

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA



“APLICACIÓN DE MOLIBDENO Y COBALTO EN FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.) CON DOS SISTEMAS DE
FERTILIZACIÓN BAJO CERO LABRANZA”

Presentada por:
JIMMY ALCIDES OCAÑA REYES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Lima - Perú

2016

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1 Molibdeno	4
3.2 Cobalto	10
3.3 Estudios relacionados de la aplicación de Mo y Co a leguminosas	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Características del campo experimental	19
4.1.1 Ubicación	19
4.1.2 Características del suelo	19
4.2 Características climáticas durante el desarrollo del cultivo	22
4.3 Materiales	22
4.4 Tratamientos en estudio	24
4.5 Diseño experimental	25
4.6 Procedimiento	26
4.7 Conducción del experimento	26
4.8 Características evaluadas	30
4.9 Análisis Estadístico	32
V. RESULTADO Y DISCUSIÓN	34
VI. CONCLUSIONES	63
VII. RECOMENDACIONES	64
IX. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1. Función de las enzimas que contienen molibdeno	6
Cuadro N° 2. Función de las enzimas que contienen cobalto	11
Cuadro N° 3. Efecto de la adición del Mo en la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de variedades de fríjol	14
Cuadro N° 4. Análisis fisicoquímico del suelo del Campo Experimental Guayabo I	21
Cuadro N° 5. Variables climáticas registradas durante el periodo experimental del Cultivo	22
Cuadro N° 6. Fuentes de fertilizantes usados en el campo experimental	23
Cuadro N° 7. Tratamientos en Estudio	24
Cuadro N° 8. Plagas y enfermedades ocurridas durante todo el ciclo fenológico del fríjol Canario Centenario	29
Cuadro N° 9. Promedio de las variables biométricas y de los componentes de rendimiento	35
Cuadro N° 10. Promedio del efecto de la aplicación de Mo y Co de las variables de absorción de nitrógeno y nódulos de las plantas de fríjol	50

ÍNDICE DE FOTOS

Foto N° 1. Trazado de parcelas experimentales y emergencia de plántulas	28
Foto N° 2. Campo libre de malezas en pleno crecimiento vegetativo del fríjol	30

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. Efecto de la adición del Mo y Co a la semilla, sobre el área foliar de las plantas de fríjol	40
Gráfico N° 2. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de vainas por planta de fríjol	40
Gráfico N° 3. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de granos por vaina, por planta de fríjol	42
Gráfico N° 4. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el peso de 100 granos en la planta de fríjol	42
Gráfico N° 5. Efecto de la aplicación de Mo y Co en el peso total de las plantas de fríjol	46
Gráfico N° 6. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el índice de cosecha de las plantas De fríjol	47
Gráfico N° 7. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el rendimiento de las plantas de Fríjol	49
Gráfico N° 8. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de nódulos por planta de fríjol	52
Gráfico N° 9. Efecto de la aplicación de Mo y Co en el peso de nódulos por planta de Fríjol	54
Gráfico N° 10. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno de la semilla de la planta de fríjol	58
Gráfico N° 11. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno del rastrojo de la planta de fríjol	58
Gráfico N° 12. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno total de la planta de fríjol	61

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1. Cronograma del cultivo	69
ANEXO N° 2: Análisis de varianza (ANVA) para los parámetros biométricos, Componentes de rendimiento, nodulación y absorción de N del fríjol Canario Centenario	70

Resumen

El molibdeno y el cobalto participan en el metabolismo del nitrógeno en las leguminosas de grano; sin embargo, los efectos de su aplicación en suelos alcalinos han sido poco estudiados. Un experimento de campo fue instalado para evaluar la aplicación de Mo y Co en el rendimiento y extracción de nitrógeno de frijol Canario Centenario bajo dos sistemas de fertilización nitrogenada: fertilización inorgánica (N) e inoculación con *Rhizobium etli* (Rh). En cada sistema, molibdeno (Mo) y molibdeno más cobalto (MoCo), fueron aplicados por impregnación de semilla a dosis de 1.36 g/kg de semilla para el Mo y 0.26 g/kg de semilla para el Co; un control para cada sistema de fertilización y un testigo absoluto, fueron incluidos. La altura de planta, el área foliar, el rendimiento de grano y sus componentes, la producción de materia seca total, el peso y número de nódulos por planta y la extracción de nitrógeno en follaje y granos, fueron analizados. Se empleó un diseño de bloques completamente al azar con 7 tratamientos y 5 repeticiones. La aplicación de molibdeno incrementó el área foliar, el rendimiento de grano, la nodulación, el contenido de nitrógeno en grano y en el follaje bajo ambos sistemas de fertilización, resaltando el incremento del contenido de nitrógeno total de la planta en un 35.4 y 26 % respectivamente. La adición de Mo en la fertilización nitrogenada y frijol inoculado mostraron los mejores resultados en cuanto al rendimiento, aumentando un 44 %. La fertilización inorgánica arrojó rendimientos superiores a la inoculación con *Rhizobium*. La aplicación de cobalto solo incrementó el número y el peso de los nódulos y el contenido de nitrógeno bajo la inoculación con *Rhizobium etli*. La aplicación de molibdeno en frijol cultivado en suelos alcalinos es recomendable pero la aplicación de cobalto es recomendada sólo cuando el frijol es inoculado con rizobios.

Abstract

Both molybdenum and cobalt play an important role in the metabolism of N in grain legumes, however, the effects of its application to legumes grown in alkaline soils has been little studied. A field experiment was set up to evaluate the application of both micronutrients on yield and nitrogen removal Canario Centenario bean under two nitrogen fertilization systems: inorganic fertilization and inoculation with *Rhizobium etli*. In each system, molybdenum (Mo) and molybdenum more cobalt (MoCo) were applied to seed by impregnating dose of 1.36 g / kg of seed for Mo and 0.26 g / kg of seed for the Co, a control without application of microelements for each fertilization system and an absolute control were included. The biometric parameters and yield components were analyzed: plant height, leaf area, and number of pods per plant, number of grains per pod, weight of 100 grains, grain yield, total weight and harvest index. While the components of nodulation and nitrogen content, the variables were the weight of nodules per plant, number of nodes per plant, the nitrogen content in the seeds and leaf area. A randomized complete block design with 7 treatments and 5 replications was applied. The application of molybdenum increased the leaf area, the number of pods per plant, number of grains per pod, weight of 100 grains, grain yield, harvest index, the weight of nodules per plant, number of nodes per plant, the nitrogen content in the seeds and the aerial part, under both fertilization systems, highlighting the increase in total nitrogen content of the plant by 35.4 and 26%, respectively. And, the addition of Mo in the inorganic nitrogen fertilization and the bean inoculated showed the best results in yield, increasing by 44% and inorganic nitrogen treatment with Mo was the best yield showed. Cobalt application only increased the number of nodules, the weight of nodules and the nitrogen absorption under inoculation with *Rhizobium etli*.

The application of molybdenum to bean is advisable but the application of cobalt is suitable only when the bean is inoculated with rhizobia.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo y consumo del fríjol es de gran importancia en todas las regiones del Perú después de la papa, el arroz y el maíz choclo (INEI 2007), debido a la costumbre tradicional e importancia nutricional.

La demanda de nitrógeno de dicho cultivo varía entre 80 – 100 kg de N/ha, incluso para rendimientos altos y buen manejo de este elemento, se requiere 150 kg de N/ha (Rodríguez 1982), él que es absorbido en forma de amonio (NH_4^+) y principalmente como nitrato (NO_3^-). Sin embargo, el nitrógeno para ser asimilado y convertido a formas orgánicas tiene que ser previamente metabolizado con la participación de diferentes enzimas. La actividad de estas enzimas depende de muchos factores, entre ellos el status nutricional de la planta. Si la fertilización es nitrogenada sintética con fuente nítrica, la participación del molibdeno como cofactor es imprescindible; y si la fertilización nitrogenada es a través de *Rhizobium* sp, no sólo el molibdeno es importante, sino también el cobalto.

El molibdeno es un cofactor de las enzimas que metabolizan el nitrógeno, como la nitrogenasa, nitrato reductasa, xantina oxidasa y sulfito oxidasa. Y el cobalto, en el caso de semillas inoculadas con *Rhizobium* sp, forma parte del cofactor cobalamina de las enzimas metionina sintasa, ribonucleótido reductasa y metilmalonil CoA, las que influyen en las características cualitativas y cuantitativas de los nódulos de la raíz (Tisdale y Nelson 1970).

Ante la importancia de estos elementos para metabolizar el nitrógeno, la presencia y/o disponibilidad de estos micronutrientes, se supone que en el campo experimental trabajado, no debe haber mayor problema en cuanto al molibdeno por presentar un pH de 8.1, ya que su disponibilidad incrementa 10 veces por cada unidad mayor del pH del suelo. Sin embargo existe la posibilidad de que el Mo puede ser útil aún en suelos de

tendencia alcalina, porque la actividad del Mo en más de la mitad de los suelos tratados, incrementó su actividad al incrementarse el pH a más de 8 (Havlin *et al.*, 1999).

Contrariamente al molibdeno, la disponibilidad del cobalto es desfavorecida por el incremento de pH del suelo y niveles altos de carbonatos en los suelos, entonces bajo las condiciones del campo experimental con pH ligeramente alcalino y nivel medio de carbonatos, sería beneficioso la aplicación de cobalto a las semillas inoculadas con *Rhizobium etli*.

En tal sentido, la presente tesis plantea el tópico del molibdeno y cobalto como sinergizadores de la fijación biológica del nitrógeno y el molibdeno como metabolizador del nitrato en la fertilización tradicional. Por lo que se planteó dos sistemas, uno nitrogenado sintético y otro rizobial. Y con la aplicación a la semilla de molibdeno y/o cobalto se podría lograr una mayor eficiencia en el metabolismo del nitrógeno y por lo tanto obtener indicadores mayores en los parámetros biométricos del cultivo y nódulos, repercutiendo en una mayor producción del cultivo. Es así que se instaló un experimento a nivel de campo en la UNALM para evaluar en ambos sistemas el suministro de nitrógeno con la adición de molibdeno y cobalto, bajo un sistema de cero labranza.

II. OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar los beneficios de la aplicación del molibdeno y cobalto en la fertilización nitrogenada e inoculación del fríjol Canario Centenario.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Evaluar el efecto de la aplicación del molibdeno y cobalto sobre la absorción total del nitrógeno, parámetros biométricos del cultivo y rendimiento en la fertilización nitrogenada inorgánica y el fríjol inoculado con *Rhizobium etli*.
- Determinar si el molibdeno y/o cobalto aumentan la absorción de nitrógeno en la fuente y reservorio de la planta en la fertilización tradicional y la inoculada con *Rhizobium etli*.
- Comparar el efecto del molibdeno y cobalto sobre la nodulación de la raíz entre la inoculación con *Rhizobium* y la fertilización nitrogenada.

III. REVISIÓN LITERARIA

3.1. MOLIBDENO

3.1.1. Aspectos generales

El molibdeno es un elemento de transición presente en soluciones acuosas, principalmente como molibdato, MoO_4^{2-} , estado más oxidado + 6, sin embargo como componente enzimático se presenta como + 4 y +5.

Debido a su configuración electrónica el molibdeno + 4 comparte varias semejanzas químicas con el vanadio y principalmente con el tungsteno.

La concentración de molibdeno de suelos agrícolas varía en un rango de 0.6 – 3.5 ppm, con un promedio de 2 ppm y con una disponibilidad de 0.2 ppm. (Mengel y Kirkby 2000), la que parece favorecerse con un incremento de pH, contrariamente a la mayoría de microelementos (Tisdale y Nelson 1970), lo que podría explicarse porque la fuerza de adsorción del anión molibdeno disminuye con el aumento del pH, siendo su máxima adsorción a un pH igual a cuatro (Mengel et al 2000). También, incrementan la adsorción del molibdeno la presencia de óxidos de hierro, aluminio y titanio (Tisdale y Nelson 1970), siendo indisponible para la planta (Havlin *et al.*, 1999). Pero, no necesariamente a bajo pH es indisponible el molibdeno, ya que en suelos ácidos las plantas pueden absorber niveles adecuados de este microelemento cuando la mineralización de la materia orgánica libera suficiente molibdeno (Mengel y Kirkby 2000). Más aún, en suelos calcáreos con drenaje libre y derivados de serpentinas, puede darse deficiencias absolutas de dicho elemento.

