macetas inoculadas con *Rhizobium* de origen ecuatoriano, siendo el producto mexicano el que presenta mayor concentración de rizobia por gramo de sustrato. El intervalo de concentración de soluciones de biofertilizante enriquecido con *Rhizobium* spp. independientemente de su origen, es de 10^{-7} a 10^{-9} .

Se determinó que existen diferencias altamente significativas para el tipo de biofertilizante, es decir, el origen del producto empleado demostró en todos los casos incremento en las variables área foliar, peso en húmedo de la planta, altura de planta y número de flores, siendo el producto ecuatoriano el que promueve mejores indicadores morfológicos en condiciones de invernadero frente al producto mexicano a los 45 DDS.

Las variables peso en húmedo de planta y altura de planta demuestran un incremento atribuible a la concentración de biofertilizante empleado, siendo la concentración 10^{-8} la que presenta una media superior en ambos casos. Estas mismas variables, junto con el área foliar, también presentan diferencias estadísticas en la interacción entre las fuentes de variabilidad tipo de biofertilizante versus concentración, por lo que se recomendaría la replicación del experimento considerando mayor número de repeticiones y variables agronómicas evaluables. La transferencia efectiva de tecnologías alternativas a la producción convencional requiere del apoyo continuo de las autoridades y el acceso a financiamiento que permita comprender, de manera efectiva, la composición y dinámica de la microbiota del suelo para su posterior aplicación por los pequeños agricultores de Ecuador y México.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS

- Alcántara, D., & Antonio, C. (2012). *Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.), en la República Dominicana = Isolation, characterization and selection of native rhizobia nodulating red bean (Phaseolus vulgaris L.) in Dominican Republic*. (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo), Universidad de León. <https://www.semanticscholar.org/paper/a58b18fdda41d4c1c2a33f4de8a81f0d5bd93753>
- Barrera, A. F., Álvarez-Herrera, J. G., Forero, A. F., Salamanca, C., & Pinzón, L. P. (2012). Determinación del Nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. *Temas Agrarios*, 17(1), 32–43.
- Bastida, A. (2017). Evolución y Situación Actual de la Agricultura Protegida en México. *Memorias, Sexto Congreso Internacional de Investigación de Ciencias Básicas y Agronómicas*. (pp. 281–294). Universidad Autónoma Chapingo, México. https://dicea.chapingo.mx/wp-content/uploads/2018/05/MEMORIA_MESA_3_2_CONGRESO2017.pdf
- Bautista, A., Etchevers, J., del Castillo, R. F., & Gutiérrez, C. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas*, 13(2), 90–97.
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6788/1/La%20Biodiversidad.pdf>
- Cáceres, E., Castro, R., Alvarado, S., Padilla, W., & Montes, O. (2020). Use of low molecular weight organic acids for agricultural improvement of ecuadorian volcanic soils. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 8(4), 1–13. <https://doi.org/10.18782/2582-2845.8159>
- Cerrato, R. F., & Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *CIENCIA Ergo-Sum*, 8(2), 175–183.
- Córdova, J., & Valverde, F. (2001). Potato response to potassium application in volcanic soils. *Better Crops International*, 15(1), 16–18.
- Dufumier, M. (2019). Investitaciones agropecuarias y agroecológicas para aimentar adecuadamente y de manera sostenible a toda la humanidad. En *Foro Agrario* (1st

- ed., Vol. 1, pp. 76–83). Universidad Central del Ecuador.
- Espinosa, J., Moreno, J., & Bernal, G. (2018). *The soils of Ecuador* (José Espinosa, J. Moreno, & G. Bernal, Eds.; 1st ed.). Springer International Publishing. <https://books.google.at/books?id=pnQ7DwAAQBAJ>
- Estévez Ayala, E. S. (2018). *Evaluación del rendimiento de fréjol (Phaseolus vulgaris L.) variedad INIAP 484 centenario, bajo fertilización química, micronutrientes, y orgánica más Rhizobium sp.* (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo), Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/14052>
- FAO. (2004a). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. La Biotecnología Agrícola: ¿Una respuesta a las necesidades de los pobres?* Grupo de la producción y diseño editorial Servicio de Gestión de las Publicaciones FAO. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/006/y5160s/y5160s.pdf>
- FAO. (2004b). *Informe - Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO* (Nro. 76. 2.003 (ed.)). FAO. Roma.
- Ferguson, S., Major, A. S., Sullivan, J. T., Bourke, S. D., Kelly, S. J., Perry, B. J., & Ronson, C. W. (2020). *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii NodD2 enhances competitive nodule colonization in the clover-rhizobium symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01268-20>
- Ferrera-Cerrato, R. (2007). *Microbiología Agrícola: Hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo* (1ra ed., Issue Sirsi) i9789682478109). México Editorial Trillas.
- Gardi, C., Barceló, S., & Comerma, J. (2014). *Atlas de suelos de América Latina y el Caribe*. European Commission.
- Gaybor, A. (2014). Crisis agraria y diálogo de saberes. *Siembra*, 1, 8–12. https://www.google.com.ec/?gfe_rd=ssl&ei=xf4vV9r-G8rJ-AWw3JugDg#q=Crisis+agraria+y+dialogo+de+saberes+revista+siembra
- Ghisolfi, E. (2011). *Contenidos de materia orgánica: relación con la fertilidad del suelo en siembra directa* (1er ed.). Eduvim - Editorial Universitaria Villa María.
- Gómez Sánchez, M. (2013). *Absorción, extracción y manejo nutricional específico en el cultivo de papa en la planicie cundiboyacense*. Fedepapa. Cundinamarca, Colombia.

- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., & Vera-Núñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261–1274.
- Hansen, A. P., Choudhary, D. K., Agrawal, P. K., & Varma, A. (2017). *Rhizobium Biology and Biotechnology* (Vol. 50). Springer.
- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 95–104.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). (2018). Cifras Agroproductivas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Consultado el 03 de abril del 2022. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Jones, A. L. (1999). *Phaseolus bean: Post-harvest operations. Post-Harvest Compendium*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/av015e/av015e.pdf>
- Malla, J., & Vásquez, J. (2018). *Evaluación del rendimiento de fréjol (Phaseolus vulgaris L.) INIAP 484 Centenario, en siembra directa bajo fertilización química, orgánica más Rhizobium sp.* (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo), Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15389/1/T-UCE-0004-A85-2018.pdf>
- Matus, F., Rumpel, C., Neculman, R., Panichini, M., & Mora, M. (2014). Soil carbon storage and stabilisation in andic soils: A review. *CATENA*, 120, 102–110.
- Nieto, C., & Endara, A. (2019). *Determinación de la eficiencia energética del cultivo de frejol, bajo dos densidades y tres fertilizaciones en el CADET-Tumbaco.* (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo), Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19112>
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, Á., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2016). Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor*, 192(779), 319.
- Sans, F. X. (2007). La diversidad de los agroecosistemas. *Ecosistemas*, 16(1), 44–49.

<http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=463>

Schmidt, M. W., Torn, M. S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I. A., & Manning, D. A. (2011). Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478(7367), 49–56.

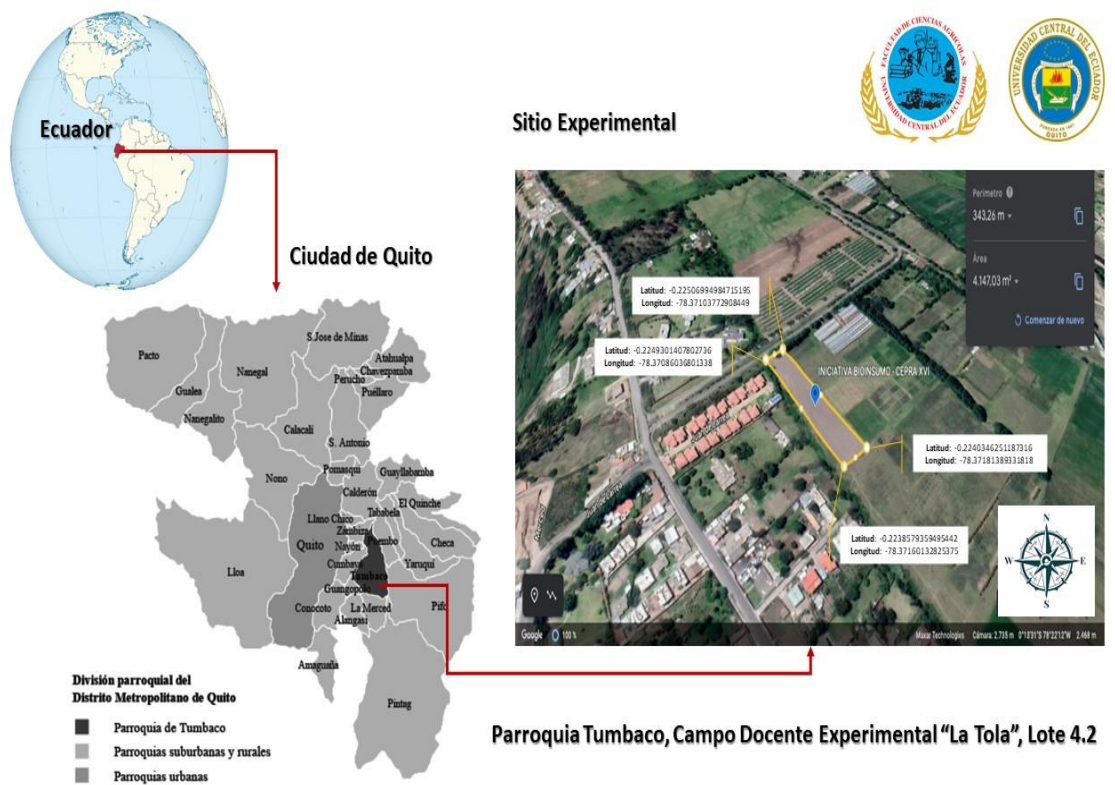
Silveira, M., Megías, S., & Molina, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿Cerca o Lejos? *Revista Española de Salud Pública*, 77(3), 317–331.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources College of Tropical Agriculture and Human Resources. <https://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/Downloads/Training/Rhizobium%20technology/Title%20Page.PDF>