La disponibilidad del molibdeno en el suelo y su absorción en la planta están relacionadas a aniones inorgánicos divalentes como SO_4^{2-} y HPO_4^{2-} (Marschner 1995). Altas aplicaciones de HPO_4^{2-} incrementan la absorción de dicho microelemento en la planta. Contrariamente, el SO_4^{2-} por competición iónica en la superficie de la raíces,

disminuye la absorción debido a que los iones comprometidos son de tamaño y carga similar (Tisdale y Nelson 1970). Al igual que el Cu y Mn pueden reducir la absorción del Mo, sin embargo el magnesio fomenta la absorción del Mo en las plantas. Y el nitrato también activa la absorción del Mo, mientras que fuentes amoniacales actúan contrariamente. Este efecto benéfico de la nutrición con nitrato está quizás relacionada a la liberación de iones OH^- y un incremento en la solubilidad del Mo del suelo (Havlin *et al.*, 1999).

Las plantas que presentan altas necesidades del molibdeno son las crucíferas, principalmente la coliflor, cuya deficiencia se manifiesta con el síntoma denominado “punta de látigo”. También, el Mo es importante en leguminosas, específicamente para las bacterias de los nódulos radiculares y en cítricos y maíz cuya deficiencia se manifiesta con plantas enanas y láminas foliares pequeñas (Mengel y Kirkby 2000).

3.1.2. Comportamiento del molibdeno en la planta

El molibdeno es móvil en el xilema y floema, por sus propiedades químicas se sugiere que comúnmente se transporta como MoO_4^{2-} que en forma acompañada con aminoácidos y/o azúcares (Marschner 1995). Sin embargo, dicho microelemento puede moverse por el xilema como MoO_4^{2-} , como complejo aminoácido Mo-S o como complejo de MoO_4^{2-} con azúcares u otros compuestos polihidroxidados (Mengel y Kirkby 2000).

La función del molibdeno como nutriente de la planta radica en los cambios de estado de oxidación que sufre como componente metálico de las enzimas, siendo la forma oxidada +6 y las reducidas +5 y +4. Dichas enzimas son: el complejo enzimático nitrogenasa, nitrato reductasa, xantina oxidasa/deshidrogenasa y sulfito reductasa. En estas enzimas el molibdeno tiene función estructural, catalítica y está directamente involucrada en las reacciones redox. Es así que las funciones del molibdeno están

estrechamente relacionadas con el metabolismo del nitrógeno y el requerimiento del molibdeno depende estrechamente del tipo de suministro de nitrógeno, con fuentes nítricas presenta buen efecto en el desarrollo y comportamiento del cultivo mientras que con las amoniacaes no muestra tales resultados (Marschner 1995).

El molibdeno es de suma importancia en el metabolismo del nitrógeno (Cuadro N° 1), a través de diferentes enzimas.

Cuadro N° 1. Función de las enzimas que contienen molibdeno

Enzimas	Función(es)
Nitrogenasa	Aceptor de electrones, enlaza al dinitrógeno y libera amonio.
Nitrato reductasa	Reduce el nitrato a nitrito (luego el nitrito reductasa lo reduce a amonio).
Xantina oxidasa / Deshidrogenasa	Metabolismo de las purinas a ureidos, alantoina y ácido úrico.
Sulfito oxidasa	Catalizador de sulfito a sulfato.

3.1.3. Complejo enzimático nitrogenasa

Es un complejo enzimático exclusivo de todos los microorganismos fijadores de nitrógeno, la cual consiste de dos proteínas de hierro, una de las cuales es la proteína de hierro la que tiene una masa molecular de 52 – 73 KDa y consiste en dos subunidades de Fe₄S₄; la otra proteína es la MoFe de 240 KDa, compuesto por cuatro subunidades, cada una de 30 átomos de Fe y 2 de Mo (Marschner 1995).

La proteína de Fe es denominada dinitrogenasa reductasa, con un tiempo de vida de 0.5 – 0.75 segundos; la otra de mayor peso molecular, MoFe, comúnmente llamada dinitrogenasa.

El complejo enzimático es destruido por el oxígeno, necesita iones de Mg²⁺ para ser activado, convierte ATP en ADP y es inhibido por éste (ADP), reduce dinitrógeno y varias moléculas con triple enlace y reduce H⁺ a H₂ aun cuando el dinitrógeno está presente. En el mecanismo funcional de estas dos proteínas, la dinitrogenasa reductasa acepta electrones de un donador de bajo potencial redox, como la ferredoxina reducida o

flavodoxina y enlaza 2 MgATP. Esto transfiere electrones a la dinitrogenasa (8 en total), y 2 MgATP son hidrolizados a 2 MgADP + Pi. Al repetirse el proceso y cuando la dinitrogenasa colectó los suficientes electrones, enlaza la molécula de N₂, lo reduce y libera amonio (Sylvia *et al.*, 1998), donde la protonización del Mo es el primer paso requerido para enlazar el N₂, durante el cual el H₂ es liberado (Marschner 1995).

3.1.4. Nitrato reductasa

El nitrato y el amonio son las principales fuentes de nitrógeno inorgánico absorbido por las raíces de las plantas. La mayoría del amonio se incorpora como compuesto orgánico de la planta, mientras el nitrato es fácilmente móvil en el xilema y puede ser almacenado en las vacuolas. Sin embargo, para que el nitrato sea incorporado como estructura orgánica de la planta, tiene que ser reducido a amonio. Esta reducción es mediada por dos enzimas, la nitrato reductasa que involucra la reducción de dos electrones de nitrato a nitrito en el citoplasma, y la nitrito reductasa, la que transforma el nitrito a amonio con una reducción de seis electrones en el cloroplasto.

En las plantas, la nitrato reductasa es una enzima dimérica con tres grupos prostéticos de transferencia de electrones por subunidad: flavin, hemo y molibdeno. Durante la reducción del nitrato, los electrones son transferidos directamente del molibdeno al nitrato (Havlin *et al.*, 1999).

Como sería de esperar, el requerimiento del molibdeno para el crecimiento de la planta es altamente dependiente del suministro de la fuente de nitrógeno (nitrato o amoniacal). En plantas de tomate con fertilización nitrática sin incorporación de molibdeno, el crecimiento es pobre, los contenidos de clorofila y ácido ascórbico son bajos, contrariamente al alto contenido de nitrato y las hojas mostraron el síntoma típico de la deficiencia del molibdeno para el caso de la coliflor. Cuando el amonio es suministrado,

la respuesta del molibdeno es mucho menos marcada en cuanto a los indicadores mencionados anteriormente y en ausencia de molibdeno, las plantas fertilizadas con amonio, presentan el síntoma de la “punta de látigo”.

Bajo condiciones de sustrato no esterilizado la nitrificación del amonio ocurre y la absorción y acumulación del nitrato no puede ser prevenidas. Entonces, en el cultivo de coliflor bajo condiciones estériles, fertilizadas con amonio sin molibdeno, no desarrollan ningún síntoma de deficiencia y parece no presentar requerimiento de molibdeno. Esto supone que incluso a bajos contenidos de nitrato se induce la síntesis de la nitrato reductasa y que esta apoenzima en ausencia del apropiado cofactor molibdeno, puede tener otras propiedades catalíticas conduciendo a desordenes metabólicos similares a los inducidos por altos niveles de radicales superóxidos como la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares (Marschner 1995).

3.1.5. Xantina oxidasa/deshidrogenasa

Esta enzima es una metaloflavoproteína dimérica. Cada subunidad contiene un átomo de molibdeno junto con una molécula de FAD y cuatro grupos FeS como un racimo. La xantina oxidasa/deshidrogenasa comparte muchas propiedades en común con la nitrato reductasa, incluyendo similar peso molecular.

La xantina oxidasa/deshidrogenasa cataboliza la ruta metabólica de las purinas a ácido úrico. La enzima se presenta como xantina oxidasa cuando el aceptor terminal es el oxígeno, o como xantina deshidrogenasa donde los electrones son transferidos al NAD. Ambas formas se encuentran en las plantas y la forma deshidrogenasa prevalece en las hojas. La enzima está involucrada en el metabolismo de las purinas y así en la ruta biosintética de los ureídos los cuales son producto de oxidación de las purinas.

En las leguminosas de nódulos determinados (soya, caupí, fríjol común), en las cuales los ureídos son los compuestos nitrogenados más prevalentes formados en las raíces

de los nódulos, la xantina oxidasa/deshidrogenasa juega un rol clave en el metabolismo del nitrógeno. Los bacteriodes asimilan nitrógeno como amonio, el cual es exportado a las células del hospedero y es convertido vía glutamina a glutamato y aspartato las cuales se usan para la síntesis de purinas como la xantina. Ésta es convertida en células vecinas no infectadas a ureídos, alantoina y ácido alantoico (Sylvia et al 1998), por lo que una deficiencia de molibdeno en leguminosas noduladas puede resultar en la inhibición del crecimiento y baja tasa de fijación de nitrógeno, resultado de la baja actividad de la nitrogenasa o debilitado catabolismo de las purinas en los nódulos o por ambas causas (Marschner 1995).

Las leguminosas exportan amidas, glutamina y asparagina fundamentalmente, cuando crecen a expensas de una fuente de nitrógeno mineral, pero al establecer una asociación simbiótica, estas especies pasan a sintetizar ureidos como compuesto para distribuir el nitrógeno al resto de la planta.

Esta adaptación metabólica se interpreta como una optimización de la economía en el uso del carbono. Los ureidos presentan una elevada proporción N/C, (4:4), es decir, la síntesis de ureidos requiere menos carbono orgánico para sintetizar la misma cantidad de nitrógeno orgánico que las amidas glutamina (2N/5C) y asparagina (2N/4N), por lo tanto, los ureídos se consideran formas de transporte muy eficaces. Los ureídos proceden de las purinas sintetizadas en las células infectadas y la posterior oxidación de estas purinas en las células no infectadas de la zona central del nódulo (González *et al.*, 2006).

3.1.6. Sulfito oxidasa.

Es otra enzima que contiene molibdeno, bien caracterizada en microorganismos, os cuales catalizan la oxidación de sulfito a sulfato. Sin embargo, dicha oxidación puede ser llevada a cabo por otras enzimas como peroxidasas, citocromo oxidasa, iones

metálicos y radicales superóxido. Así que no está claro si una sulfito oxidasa está involucrada en la oxidación de sulfito en las plantas y consecuentemente, además si el molibdeno es esencial en las plantas para la oxidación del sulfito, como ocurre por ejemplo durante la degradación de la proteína y reoxidación de sulfuro reducido en aminoácidos (Marschner 1995).

3.2. COBALTO.

El contenido de cobalto en los suelos es en general mucho más alto, siendo comunes niveles desde 1 - 40 ppm, que la concentración de este microelemento en la materia seca de las plantas, varía entre 0.02 – 0.5 ppm. En los suelos, el cobalto aparece principalmente en las redes cristalinas de los minerales ferromagnésicos y como tal no está disponible para las plantas. Después de liberarse de estos minerales por meteorización, el Co^{2+} se mantiene en gran parte en forma intercambiable o como complejo orgánico mineral. El Co^{2+} intercambiable está muy fuertemente unido y su concentración en la solución del suelo es extremadamente baja.

La velocidad de meteorización es más rápida en condiciones de pobre drenaje.

El cobalto puede volverse no disponible por adsorción a la superficie de los óxidos de manganeso.

El cobalto no se mueve fácilmente en la planta, observándose que las concentraciones foliares de cobalto en el tarwi, aumentan con la edad y que las concentraciones en las hojas viejas son mucho mayores que las jóvenes. Aún cuando los nódulos son deficientes en cobalto, éste continuaba acumulándose en las hojas viejas (Mengel y Kirkby 2000).

El cobalto se comporta como otros metales pesados. De modo similar al Fe, Mn, Zn y Cu, tiende a formar compuestos quelatados. Puede desplazar a otros iones de puntos de unión fisiológicamente importantes, disminuyendo así la absorción y el modo de acción de otros metales pesados. El exceso de cobalto puede inducir a una deficiencia de Fe. Los efectos tóxicos se asemejan a la deficiencia de Mn. Los efectos de toxicidad del cobalto en plantas muestran hojas cloróticas y necróticas que con frecuencia se marchitan completamente, atenuándose dicha toxicidad con el suministro de Fe (Mengel y Kirkby 2000).

El cobalto es esencial para la fijación de nitrógeno y para el crecimiento radicular. Los efectos del cobalto parecen estar mediados por el crecimiento radicular, el cobalto contenido en la vitamina B₁₂ (cobalamina) y sus formas coenzimáticas.

En la coenzima cobalamina, el cobalto está quelatado a cuatro átomos de nitrógeno en el centro de una estructura de porfirina. Este complejo de cobalto proporciona un grupo prostético que está asociado con un nucleótido en la coenzima B₁₂. Se destacó tres sistemas enzimáticos (Cuadro N° 2), específicos dependientes de la cobalamina en *Rhizobium* que pueden explicar la influencia del cobalto en la nodulación y fijación del nitrógeno en las leguminosas.