Vincent, J. M. (1981). The genus rhizobium. In *The prokaryotes* (pp. 818–841). Springer.

CAPÍTULO VII. ANEXOS

Anexo 1. Localización del Sitio Experimental



Anexo 2. Diseño experimental para la fase de campo.

El diseño que se utilizó para la investigación en la fase de campo será Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), con arreglo de tratamientos en parcela dividida, la unidad experimental se conformó por una parcela de 6 x 6 m. La semilla a emplearse será Vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Blue Lake, importada por la empresa ALASKA S.A.

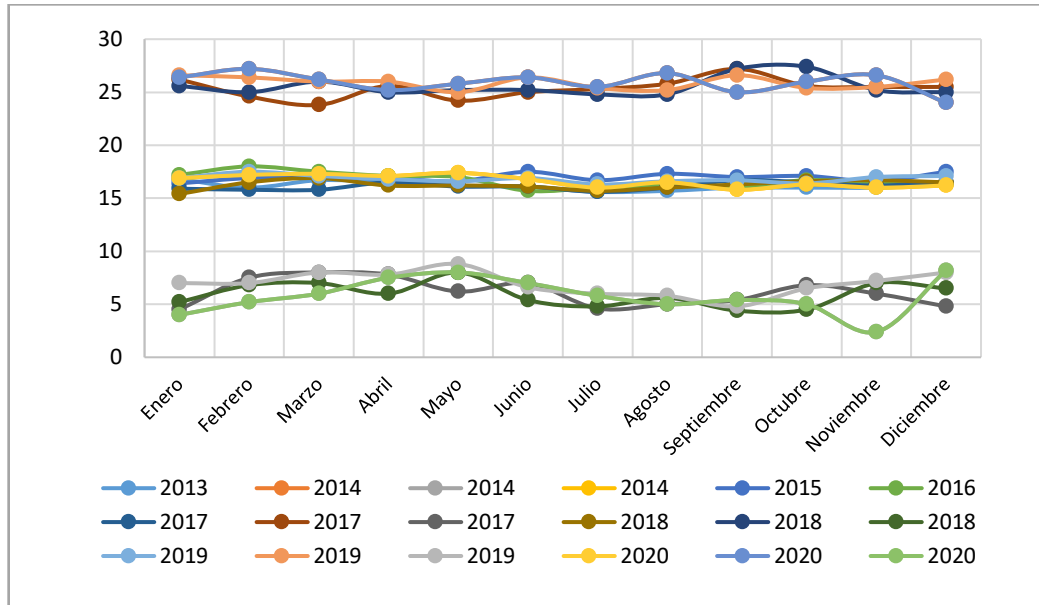
Tabla A. Factores en estudio en campo

Factores en estudio		
FACTOR A: SISTEMAS DE LABRANZA (2)	Labranza Mínima	Se efectúan labores mínimas como el paso de una rastra y la apertura de surcos de forma manual para efectuar la siembra, de esta manera, los residuos de la vegetación permanecen en forma semi-incorporada en la superficie del suelo (González 1990; Mori 2017; Ramos y Navas 2018).
	Labranza Convencional	Se basa en la preparación de suelo, mediante el uso de herramientas y maquinaria agrícola, es decir, el paso del arado de discos y la rastra de discos, hasta que el suelo quede pulverizado y homogéneo. (Baker <i>et al.</i> 2009; Mora Gutiérrez <i>et al.</i> 2001).
FACTOR B: ENMIENDAS EDÁFICAS (4)	Fertilización Química	190 kg N ha ⁻¹ – 60 kg P ha ⁻¹ - 120 kg K ha ⁻¹