Cuadro N° 2. Función de las enzimas que contienen cobalto

Enzimas	Función(es)
Metionina sintasa	Síntesis de proteínas e influencia en el tamaño del nódulo.
Metil malonil CoA mutasa	Síntesis del hemo.
Ribonucleótido reductasa	Reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, implicado en la síntesis de ADN

3.3. ESTUDIOS RELACIONADOS A LA APLICACIÓN DE MOLIBDENO Y/O COBALTO A LAS LEGUMINOSAS.

En un estudio de aplicación foliar de Mo (0, 40, 80 y 160 g/ha) al fríjol común cv Pérola, aplicado 15 ó 26 días después de la emergencia, se concluyó que la dosis de 101.2 g/ha de Mo fue el óptimo técnico, con un incremento del rendimiento de 324,7 Kg/ha, 9.8 % más en comparación con el testigo (Araújo *et al.*, 2008).

En otro experimento para evaluar el efecto de la aplicación del N asociado o no con la aplicación de Mo sobre el fríjol seco cv Goytacazes, se empleó los tratamientos de N con urea de 0 – 10 kg/ha a la siembra y de 0 – 40 kg/ha como segunda fertilización. El Mo, fue suministrado de dos modos, mezclado con las semillas y aplicado vía foliar a una equivalencia de 0 – 20 g/ha de molibdato de amonio. El número, peso de nódulos y concentración de N en la planta no presentaron diferencias estadísticas significativas, además mostraron una alta población de *Rhizobium* nativo (35 – 62 nódulos por planta) y que no fueron afectadas por la adición de N y Mo. Los tenores medios de N en hojas, en floración, varían de 33.9 – 41.9 g/ha, encajando dentro de los niveles adecuados para el fríjol. Las variaciones del contenido de N y Mo foliar fueron estadísticamente significativas, presentando mayores valores, aquéllos que recibieron suministro de Mo vía foliar, independientemente de la aplicación del N. El tenor de N en la planta presento diferencias significativas en los granos y en el total, además, los tratamientos no influyeron en el contenido de N de la parte aérea, observándose que gran parte del elemento fue traslocado para los granos, donde los valores fueron prácticamente dos veces mayores. El más alto rendimiento de grano resultó con la aplicación de 10 kg/ha y 40 kg/ha de N a la siembra y segunda fertilización respectivamente, asociado a 20 g/ha de Mo vía foliar, mientras que la aplicación de Mo a las semillas en ausencia de N,

presentó el menor rendimiento (1924 kg/ha), representando una reducción del 20% de la producción, en comparación con el más productivo (Fullin *et al.*, 1999).

En un sistema de cero labranza, se evaluó la aplicación foliar de Mo (0, 40, 80 y 120 g/ha), con fertilización nitrogenada (úrea), dentro del suelo (0 - 20 kg N/ha) y en superficie (0 - 70 kg N/ha), en el cultivo de frijol común, con dos cultivares, Pérola y IAC Carioca, de las cuales, solamente, el primero responde con un efecto positivo lineal a la aplicación de Mo, bajo los dos casos de aplicación del nitrógeno, en el incremento del rendimiento de grano (Fernández *et al.*, 2005).

El molibdeno aplicado a plantas de soya noduladas y sin nodular incrementó el contenido de nitrógeno y rendimiento de grano solamente en las plantas noduladas, sin o con insuficiente suministro de fertilizante nitrogenado. Sin la aplicación de éste, las plantas noduladas incrementaron el contenido de nitrógeno en 1.33 veces y el rendimiento presentó mejor respuesta al aplicar molibdeno en las plantas noduladas sin la incorporación de nitrógeno, aumentando 1.21 veces.

Además, cabe resaltar que el rendimiento de las plantas noduladas sin la aplicación de nitrógeno y con suministro de molibdeno fue 3.05 tn/ha, cercano a los rendimientos de los tratamientos nitrogenados en plantas de soya sin inoculación de *Bradyrhizobium*, siendo menor solamente por 100 kg/ha comparado con aquél tipo de tratamiento (201 Kg N/ha) (Marschner 1995).

La aplicación foliar de Mo (0, 40, 80 y 150 g/ha), 25 días después de la emergencia, con una fertilización de 20 kg/ha de N y 60 kg K₂O/ha en la siembra, el Mo incrementó y mantuvo las actividades de la nitrogenasa y nitrato reductasa durante todo el ciclo de la planta. El rendimiento de grano de frijol más alto fue obtenido con 80 g/ha de Mo con una producción de 1893 kg/ha de granos de frijol, el cual fue 3.23 veces más alto que las plantas sin suministro de Mo (448 kg/ha). La aplicación foliar de Mo incrementó el

número de vainas por planta en 1.54 veces, el número de granos por vaina en 1.23 y el peso de 100 granos en 1.15 comparados con el control (Pessoa *et al.*, 2001).

En un estudio de aplicación foliar de molibdato de amonio de 0 – 45 g/ha a los 21, 28 y 35 días después de la emergencia de variedades de fríjol común (Cuadro N° 3), (variedades fijadoras de nitrógeno: México 309, Negro Argel; y, comerciales: Carioca 80 –SH y Jalo EEP – 558), con nitrógeno nítrico. Se observaron mejores respuestas al Mo en las variedades fijadoras de N que las comerciales, con incrementos en el número de nódulos, materia seca, concentración de N, componentes de rendimiento y en la concentración de Mo en semilla, inducido por un mejor desempeño de la nitrogenasa y la xantina oxidasa, atrapando más nitrógeno y metabolizándolo mejor, respectivamente. Sin embargo, también en las variedades comerciales se presentó un incremento de rendimiento no despreciable, debido muy posiblemente al mejor desempeño de la nitrato reductasa transformando el nitrato, acumulado en las hojas, a formas amínicas (Gonzales *et al.*, 2002).

Cuadro N° 3. Efecto de la adición del Mo en la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de variedades de fríjol

Variedades	Rendimiento (kg/ha)		Incremento de rendimiento (%)
	Sin Mo + N	Con Mo + N	
México 309	1013	1546	53
Negro Argel	733	916	25
Carioca	576	673	17
Jalo EEP	477	558	17

En un estudio de la influencia del Mo y Co sobre la fijación de nitrógeno en el cultivo de soya “NAM 1”, bajo condiciones de invernadero, en suelo oxisol, al cual se le encaló en el rango de 0 – 1 tn/ha, Mo (molibdato de sodio) con aplicaciones de 0 – 390 y 780 g Mo/ha y Co a 0, 454 y 907 g/ha; mostró que el tratamiento de cobalto a la tasa de 454 g/ha tuvo la mejor nodulación y número de nódulos efectivos por planta, así como en la

acumulación total de N en la parte aérea. El encalado aumentó el pH en 2 unidades y la combinación de 1 tn CaCO_3/ha con Co (454 g/ha), incrementaron en la nodulación y el número de nódulos efectivos por planta, pero enmascaran el efecto positivo del Co sobre la acumulación total de N en la parte aérea; también, la máxima combinación de ambos, CaCO_3 y Co tuvo un efecto depresor en el número de nódulos. La aplicación de Mo, ya sea solo o en combinación con cal y Co, no afectó significativamente en el número de nódulos por planta. Ningún tratamiento, solo o en combinación, afectó los pesos de nódulos y de la parte aérea (Tenywa 1997).

En un ensayo de aplicación foliar de Mo y Co, con tratamientos: 0 – 0, 49 – 4.9, 63 – 6.3 y 97 – 9.7 g/ha, a plantas de frijol común cv. FT Nobre, inoculadas con *Rhizobium*, con dosis: 0, 200 y 400 g de inoculante /50 kg semilla; además de un referente de fertilización sintética de nitrógeno, 70 kg/ha. El incremento de la dosis de *Rhizobium* causó un efecto positivo lineal sobre el rendimiento de grano a partir de la dosis más baja de Mo – Co, siendo la más significativa con la combinación de la dosis más alta de ambos, *Rhizobium* y Mo – Co, llegando a 1891 kg/ha, cercano al obtenido del nitrogenado, 1981 kg/ha. Así mismo, el suministro solo de *Rhizobium* incrementó el rendimiento de grano, pero no fue lo mismo cuando se aplicó Mo – Co sin inoculante (Berton *et al.*, 2008). Pero, en combinación estos micronutrientes contribuyeron a una mejor fijación del nitrógeno, incrementando el metabolismo del mismo (Dechen *et al.*, 1991).

Semejantes resultados fueron obtenidos por el incremento de dosis del inoculante, más la aplicación de Mo – Co. Es así, que cuando el Co fue agregado a los tratamientos inoculados el rendimiento de grano incrementó en 100% y cuando el Mo fue agregado, dicho parámetro incrementó 130%. La materia seca incrementó en 61% al suministrar

Co, mientras que con el Mo en 49%. Al combinar estos micronutrientes fueron tan eficientes como el súper fosfato, equivalente a 1000 kg/ha (Juanqueira *et al.*, 1977).

En un experimento conducido en un invernadero, con suelo tipo Latossolo, al incrementar los niveles de Mo (0, 7, 14 e 21 g/ha de Mo) y Co (0, 0,3; 0,6 e 0,9 g/ha de Co), aplicado a las semillas y además combinado con el inoculante, se incrementó el número de vainas/planta, semillas/vaina y rendimiento de grano. El valor más alto del último, fue logrado cuando el Mo y Co fueron suministrados a las tasas de 14 y 0.6 g/ha, respectivamente (Corrêa *et al.*, 1990).

En un experimento de campo se trató a las semillas de fríjol loctao (*Vigna radiata*), variedad “Puri local”, con micronutrientes (0.08 - 0.16 mg Mo y 0.008 – 0.016 mg Co por gramo de semilla, como molibdato de sodio y cloruro de cobalto, respectivamente) y *Rhizobium*, en un suelo ligeramente ácido (pH = 6.1). El rendimiento de grano varió de 157 kg/ha en el testigo a 280 kg/ha en el que recibió inoculación con la máxima y mínima dosis de Mo y Co. La inoculación de *Rhizobium* aumentó el rendimiento de grano en 25% y el mismo adicionando los micronutrientes incrementó desde 61.7 a 78.4%. Siendo la mayor dosis de Mo más efectiva que la menor. El efecto del Co fue menor que el Mo, pero éstos en combinación tuvieron un efecto complementario, aumentando el rendimiento del cultivo. La ganancia de N fue mayor en los granos que en el rastrojo, prácticamente el doble. De igual modo, la mejor combinación de *Rhizobium*, Mo y Co, mencionado anteriormente, presentó la más alta ganancia de N por el cultivo con un extra de contenido de N de 24 kg, atribuible a la fijación de N.

La inoculación de *Rhizobium* solo o con los micronutrientes incrementó el número de nódulos, variando de un rango de 9 a 27 unidades. El peso de los nódulos mejoró significativamente con los micronutrientes, alcanzándose mayor valor con la dosis más

alta de Mo combinado con la más baja de Co, 200 y 100 g /ha, respectivamente (Pattanayak *et al.*, 2000).

Con el objetivo de evaluar los efectos del molibdeno y cobalto en nodulación, nutrición mineral y rendimiento de grano, se aplicó a las semillas de soya (cultivar COODETEC 201), molibdato de Na (0 y 48 g/ha), sulfato de cobalto (0, 2, 4 y 8 g/ha) y se inoculó con *Bradyrhizobium japonicum* (200 g de inoculante por 50 kg de semilla). La interacción del Mo y Co no mostraron efecto en la nodulación, ni en la eficiencia de fijación biológica del N, evaluado en el contenido de N de la soya en la hoja o grano. Además, se observó una significativa disminución lineal en la altura de plantas, concentración foliar de Zn y rendimiento de grano, proporcional a las cantidades de aplicación de Co. (Marcondes *et al.*, 2005).

En un estudio para evaluar el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas con Mo y Co sobre el crecimiento, contenido de N y rendimiento de grano del fríjol francés (*Phaseolus vulgaris*) cv “Burpees Stringless”, en el cual el molibdato de sodio a 2 ppm y nitrato de cobalto a 1 ppm usados separadamente mostraron mejores resultados, comparado con el resto de los tratamientos en cuanto a nodulación, materia seca, concentración de N y rendimiento de grano. Los tratamientos combinados con molibdato de sodio y nitrato de cobalto no mostraron un efecto sinérgico sobre cualquier parámetro estudiado, comparado con sus respectivos tratamientos singulares (Mohandas *et al.*, 1985).

Ferris (2004), con el objetivo de evaluar diferentes dosis de molibdeno y cobalto sobre el rendimiento de soya inoculada con *Bradyrhizobium sp* y de comparar la eficiencia aplicada vía foliar dichos elementos con el tratamiento aplicado a la semilla, empleado dosis de 240 y 180 g de Mo y Co respectivamente. El testigo mostró un rendimiento de 2949.8 kg/ha; el inoculado con *Bradyrhizobium sp*, 2978 kg/ha; el Mo, Co y bacteria

aplicado a la semilla, 3233 kg /ha; y en la que se suministró foliarmente, 3039 kg/ha. Siendo el mejor tratamiento la aplicación de Mo y Co a la semilla ya que aumentó en 254 kg/ha, mientras que, vía foliar aumentó en 60 kg/ha.

Gad (2006), experimentó el efecto del Co en el rendimiento de arveja tratada con diferentes fertilizantes a diferentes dosis. Los mayores rendimientos se dieron en la interacción del Co con el nitrato de amonio y Co con úrea, comparado con aquellos en las que se utilizó solamente nitrato y/o úrea. Y, ni siquiera, la dosis más alta de estos fertilizantes obtuvo mayores rendimientos que sus interacciones con Co (úrea: 48.5; Co + úrea: 69.2; nitrato 52; Co + nitrato: 72 gramos de vaina /planta), mostrando un 38% más eficiente el nitrato con el suministro de Co.

El *Lupinus angustifolius* es una planta sensible a la deficiencia de cobalto. Al comparar los tratamientos inoculados con *Rhizobium lupini*, con y sin cobalto. La aplicación de cobalto aumentó 1.22 veces el peso de nódulos de la corona; 1.56 veces el contenido de DNA; el contenido de metionina sintasa incrementó 1.35 veces; el peso de nódulo/planta 6 veces; 2.33 veces aumentó el contenido de cobalto en los nódulos; 1.8 veces en el número de bacteroides; el contenido de cobalamina se incremento notablemente en 4.8 veces y la leghemoglobina en 2.69 veces (Marschner 1995 y Mengel et al 2000).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DEL CAMPO EXPERIMENTAL

4.1.1. Ubicación

El presente trabajo experimental se desarrolló en el campo Guayabo I, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, entre agosto del 2007 y febrero del 2008. Dicho lugar tiene una latitud 12°58'06'' sur y longitud 56°57'07'', con una altitud de 235 m.s.n.m.

4.1.2. Características del suelo

El suelo de La Molina está ubicado fisiográficamente en una terraza media de origen aluvial. Se caracteriza por ser profundo y de buen drenaje, de permeabilidad moderada, la textura media a ligeramente gruesa; de estructura granular fina a moderada; de consistencia friable a muy friable en húmedo. La muestra de suelo fue tomada el 05 de julio del 2007, antes del experimento, a una profundidad de 20 cm.

Las propiedades físico-químicas del suelo fueron determinadas empleando los métodos seguidos por el laboratorio de análisis de suelos y plantas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (LASPAF – UNALM), previa preparación de la muestra de suelo.

Los métodos seguidos por dicho laboratorio se describen a continuación:

La conductividad eléctrica se determinó en base a la suspensión de suelo filtrada y la conductividad eléctrica del extracto obtenido fue medida por un conductímetro o salómetro digital marca YSI (Yellow Springs Instrument) con aproximación al centésimo. Un factor de conversión, obtenido dividiendo 100 cm^3 entre el volumen exacto de agua destilada para preparar la pasta saturada con una muestra de 100 g de suelo, fue multiplicado por las lecturas de conductividad eléctrica en el extracto 1:1 anterior, para obtener dicho parámetro en el extracto de saturación del suelo.

El pH fue determinado potenciométricamente en relación 1:1, agua – suelo y refleja el grado de alcalinidad o acidez que caracteriza al suelo.

El método del hidrómetro de Bouyoucos es una de las formas más rápidas para analizar el tamaño de las partículas del suelo o determinar la textura del suelo. La muestra de suelo disperso es mezclada en una probeta con agua y una vez que se asienta, la densidad de la suspensión se puede medir con el densímetro. El tiempo que cada tamaño de partícula toma al caer, por debajo de un plano de conjunto imaginario en el cilindro puede ser medido, con las lecturas que son tomadas después de 40 segundos para medir la sedimentación de arena y después de dos horas para medir las partículas de limo.

La materia orgánica del suelo fue determinada por digestión vía húmeda (método de Walkley y Black). El procedimiento se basa en la determinación de carbono orgánico, el cual es multiplicado por el factor 1.724, el porcentaje de materia orgánica se multiplica por el carbono orgánico. Se estima que la materia orgánica de los suelos contiene en promedio 5 % de nitrógeno total y 58 % de carbono.

El fósforo disponible fue determinado por colorimetría con el reactivo amino-naftol-sulfónico, del extracto de suelo empleando el extractante de Olsen (NaHCO_3 0.5M) tanto para suelos ácidos como para alcalinos.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), fue determinada mediante destilación de Kjeldahl del suelo saturado con solución de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1N), en tanto que los cationes cambiables fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica del filtrado anterior.

**Cuadro N° 4. Análisis fisicoquímico del suelo del Campo Experimental
Guayabo I**

Determinación	Valor	Calificación
Arena (%)	52	
Limo (%)	32	
Arcilla (%)	16	
Clase textural		Franco
CE (dS/m)	0.54	Muy ligeramente salino
pH	8.1	Moderadamente alcalino
CaCO ₃ (%)	3.81	Moderadamente calcáreo
Materia orgánica (%)	1.18	Baja
P disponible (ppm)	8.8	Medio
K disponible (kg/haK ₂ O)	456	Alto
CIC cmol/kg	18.38	Medio
Ca ⁺⁺ cmol/kg	14	Adecuado
Mg ⁺⁺ cmol/kg	1.99	Adecuado
K ⁺ cmol/kg	1.27	Elevado
Na ⁺ cmol/kg	1.12	No sódico

La interpretación de los resultados de la caracterización del suelo, corresponde a una conductividad eléctrica muy ligeramente salina con valor de 0.54 dS/m (Cuadro N° 4). Además, el pH del campo experimental mostró un valor de 8.1, siendo moderadamente alcalino. De textura franca, con un contenido de materia orgánica igual a 1.18%, clasificado como bajo, el fósforo disponible es de 8.8 ppm, clasificado como medio, lo cual equivale a 56.43 kg/ha de P₂O₅/ha y el potasio presenta un valor de 456 kg/ha de K₂O /ha, caracterizado como nivel alto.

Finalmente, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo del campo experimental presenta un nivel medio, 18.38 cmol/kg.

4.2. Características climáticas durante el desarrollo del cultivo

Las variables climáticas promedio por mes dadas durante el desarrollo del cultivo se puede observar en el cuadro N° 5.

Cuadro N° 5. Variables climáticas registradas durante el periodo experimental del cultivo

Mes	Radiación solar (landley/día)	Helofanía (horas/mes)	T ^o máx (°C)	T ^o mín (°C)	T ^o prom.	Amplitud térmica (°C)	HR ^o máx (%)	HR ^o mín (%)	HR ^o prom (%)	Evapotranspiración potencial (mm/mes)	Precip (mm/mes)
Set	9.69	57.9	17.9	12.5	14.9	5.4	98	78	88	57.1	4.6
Oct	13.78	148.2	19.9	12.8	16.6	7.1	95	77	87	88.5	0.8
Nov	16.44	182.9	22.1	14.2	18.5	7.9	94	71	82	105.5	0.3
Dic	13.5	163.1	24.1	16.1	20.1	8	93	69	81	116	0
Ene	15.9	130.1	27.7	19.6	23.9	8.1	93	70	80	134.4	Traza

Fuente: Estación Meteorológica Alexander Von Humbolt – UNALM

El clima durante el tiempo de desarrollo y crecimiento del fríjol en el campo experimental fue favorable en cuanto a temperatura, mayor a 10°C y menor a 25°C, ideal para plantas C3, aunque la precipitación fue escasa y la evaporación alta, por tal motivo se regó para satisfacer la demanda de hídrica del cultivo.

4.3. MATERIALES

4.3.1. Material biológico

4.3.1.1. Fríjol Canario Centenario

El fríjol Canario Centenario debe su nombre al lanzamiento realizado por el programa de leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con motivo del centenario de creación de dicha universidad.

Es un fríjol arbustivo (tipo I), de una altura de 60 cm, produce entre 15 – 30 vainas/planta, con 5 granos/vaina, de color amarillo intenso brillante, de tamaño mediano, forma ovoide truncado, 55.5 g /100 granos. De un período vegetativo de 110 días.

Se recomienda la siembra de esta variedad en la costa y para el valle interandino hasta

los 2400 msnm. Tiene un rendimiento en la costa de 2500 – 3000 kg/ha, en la sierra baja hasta los 2400 msnm, 2000 kg/ha.

El Canario Centenario es resistente al virus del mosaico común (BCMV), tolerante a la “roya” (*Uromyces appendiculatus*) y al “oidium” (*Ersiphe polygoni*).

Para el caso del trabajo experimental se necesitó un promedio de cinco kg de semilla fríjol Canario Centenario del programa de leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

4.3.1.2. Bacterias *Rhizobium etli*

El inóculo de *Rhizobium etli* procedió del Laboratorio de Ecología Microbiana y de Biotecnología Marino Tabusso de la Universidad Nacional Agraria La Molina, viene en presentación líquida en frascos de 50 mL, cuya concentración es 10^8 células/mL.

4.3.2. Materiales

4.3.2.1. Bomba de agua

Se usó una bomba de agua a gasolina, marca Yamaha, de una potencia de 5.5 HP, con una salida de agua de tres pulgadas, para suministrar el riego por aspersión.

4.3.2.2. Fertilizantes

Las fuentes de fertilizantes usados en la presente tesis se pueden apreciar en el cuadro N° 6, con sus respectivas características.

Cuadro N° 6. Fuentes de fertilizantes usados en el campo experimental

Fertilizante	Fórmula	Ley (%)	Tipo	Solubilidad
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	33.5 N	Granular	muy alta
Superfosfato triple de calcio	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	46 P_2O_5	Granular	media
Sulfato de potasio	K_2SO_4	50 K_2O , 11 S%, 22% MgO	Granular	alta
Sulpomag	KMg_2SO_4	22 K_2O , 11 S y 22 MgO	Granular	alta

Los micronutrientes usados se mencionan a continuación:

Molibdato de amonio (NH₄)₆Mo₇O₂₄·2H₂O)

Tiene como ley de fertilizante 54 % de Mo, con una solubilidad alta y una densidad de 3.28 g/cm³.

Sulfato de cobalto (CoSO₄·7 H₂O)

En cuanto a cobalto presenta entre un 99 - 98% como CoSO₄, de aspecto cristalino, sólido, color rosado rojo, con un punto de fusión de 97°C, peso molecular de 281.10 g/mol, densidad de 1.948 g/cm³ y altamente soluble.

Micronutrientes

Se aplicará una mezcla de micronutrientes consistente en sulfato de hierro, cobre, zinc, manganeso y ácido bórico, diluyendo la mezcla y aplicando al cuello de las plántulas de fríjol.

4.4. Tratamientos en estudio

Para el presente proyecto se considera los siguientes tratamientos observados en el cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Tratamientos en Estudio

Tratamientos	Grupos	Descripción	Insumos a usar					
			N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Em	Mo*	Co**
T1	Testigo	Testigo	0	0	0	0	0	0
T2	Fertilización sintética con N	Fertilización sintética	80	60	60	Em	0	0
T3		Fertilización sintética más Mo	80	60	60	Em	Mo	0
T4		Fertilización sintética más Mo y Co	80	60	60	Em	Mo	Co
T5		<i>Rhizobium</i>	Rh	60	60	Em	0	0
T6	Rizobiales	<i>Rhizobium</i> más Mo	Rh	60	60	Em	Mo	0
T7		<i>Rhizobium</i> más Mo y Co	Rh	60	60	Em	Mo	Co

Em : mezcla de elementos menores.

Rh : *Rhizobium etli*

* : 200 g/80kg de semilla del molibdato de amonio.

** : 100 g /80kg de semilla del sulfato de cobalto.

Los siete tratamientos se agrupan, aparte del testigo, en tres tratamientos de fertilizaciones sintéticas (T2, T3 y T4) y tres de rizobiales (T5, T6 y T7) (Cuadro N° 7). Los primeros tratamientos de cada grupo no recibieron Mo ni Co, los siguientes solamente se adicionó Mo, a la dosis de 200 g/80 kg de semilla de molibdato de amonio; y, a los terceros se añadió Mo y Co, con la misma dosis del molibdeno y el Co a 100 g/80 kg de semilla de sulfato de cobalto, diluyendo éstos en 100 ml de agua y sumergiendo las semillas en dicha dilución (para todos los casos).