	Materia Orgánica (Compost)	140 g por planta (100 a la siembra y 40 a la floración). Contenido de N 2.0 – 2.5 %; P de 1.8 % y K de 1.3 – 1.8 %.
	Compost + Rhizobium Méx. Compost + Rhizobium Ec.	Aplicación de disoluciones de 10 ⁻⁴ al suelo y por aspersión dirigido al tallo posterior en los primeros días de la emergencia.

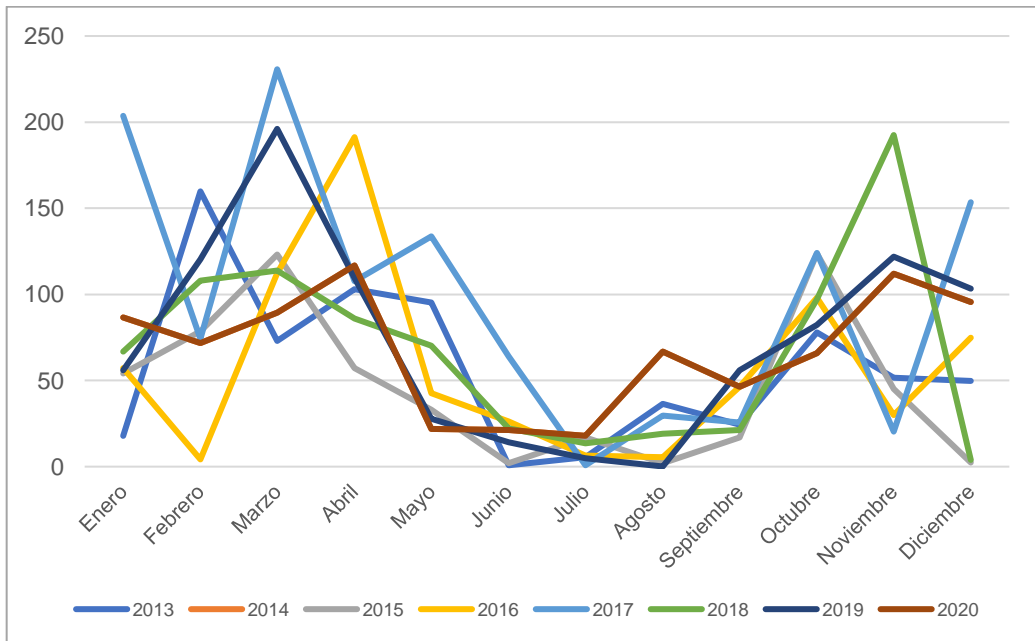
Tabla B. Tratamientos y distribución de unidades en campo.

Tratamientos a evaluar		
Tratamiento	Códigos	Interpretación: (Tratamiento, Repetición)
T1	T1R1, T1R2, T1R3, T1R4	Tratamiento Químico.
T2	T2R1, T2R2, T2R3, T2R4	Tratamiento Orgánico (Compost).
T3	T3R1, T3R2, T3R3, T3R4	Compost + Rhizobium Méx.
T4	T4R1, T4R2, T4R3, T4R4	Compost + Rhizobium Ec.

Anexo 3. Datos Agrometeorológicos del CADET-UCE (2013-2020).



Anexo 3.1. Temperatura promedio, máxima y mínima en °C en el período 2013-2020. Fuente: INAMHI (2021).



Anexo 3.2. Promedios de precipitación en milímetros en el período 2013-2020. Fuente: INAMHI (2021).

Anexo 4. Registro fotográfico.



1. Terreno en barbecho (Previo a la implementación de la investigación).



2. Labranza convencional.



3. Sistemas de labranza mínima y convencional.



4. Cultivo de frijol Ejotero.



5. Riego de las Parcelas.



6. Plantas en Producción.



7. Control químico de las malezas.



8. Fertilizante químico completo.



9. Estudiantes tesistas preparando y aplicando *Rhizobium*.



11. Escaneado para análisis de área foliar con ImageJ.

10. Evaluación de nódulación en campo.



12. Campo Experimental.