4.5. Diseño experimental

4.5.1. Características del campo experimental:

Parcelas:

Número	: 35
Número de surcos	: 5
Ancho de parcela	: 4
Distancia entre golpes	: 0.2 m
Distancia entre surcos	: 0.8 m
Número de golpes/surco	: 50
Número de semillas/golpe	: 1
Área de parcela	: 16 m ²
Área total	: 560 m ²

Bloques:

Número	: 5
Número de parcelas/bloque	: 7
Ancho del bloque	: 4 m
Largo del bloque	: 16 m
Área del bloque	: 64 m ²

Calles:

Número de calles	: 4 m
Ancho de calles	: 1 m
Largo de calle	: 28 m
Área de calle	: 112 m ²

Área total del experimento : 672 m²

4.6. Procedimiento

La presente investigación, en la etapa de campo, se inició con la preparación del terreno, bajo un sistema de cero labranza, por lo que no se labró el suelo, sin embargo se adicionó rastrojo de frijol y se delimitó o trazó las unidades experimentales. Luego de un mes aproximadamente se sembró las semillas de frijol Canario Centenario previamente ya tratadas con *Rhizobium*, Mo y Co. Se regó oportunamente el campo experimental hasta llegar a la madurez fisiológica del grano del frijol. También, las fertilizaciones sintéticas se realizaron oportunamente y de igual modo para el control de plagas, enfermedades y malezas. Se culminó la etapa de campo con la cosecha y con el registro de indicadores preestablecidos en la etapa fenológica oportuna.

4.7. Conducción del experimento

4.7.1. Elección del terreno

Fue difícil conseguir un terreno ideal para la siembra en cero labranza debido a que en la cosecha del cultivo precedente no queda casi nada de rastrojo, debido a la costumbre de la labranza tradicional. Sin embargo, el suelo de la Universidad Nacional Agraria La Molina, presenta una excelente característica friable; por lo que se eligió un campo de cultivo en el que se había cosechado maíz, meses anteriores, el cual tenía algo de rastrojo y estaba totalmente enmalezado.

4.7.2. Preparación del terreno

El campo experimental estaba totalmente enmalezado y con poco rastrojo del maíz, por lo cual se aplicó glifosato a una concentración de 2 litros de glifosato /200 litros de agua, más 50 mL de adherente agrícola. Después de “quemar” las malezas, el rastrojo resultante sobre el área experimental fue demasiado escaso, por lo que se procedió a depositar, sobre dicha área, rastrojo de frijol en una proporción aproximada de 2 t/ha.

Luego durante cuatro semanas se aplicó tres riegos por aspersión para almacenar agua en el suelo y principalmente fomentar la actividad microbiana del suelo.

4.7.3. Trazado de las unidades experimentales

Usando cuerdas de rafia y estacas de madera se delimitó las unidades experimentales, basadas en el diseño del campo experimental, apreciándose claramente 35 unidades (Foto N° 1).

4.7.4. Inoculación de *Rhizobium* y con adición de molibdeno y cobalto

La inoculación del *Rhizobium* a la semilla fue el día de la siembra, junto con el molibdeno y cobalto, utilizando goma arábica para adherir éstos a la semilla. Este procedimiento se hizo cuidadosamente utilizando guantes, a la sombra evitando los rayos solares y luego se dejó secar 30 minutos. Para la inoculación del *Rhizobium*, se diluyó éste, más el Mo y Co en agua en la proporción, 50ml/80Kg de semilla (inóculo), 200 gramos/80Kg de semilla (molibdato de amonio) y 100 g /80kg de semilla (sulfato de Co), respectivamente.

4.7.5. Siembra

La siembra se realizó manualmente a los 37 días después de la preparación de terreno, cuando el suelo estaba a capacidad de campo, depositando tres semillas cada 0.20 m, a una profundidad aproximada de 0.04 m y 0.80 entre líneas.

4.7.6. Germinación

La emergencia de las plántulas fue muy buena, mayor al 90%, estableciéndose entre los ocho y nueve días después de la siembra. Solamente se tuvo problemas con los pájaros que comían las semillas y plántulas recién germinadas, por lo que se tuvo que cuidar el campo experimental 11 horas diarias, durante cuatro días (Foto N° 1).



Foto N° 1. Trazado de parcelas experimentales y emergencia de plántulas

4.7.7. Primera fertilización

La fertilización N, P, K y micronutrientes fue aplicada de acuerdo a los tratamientos establecidos, 15 días después de la emergencia. La mitad de la dosis de nitrato de amonio para las unidades experimentales con fertilización sintética y completa para los demás nutrientes.

4.7.8. Riego

Después de la fertilización se aplicó un riego ligero por aspersion, ya que el suelo contaba con suficiente humedad, solamente para activar los nutrientes.

4.7.9. Control fitosanitario

Las plagas y enfermedades ocurridas durante todo el ciclo fenológico del cultivo se muestran en el cuadro N° 8, apreciándose también el plaguicida usado para el control, dosis y momento de aparición.

**Cuadro N° 8. Plagas y enfermedades ocurridas durante todo el ciclo fenológico del
fríjol Canario Centenario**

Etapa fenológica	Plaga y enfermedad	Plaguicida	Dosis
Germinación y emergencia	“Gusanos de Tierra” (<i>Agrotis</i> spp)	Cipermetina	200mL/200 L
	“Feltia experta” (<i>Elasmopalpus</i> spp)	Clorpirifos	400 mL/200L
	“Tizón del halo” (<i>Pseudomonas phaseoli</i>)	Cupravit	200g/200 L
Crecimiento vegetativo	“Mosca minadora” (<i>Liriomiza</i> spp)	Abamectina	200 mL/200L
	“Comedor de hoja” (<i>Diabrotica</i> spp)	Cipermetria	200mL/200 L.
	“Caracol” (<i>Helix</i> spp)	Cipermetria	200mL/200L.
	“Gusano pegador de brote” (<i>Epinotia aporema</i>)	Furadan 4F	400 mL/200L
	“Roya” (<i>Uromyces appendiculatus</i>)	Folicur	200mL/ 200L
Floración - reproducción	“Pegador de brotes” (<i>Epinotia aporema</i>)	Furadan 4F	400 mL/200 L
	“Barrenador de vainas” (<i>Laspeyresia leguminis</i>)	Vydate L	300 mL/200L

4.7.10. Control de malezas

Gracias a la gran cantidad de rastrojo presente sobre el suelo, la presencia de malezas fue muy baja y localizada, es así que se pudo controlar fácilmente haciendo aplicaciones de glifosato (2000 mL/200 L de agua), localizadamente. Las malezas que más se presentaron fueron cuatro: “Yuyo” (*Amaranthus* spp), “Rábano” (*Raphanus sativus*) “Amor seco” (*Bidens pilosa*) y “Coquito” (*Cyperus rotundus*); y, en menor cantidad: “Grama china” (*Sorghum halepense*), “Verdolaga” (*Portulaca oleracea*), y “Cola de alacrán” (*Heliotropium* spp) (Foto N° 2).



Foto N° 2. Campo libre de malezas en pleno crecimiento vegetativo del fríjol

4.7.11. Cosecha

La cosecha fue realizada la última semana de enero. Las plantas de las líneas centrales de cada unidad experimental fueron cortadas y agrupadas para la trilla manual, golpeándolas con un palo de madera para la extracción de los granos.

En el anexo N° 1 se muestra el cronograma del cultivo desarrollado.

4.8. Características evaluadas

4.8.1. Altura de planta (cm): cuando el 50% de las plantas de la parcela presente flores abiertas. Fue tomado el promedio de la altura de diez plantas, midiendo desde el cuello hasta el ápice de las plantas, de cada unidad experimental.

4.8.2. Área foliar (dm²): en la etapa de crecimiento vegetativo, con un sacabocado fueron sacados unos círculos de diez plantas por parcela, se midió el área de dichos círculos y fueron pesados, entonces fácilmente se pudo relacionar el peso total por planta con su respectiva área con la proporción del peso y área de los círculos. Finalmente se calculó el promedio.

4.8.3. Número de nódulos por planta: de las raíces de diez plantas al azar se contabilizaron el número de nódulos y se calculó el promedio.

4.8.4. Peso de nódulos: de las diez plantas tomadas al azar anteriormente, para contabilizar el número de nódulos, se pesaron dichos nódulos y se promediaron.

4.8.5. Número de vainas por planta: fueron tomadas diez plantas al azar de las líneas centrales por parcela y se contabilizó cuántas vainas viables tuvo y luego se calculó el promedio.

4.8.6. Número de granos por vaina: fueron seleccionadas diez vainas al azar de las mismas plantas y se contabilizó el número de granos para determinar el promedio.

4.8.7. Peso de 100 granos (g): a la cosecha de cada parcela se tomó cinco repeticiones de muestras correspondientes a 100 granos, ajustando al 14% de humedad y se obtuvo un promedio.

4.8.8. Rendimiento de grano seco (kg/ha): se pesó el grano total de cada parcela, de las líneas centrales, ajustado al 14% de humedad, por unidad de área.

4.8.9. Índice de cosecha (IC): al cosechar cada parcela, primero fueron tomados el peso de toda la cosecha (planta más semilla), luego el peso de la semilla para poder determinar la relación entre producto utilizable con el total de la planta (incluida la semilla).

4.8.10. Nitrógeno en la semilla, rastrojo y total: se tomaron muestra de semilla y rastrojo por cada unidad experimental y se envió al laboratorio para analizar el porcentaje de nitrógeno de la semilla y rastrojo y así también conocer el total. Luego se pudo calcular los promedios.

4.9. Análisis Estadístico

4.9.. Diseño experimental

El análisis de varianza de los datos obtenidos de las características evaluadas, se hicieron de acuerdo a las especificaciones del diseño experimental empleado, bloques completamente al azar (DBCA), utilizando el programa de análisis estadístico Statistical Analysis Systems SAS 2008 Versión 9.1 , para las variables: altura de planta, área foliar, número de granos por vaina, peso de 100 granos, rendimiento de grano seco, índice de cosecha, nitrógeno total, nitrógeno de la semilla, nitrógeno de la parte aérea, peso de nódulos y número de nódulos.

El DBCA se efectuó con siete tratamientos y cinco repeticiones, haciendo un total de 35 unidades experimentales, con 34 grados de libertad, cuyo modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} : observación del tratamiento del i-ésimo tratamiento en el j-ésimo bloque.

μ : efecto de la media general.

T_i : efecto del i-ésimo tratamiento.

β_j : efecto del j-ésimo tratamiento.

ϵ_{ij} : error experimental, correspondiente al j-ésimo bloque, a la cual se le aplicó el i-ésimo tratamiento.

Donde:

$i = 1 \dots \dots \dots 7$ tratamientos

$j = 1 \dots \dots \dots 5$ repeticiones

El esquema del ANVA para parámetros en comparación:

FV	GL	SC	Cmed	Fcal
Bloques	$r - 1 = 4$	SCB	cmB	cmB/cme
Tratamientos	$t - 1 = 6$	SCT	cmT	cmT/cme
Error	$(r-1)(t-1)=24$	SCE	cmE	
Total	34	SCT		

4.9.2. Tratamiento estadístico

Para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó la prueba de comparación del HSD de Tukey de comparación múltiple, con un nivel de significación de 5 %, para agrupar los datos según diferencias estadísticas mínimas significativas, utilizando el programa de análisis estadístico Statistical Analysis Systems SAS 2008 Versión 9.1 .

V. RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las variables de absorción de nitrógeno, biométricas y componentes de rendimiento evaluados en el cultivo de frijol Canario Centenario se resumen en el Cuadro N° 9.

Cuadro N° 9. Promedio de las variables biométricas y de los componentes de rendimiento

Tratamientos (agrupación)	Tratamientos	Altura		Área foliar		Nº vainas/pl		Nº granos/vaina		Peso 100 granos		Peso total		IC		Rendimiento	
		cm	*	dm ²	*	Nº	*	Nº	*	gramo	*	kg/ha	*	%	*	Kg/ha	*
Testigo	T	46.38 ^C	100	8.216 ^F	100	8.80 ^D	100	3.2 ^D	100	40.19 ^C	100	1433.7 ^F	100	47 ^D	100	679.740 ^F	100
Fertilización sintética con N	N	65.24 ^{AB}	141	36.73 ^C	459	16.8 ^C	191	4.2 ^{ABC}	131	41.61 ^{BA}	104	3647.5 ^C	254	52 ^C	111	1881.96 ^C	277
	NMo	68.56 ^A	148	45.23 ^A	565	32.4 ^A	368	5.0 ^A	156	42.35 ^A	105	5287.5 ^A	369	51 ^C	109	2716.00 ^A	400
	NMoCo	65.92 ^{AB}	142	41.01 ^B	513	28.2 ^B	320	4.6 ^{AB}	144	42.22 ^A	105	4680.0 ^B	326	51 ^C	109	2402.90 ^B	354
	Rh	61.26 ^B	132	25.37 ^E	317	11.2 ^D	127	3.4 ^{CD}	106	41.31 ^B	103	2272.4 ^E	158	52 ^{BC}	111	1191.92 ^E	175
Rizobiales	RhMo	64.72 ^{AB}	140	35.20 ^C	440	16.2 ^C	184	4.0 ^{BCD}	125	41.46 ^{BA}	103	3137.5 ^D	219	55 ^A	117	1719.28 ^D	253
	RhMoCo	63.48 ^{AB}	137	30.97 ^D	387	16.4 ^C	186	4.2 ^{ABC}	131	41.79 ^{BA}	104	3212.5 ^D	224	54 ^{BA}	115	1727.80 ^D	254

Los valores mostrados son promedio de cinco repeticiones. Los valores dentro de la columna y con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba HSD de Tukey. Y los valores en la columna del asterisco, son las variaciones porcentuales, respecto al testigo.

5.1 Altura de planta

En el cuadro de promedios de altura de planta (Cuadro N° 9), el testigo presentó 46.38 cm y la aplicación de nitrógeno incrementó la altura en un 41%, al agregar Mo la altura aumentó un 48 % y con el suministro de Co se obtuvo un 42%, observándose que el tratamiento del molibdeno en la fertilización nitrogenada mostró mejor resultado, debiéndose al mejor desempeño de la nitrato reductasa en la reducción del nitrato a nitrito por mayor presencia del molibdeno (Marschner 1995).

En cambio, los tratamientos rizobiales al inocular el *Rhizobium etli* la altura de planta aumentó un 32 %; cuando se agregó Mo, al anterior, incrementó un 40 %; y el tratamiento RhMoCo aumentó un 37 %. de modo correlativo a los tratamientos nitrogenados, también el Mo en el tratamiento rizobial presentó mejor respuesta. Se observó un comportamiento muy semejante, pero en el cultivo de soya (Marcondes et al 2005), pudiéndose explicar que dicho micronutriente a través de las enzimas nitrogenasa y la xantina oxidasa/deshidrogenasa favoreció la fijación de nitrógeno atmosférico y metabolismo de purinas, respectivamente (Marschner 1995).

Cabe resaltar que la altura de planta en ambos casos, los nitrogenados y rizobiales con molibdeno, al suministrarles cobalto disminuyó ligeramente.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a semillas de fríjol Canario Centenario, con fertilización sintética e inoculación con *Rhizobium*, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto a la altura de planta ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), agrupó a los tratamientos N, NMoCo, RhMo y RhMoCo sin diferencia estadística significativa, mostrando a los tratamientos NMo y Rh con mayor significado estadístico en el orden mencionado.

5.2 Área foliar

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 9) y en el gráfico N° 1, el área foliar de los tratamientos con fertilización sintética de N presentaron, claramente mayor valor que los tratamientos rizobiales y estos a su vez mayor que el testigo. El tratamiento nitrogenado incrementó un 359 % respecto al testigo; al agregar molibdeno al nitrogenado aumentó un 465 %; y adicionando cobalto al NMo, dicho parámetro acrecentó un 413 % respecto al testigo. Siendo el tratamiento NMo el que mejor resultado mostró entre todos los tratamientos (nitrogenados y rizobiales), sustentándose en que el Mo, como cofactor de la nitrato reductasa, aumenta la actividad de esta enzima, por lo que al aplicar 5 µg Mo por planta, dicha actividad se incrementó en 27.3 veces al cabo de 70 horas (Marschner 1995).

En los tratamientos rizobiales, la sola inoculación del *Rhizobium etli*, incrementó el área foliar en 217 % respecto al testigo; al agregar molibdeno al *Rhizobium* se incrementó un 340 % y agregando cobalto al RhMo acrecentó un 287 %. De estos tratamientos, el RhMo fue el que mostró mejor efecto en el incremento del área foliar, destacándose el importantísimo rol del molibdeno en la actividad de la nitrogenasa y xantina oxidasa/deshidrogenasa, en la reducción del nitrógeno atmosférico y el metabolismo de las purinas a ureídos (Marschner 1995). Sin embargo, no hubo complementariedad del molibdeno y cobalto al agregarse éste al RhMo, contrariamente el área foliar disminuyó ligeramente. Pero, tal vez se compensa con el aumento de 3.75 nódulos por planta y un ligero incremento en el rendimiento de semilla, 8.52 Kg/ha, es decir que la aplicación de cobalto favoreció a los dos reservorios; ya que este microelemento está formando parte esencial de la coenzima cobalamina de la que dependen tres enzimas para la nodulación: metil malonil coenzima A mutasa, ribonucleótido reductasa y metionina sintasa,

participando en la síntesis de hemo, ADN y de proteínas, respectivamente (Mengel y Kirkby 2000).

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a semillas de fríjol canario “centenario”, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al área foliar ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), muestra diferencias estadísticas significativas, excepto para los tratamientos nitrogenados y RhMo. Siendo el tratamiento NMo el de mayor jerarquía.

5.3 Número de vainas por planta

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 9) y grafico N° 2, el número de vainas por planta, el tratamiento nitrogenado sintético aumentó dicho parámetro 91 % respecto al testigo. Al agregar molibdeno al nitrogenado incrementó en 268 % y, suministrando a éste cobalto aumentó sólo 220 %. Un efecto semejante y corroborativo se podría considerar el aumento de dicho parámetro en 1.54 veces en fríjol común al aplicar foliarmente molibdeno y resaltando que como fuente de nitrógeno se usó la urea (Pessoa *et al.*, 2001). Sin embargo, usando como fuente nitrogenada la urea en la nutrición del suelo, la aplicación foliar de molibdeno no tuvo efecto en el número de vainas por planta (Fernandes *et al.*, 2005). De esta manera podemos inferir que el molibdeno aplicado muestra mejor respuesta si la fuente nitrogenada a usar es nítrica, ya que este microelemento interviene a través de la nitrato reductasa para reducir el nitrato a nitrito (Marschner 1995).

La inoculación de *Rhizobium etli*, incrementó un 27 % el número de vainas por planta, respecto al testigo; agregando Mo al Rh aumentó un 84 %; y el tratamiento RhMoCo aumentó 86 % dicho parámetro. Esta situación, es similar cuando a las semillas de fríjol común se aplicó 0.6 y 14 g/ha de Mo y Co, respectivamente (Corrêa *et al.*, 1990). El

incremento del número de vainas por planta favorecido por estos microelementos, se podría explicar por el incremento de la actividad de la nitrogenasa y xantina oxidasa/deshidrogenasa, en el caso del molibdeno para la fijación de nitrógeno y metabolismo de la purina. Y en el caso de cobalto, a través de las enzimas metionina sintasa, ribonucleótido reductasa y metil malonil coenzima A, para la síntesis de proteínas, ADN y grupos hemo (en los *Rhizobium*), respectivamente (Mengel y Kirkby 2000).

El tratamiento RhMoCo fue el que presentó mejor respuesta dentro de los rizobiales y fue la que más se aproxima, sólo, al tratamiento nitrogenado sin Mo ni Co.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de frijol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al número de vainas por planta ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

En la prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), el número de vainas por planta, mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, a excepción del N, RhMo y RhMoCo, siendo el tratamiento NMo el de mayor categoría.

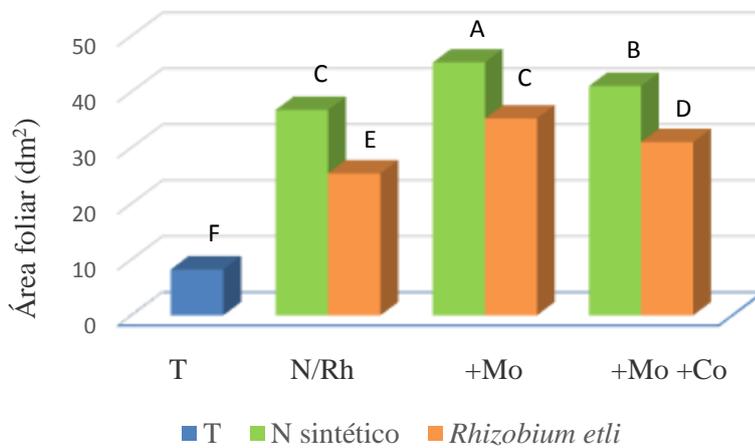


Gráfico N° 1. Efecto de la adición del Mo y Co a la semilla, sobre el área foliar de las plantas de fríjol

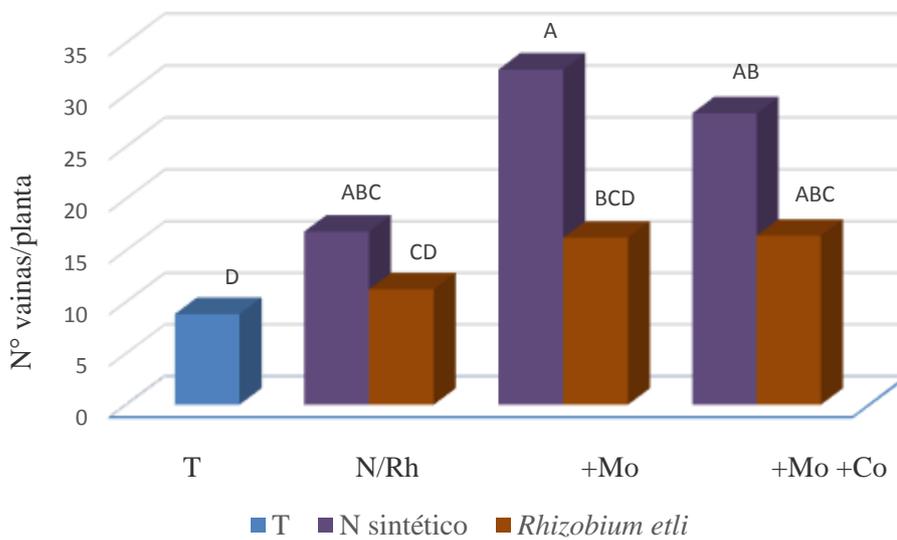


Gráfico N° 2. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de vainas por planta de fríjol

5.4 Número de granos por vaina

En el cuadro de promedios del número de granos por vaina (Cuadro N° 9) y en el gráfico N° 3, al aplicar solamente nitrógeno, dicho parámetro aumentó 31 % respecto al testigo, adicionando molibdeno al anterior se obtuvo un 56 % más y suministrando cobalto a la asociación NMo, aumentó un 44 %, este descenso podría justificarse con un aumento en el número de vainas por planta. En correlación a este experimento, pero utilizando urea como fuente nitrógeno y adicionando molibdeno, se incrementó dicho indicador en 1.23 veces (Pessoa *et al.*, 2001), pero de este mismo modo no se logró incrementar dicho parámetro en otro experimento (Fernandes *et al.*, 2005). Es así que, de nuevo se resalta la importancia de emplear fuentes de nitrógeno no reducidas ante la aplicación de molibdeno, ya que éste mejora la actividad enzimática de la nitrato reductasa en el metabolismo del nitrógeno (Marschner 1995).

En cuanto a los tratamientos rizobiales, la inoculación de la bacteria incrementó el número de granos por vaina en 6 %, al agregarle molibdeno al tratamiento anterior, el indicador se incrementó 25 % e igualmente fue cuando se suministró cobalto, aumentó un 31 %. Correlativamente, fue similar cuando a las semillas de fríjol común se aplicó 0.6 y 14 g/ha de Mo y Co, respectivamente (Corrêa *et al.*, 1990). El aumento de dicho indicador se podría explicar por un mejor desempeño de las enzimas catalizadoras del nitrógeno al tener mayor disponibilidad de sus cofactores.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al número de granos por vaina ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de HSD de Tukey (Cuadro N° 9), mostró mayor grado de significancia el tratamiento NMo.

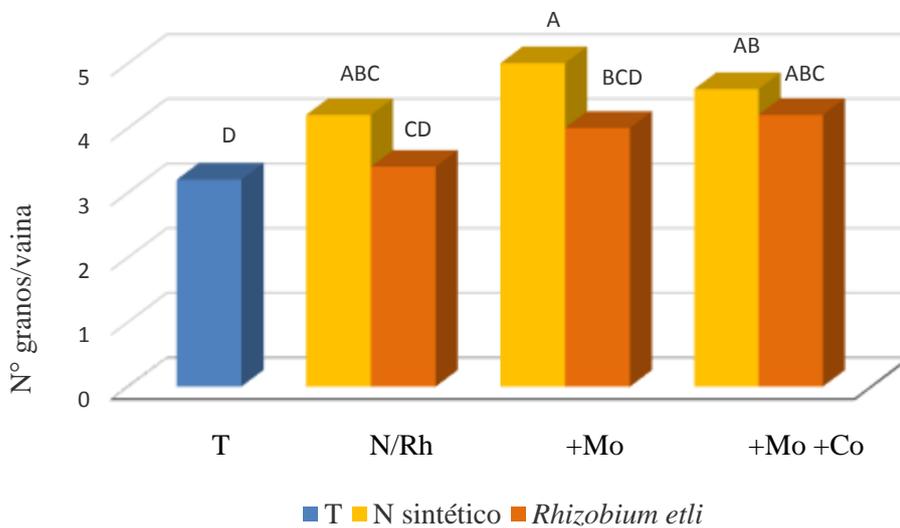


Gráfico N° 3. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de granos por vaina, por planta de fríjol

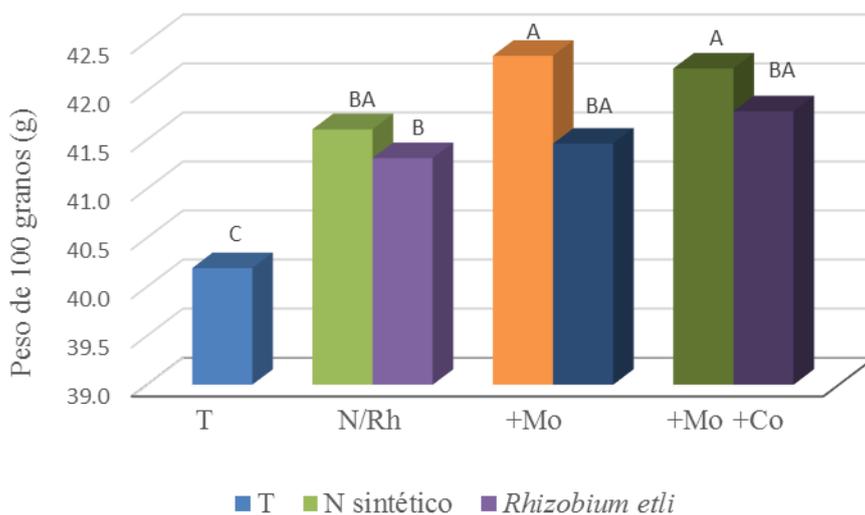


Gráfico N° 4. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el peso de 100 granos en la planta de fríjol

5.5 Peso de 100 granos

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 9) y en el gráfico N° 4, en el peso de 100 granos, la aplicación de nitrógeno incrementó el peso de 100 granos en un 4 %, al agregar molibdeno a este tratamiento, se elevó dicho indicador en un 5 % y adicionándole cobalto, no mostró alteración. Similarmente, la aplicación foliar de 75 g Mo/ha aumento el peso de 100 semillas en un 5 % (Araujo *et al.*, 2008). Este parámetro está relacionado directamente con el tenor de nitrógeno y el rendimiento, por lo que se podría inferir que el molibdeno como cofactor de la nitrato reductasa, metabolizó mejor el nitrógeno, obteniéndose mayor concentración de nitrógeno en el grano y por lo tanto mayor peso en éstas.

La inoculación de *Rhizobium* mostró un aumento del 3 % en el peso de 100 semillas respecto al testigo (Cuadro N° 9). Agregando molibdeno a la semilla inoculada, el indicador no varió y adicionando cobalto al tratamiento anterior (RhMo), dicho parámetro aumentó muy ligeramente. La observación del incremento de dicho indicador por el efecto del Mo y Co se podría explicar a través del rol importante de las enzimas implicadas en el proceso de fijación y metabolismo de nitrógeno, para el caso de molibdeno aplicado; y, en la mejora cualitativa y cuantitativa de la bacteria para la síntesis de ADN, proteínas y hemo proporcionadas por el cobalto como parte de la cobalamina (Mengel y Kirkby 2000).

En este parámetro los dos sistemas, nitrogenado y rizobial mostraron similar resultado, pero el tratamiento nitrogenado con Mo y/o Co presentaron mejor respuesta (Cuadro N° 9).

Finalmente, en el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de frijol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas significativas en cuanto al peso de 100 granos ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2). La

prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), expresó que entre los tratamientos no se presenta diferencia estadística significativa a excepción del testigo, situándolo en la última categoría.

5.6 Peso total

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 9) y en el gráfico N° 5, en el peso total, el tratamiento nitrogenado aumentó un 154 % respecto al testigo, al agregarle molibdeno dicho indicador aumentó un 269 % y adicionando cobalto al NMo el incremento fue un 226 %, es decir 43 % menos que el anterior. Al igual que en parámetros anteriores, como la altura de planta, el área foliar, el número de vainas por planta y número de granos por vaina, al agregar cobalto al tratamiento NMo, el peso total disminuyó. Dicho efecto del suministro del cobalto fue corroborado en soya (Marcondes 2005).

La inoculación de la bacteria significó un aumento de 58 % de peso total respecto al testigo, 2272.45 kg/ha; con la adición de molibdeno a la inoculación de *Rhizobium*, el parámetro se incrementó en 119 %, es decir un 61 % más y el suministro de cobalto al RhMo elevó el peso total en un 124 % más respecto al testigo. De manera similar, al inocular la bacteria aumentó el peso total en un 27.8 %; agregando molibdeno, a dosis bajas se alcanzó un incremento en un rango de 58.51 - 71.7 % y suministrando molibdeno y cobalto al tratamiento rizobial, el indicador aumento entre un 64.1 – 97.5 % (Pattanayak *et al.*, 2000).

Es así que en el tratamiento rizobial con Mo y Co es el que más se aproxima (cuantitativamente, no estadísticamente), al peso total del tratamiento sintético nitrogenado solo, lo cual podría explicarse por una mejor eficiencia del *Rhizobium* en el metabolismo del nitrógeno debido a dichos micronutrientes.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al peso total ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

En la prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), los tratamientos nitrogenados presentan mayor rango estadístico que los rizobiales, siendo el NMo superior.

5.7 Índice de cosecha

En el cuadro de promedios el índice de cosecha (Cuadro N° 9) y en el gráfico N° 6, teniendo como referente al testigo, la aplicación de nitrógeno solo incrementó el índice de cosecha en 11 % y al agregar Mo y/o Co al nitrogenado el indicador aumentó 9 %. Probablemente, no se presentó incrementos de dicho parámetro en cuestión, al agregar molibdeno y/o cobalto, por el mayor incremento en el área foliar y mayor peso de grano y así estar compensado.

Comparado los tratamientos sintéticos nitrogenados con los promedios de los tratamientos rizobiales, éstos fueron superiores en el índice de cosecha, a excepción del rizobial solo. Al agregar molibdeno al rizobial, el indicador aumentó 17 % más que el testigo y suministrando Mo y Co se incrementó un 15 %. En general, los tratamientos rizobiales, al suministrarles Mo y/o Co, en comparación con los tratamientos sintéticos nitrogenados, presentan mayor balance de fotosintatos hacia el reservorio. Además, los *Rhizobium* exportan ureidos con la proporción N/C = 4/4, mientras que las plantas con tratamientos nitrogenados sintéticos exportan amidas con la relación N/C igual a 4/6 (Gonzales *et al.*, 2006), de esta manera los *Rhizobium* requieren menor cantidad de carbono del reservorio (grano) para la síntesis de igual cantidad de nitrógeno orgánico que los fertilizados con nitrógeno sintético (Marschner 1995), pudiéndose ahorrar más carbono en el grano y así explicar el mayor índice de cosecha en los tratamientos rizobiales.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas significativas en cuanto al índice de cosecha ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

En la prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), los tratamientos sintéticos con nitrógeno no presentaron diferencia estadística significativa, tampoco entre NMoCo con Rh y entre RhMo con el RhMoCo, siendo el RhMo de mayor rango estadístico en esta comparación.

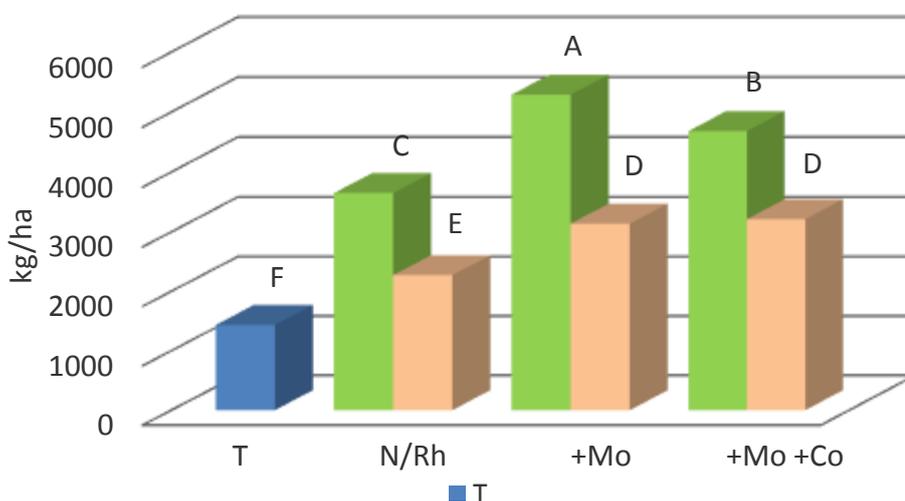


Gráfico N° 5. Efecto de la aplicación de Mo y Co en el peso total de las plantas de fríjol

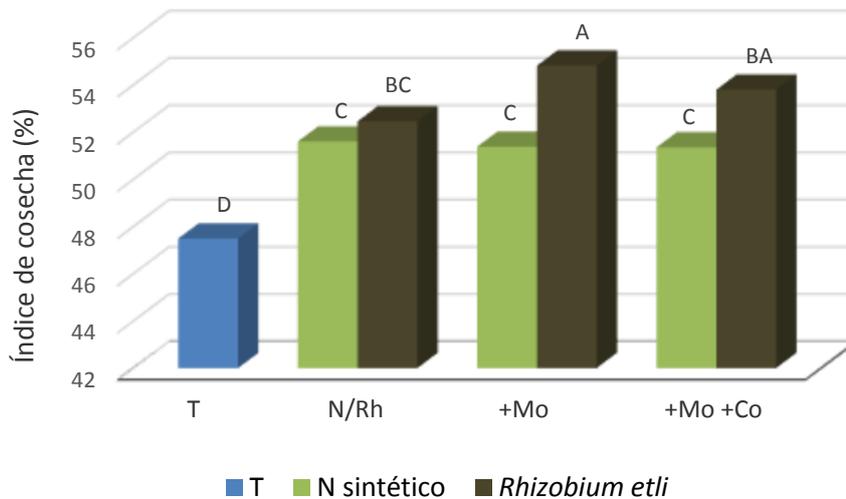


Gráfico N° 6. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el índice de cosecha de las plantas de frijol

5.8 Rendimiento

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 9), y en el gráfico N° 7, el rendimiento de los tratamientos nitrogenados son superiores a los rizobiales, a su vez éstos mayores al testigo. Teniendo el testigo de referente, 679.7 kg/ha, al suministrar nitrógeno al frijol el rendimiento aumentó en un 177 % y lo resaltante fue que al agregar molibdeno a este tratamiento nitrogenado, el rendimiento llegó a 2716 kg/ha, 300 % más ó 4 veces más respecto al testigo, el cual fue superior a todos los tratamientos. Con semejante manejo, al aplicar molibdeno y cobalto a semillas de frijol común se logró aumentar el rendimiento en 3.23 veces (Pessoa *et al.*, 2001). En otro experimento con los mismos materiales y semejante tratamiento, pero usando como fuente de nitrógeno la urea y necesariamente aplicando molibdeno vía foliar, se incrementó el rendimiento solamente un 20 %, (Fullin *et al.*, 1999) y un 18.3% (Fernandes *et al.*, 2005). Esta mayor eficiencia en la producción de granos, posiblemente se debe al mejor metabolismo de fuentes reducidas de nitrógeno, debido a la actividad de la nitrato reductasa, cuyo cofactor esencial es el molibdeno, para la reducción a nitrato (Marschner 1995).

Al agregar cobalto al tratamiento NMo, el rendimiento aumentó en un 254 %, 313.1 Kg/ha menos que el tratamiento NMo. Igual efecto se mostró al agregar cobalto (Marcondes *et al.*, 2005). Por lo que se podría argumentar que el cobalto no está implicado en el metabolismo del nitrógeno cuando se incorpora fertilizantes sintéticos nitrogenados, sino interviene como cofactor de la coenzima cobalamina en tres enzimas importantes para la fijación simbiótica de nitrógeno (Mengel y Kirkby 2000).

Cuando se inoculó *Rhizobium* a la semilla de frijol, el rendimiento aumentó en un 75 %, debido a que estas bacterias pueden fijar simbióticamente nitrógeno atmosférico a través de la enzima nitrogenasa (Sylvia *et al.*, 1998). Al agregar molibdeno a este tratamiento, el rendimiento se incrementó en un 153 % respecto al testigo y unos 527.36 kg/ha más que el tratamiento rizobial simple. Lo que podría explicarse, porque el molibdeno cumple un rol sustancial como cofactor en enzimas importantes para el metabolismo del nitrógeno y de las purinas, como son la nitrogenasa y xantina oxidasa, respectivamente (Marschner 1995). Así mismo, se incrementó un 27.8 % al inocular *Rhizobium* al frijol común y agregando molibdeno a dosis bajas se aumentó un 71.7 % (Pattanayak *et al.*, 2000).

Suministrando el cobalto al tratamiento RhMo, el rendimiento llegó a 1727.8 kg/ha, incrementándose 8.52 kg/ha respecto al tratamiento anterior y representa un 154 % de aumento respecto al testigo. En investigaciones similares, al agregar, vía foliar, cobalto y molibdeno a semillas inoculadas, se incrementó el rendimiento en 125% (Berton *et al.*, 2008) y en 130% (Juanqueira *et al.*, 1977) e incluso se aproximaron al rendimiento del tratamiento nitrogenado, tan solo con una diferencia de 90 kg/ ha. En soya inoculada con *Bradyrhizobium*, la administración de dichos microelementos vía inoculación a la semilla aumentó el rendimiento en 254 kg/ha frente a la vía foliar que condujo a un incremento de sólo 60Kg/ha (Ferris 2004).

Cabe resaltar que en este experimento, el rendimiento del tratamiento RhMoCo es cercano al tratamiento nitrogenado simple con una diferencia de 154 kg/ha. Y la adición del molibdeno al tratamiento sintético nitrogenado mostró el mejor efecto en el rendimiento.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en el rendimiento ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

Finalmente, en la prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 9), mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos a excepción de los tratamientos RhMo y RhMoCo, siendo los tratamientos sintéticos nitrogenados los que presentaron mayor jerarquía que los tratamientos rizobiales y éstos mayores al testigo, donde el tratamiento nitrogenado con molibdeno (NMo) fue superior.

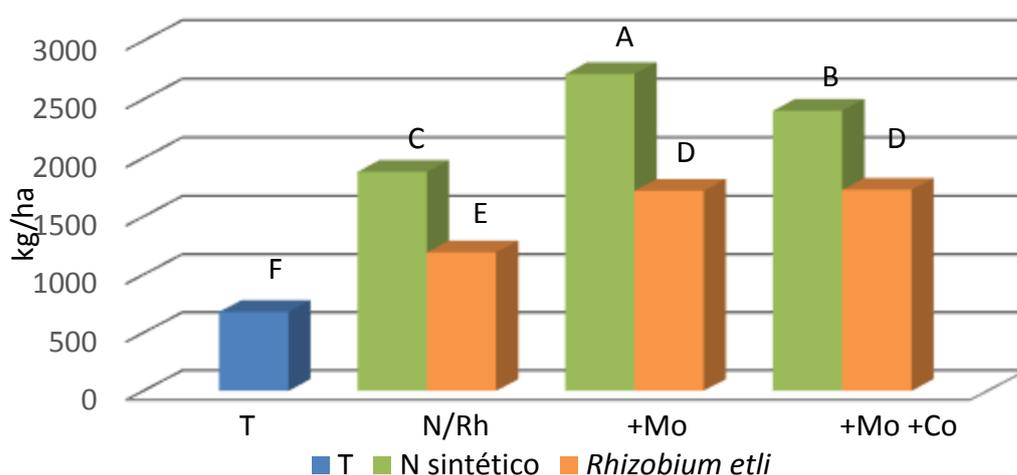


Gráfico N° 7. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el rendimiento de las plantas de fríjol

Cuadro N° 10. Promedio del efecto de la aplicación de Mo y Co de las variables de absorción de nitrógeno y nódulos de las plantas de fríjol

Tratamientos (agrupación)	Tratamientos	N° nódulos		Peso nódulos		N semilla		N rastrojo		N total	
		Unid/planta	*	mg/pl	*	g/m ²	*	g/m ²	*	g/m ²	*
Testigo	T	25.7 ^C	100	2.1 ^D	100	1.9 ^F	100	0.63 ^C	100	2.61 ^G	100
Fertilización sintética con N	N	14.7 ^D	57	2.4 ^C	124	5.6 ^C	285	1.80 ^A	287	7.44 ^C	285
	NMo	14.2 ^D	55	2.4 ^C	120	8.4 ^A	424	1.66 ^A	265	10.08 ^A	386
	NMoCo	16.5 ^{DC}	64	2.4 ^C	120	6.8 ^B	346	1.88 ^A	301	8.76 ^B	336
	Rh	40.2 ^B	156	2.3 ^{DC}	117	3.4 ^E	174	1.13 ^B	180	4.58 ^F	176
Rizobiales	RhMo	48.5 ^{BA}	188	2.7 ^B	137	4.8 ^D	242	0.96 ^B	153	5.77 ^E	221
	RhMoCo	52.2 ^A	203	2.9 ^A	147	5.1 ^{DC}	258	1.15 ^B	183	6.26 ^D	240

Los valores mostrados son promedio de cuatro repeticiones. Los valores dentro de la columna y con la misma letra no son significativamente diferentes para la prueba HSD de Tukey. Los valores en la columna del asterisco (*), son variaciones porcentuales, respecto al testigo.

5.9 Número de nódulos por planta

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 10) y en el gráfico N° 8, se observa que los tratamientos rizobiales presentan mayor promedio de nódulos por planta que el testigo y en promedio el triple de los nitrogenados, y éstos menores que el testigo, resaltando el tratamiento *RhMoCo* de mayor promedio de todo el ensayo, 52.25 nódulos por planta.

Antes de instalar el ensayo, el campo había sido sembrado con fríjol inoculado con *Rhizobium etli*, es por eso que se debe su presencia de nódulos en el testigo. Sin embargo, al suministrar nitrógeno su presencia disminuye notablemente, debido a la competencia por fotosintatos entre los reservorios y por la inhibición directa, pudiendo conducir a una alta competencia por equivalentes reducidos y malato, toxicidad de nitrito y deficiencia de oxígeno (Marschner 1995).

Al suministrar Mo al tratamiento rizobial simple, aumentó el número de nódulos en 88 %, lo cual se podría explicar por la alta importancia del molibdeno en las leguminosas dependientes de la fijación simbiótica de nitrógeno, por ser un importante cofactor del complejo nitrogenasa y xantina oxidasa, para la fijación de nitrógeno y el metabolismo de las purinas, respectivamente (Mengel y Kirkby 2000). De modo similar, al aplicar dos dosis de molibdeno en la semilla de fríjol lactao inoculado (Mo: 6.4 y 12.8 g/80Kg

semilla), se incrementó el número de nódulos en un rango de 122 - 144% (Pattanayak *et al.*, 2000). Sin embargo, al aplicar molibdeno a la soya en suelos ácidos, no influyó significativamente en el incremento del número de nódulos, ya sea aplicado solo o en combinación con cal (Tenywa 1997).

La aplicación de cobalto al tratamiento rizobial con molibdeno, aumentó aún más el número de nódulos, en 103 %, observándose una cierta sinergia del cobalto con el molibdeno, donde aquél, como cofactor, principalmente de las enzimas metionina sintasa y ribonucleótido reductasa, participan en la síntesis de proteínas y en la de ADN, respectivamente.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al número de nódulos por planta m² ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación HSD de Tukey (Cuadro N° 10), arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en los tratamientos nitrogenados no hubo diferencia estadística entre sí. En los tratamientos rizobiales no hubo diferencia estadística entre el individual con el que tiene Mo, mostrando al RhMoCo con mayor jerarquía (Mengel y Kirkby 2000). De modo similar, al aplicar las diferentes combinaciones de las dosis de molibdeno y cobalto en semilla de fríjol Lactao inoculado (Mo: 6.4 y 12.8 g/80Kg semilla y Co: 0.64 y 1.28 g/80kg semilla), se incrementó el número de nódulos en un rango de 144 – 177 %, de igual manera se mostró sinergia entre la dosis más alta de Mo con la dosis más baja de Co (Pattanayak *et al.*, 2000).

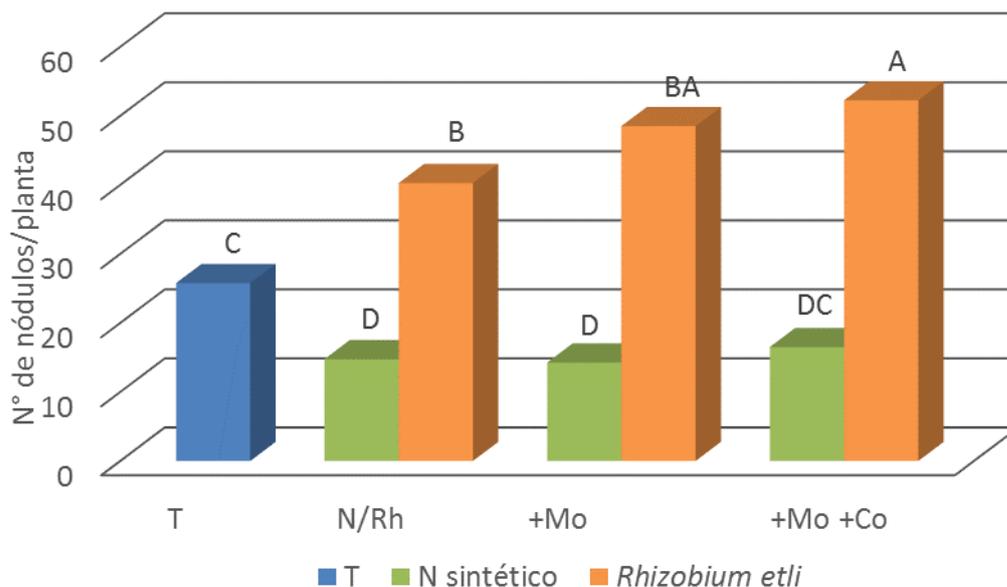


Gráfico N° 8. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el número de nódulos por planta de frijol

5.10 Peso de los nódulos

En el cuadro de promedios, el peso de los nódulos (Cuadro N° 10) y en el gráfico N° 9, los tratamientos nitrogenados con o sin Mo y /o cobalto aumentó el peso de los nódulos entre un 20 – 24 %, no habiendo diferencia estadística entre ellos.

Al inocular el *Rhizobium etli* a la semilla el peso de los nódulos se incrementó en un 17 % respecto al testigo y lo resaltante fue que al incorporar Mo al tratamiento rizobial, se incrementó en un 37.4 % y al suministrar Co al RhMo aumentó un 47 %, encontrándose complementariedad o sinergia entre dichos micronutrientes.

De manera similar, en frijol Lactao, al agregar Mo, el peso del nódulo acrecentó en un rango de 17.5 – 23.9 %. Incorporando Co a este tratamiento (RhMo) el indicador en cuestión aumentó en 20 – 33.4 %, mostrándose igualmente un efecto de complementariedad del Mo y Co en la respuesta de este parámetro (Pattanayak *et al.*, 2000). Sin embargo, el Mo y Co suministrado en soya inoculado con *Bradyrhizobium*, el

Mo y Co no mostraron complementariedad y tuvieron mejor comportamiento en el peso del nódulo, en forma individual. (Mohandas 1985).

La explicación que se podría argumentar es que al adicionar el molibdeno a semillas inoculadas con *Rhizobium*, se favoreció el desempeño de la enzima nitrogenasa y xantina oxidasa. La primera, encargada de descomponer el nitrógeno de la atmósfera, rompiendo el triple enlace del dinitrógeno atmosférico (Gassen 2002), donde el primer paso es la protonización del Mo para atrapar el N₂. Y la segunda enzima, fomenta el catabolismo de las purinas, o mejor dicho del nitrógeno, a ureídos (Marschner 1995). Pero, las enzimas que más destacan en términos cuantitativos y cualitativos de los nódulos de la planta son aquellas que tienen como cofactor a la cobalamina, la cual es dependiente del Co (Marschner 1995 y Mengel *et al.*, 2000).

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de frijón Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas significativas en el peso de nódulos ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de HSD de Tukey (Cuadro N° 10), mostró que el tratamiento RhMoCo fue estadísticamente superior a los demás tratamientos, seguido por RhMo. Ante esta prueba, todos los tratamientos sintéticos nitrogenados junto con el rizobial solo, no mostraron diferencia estadística significativa.

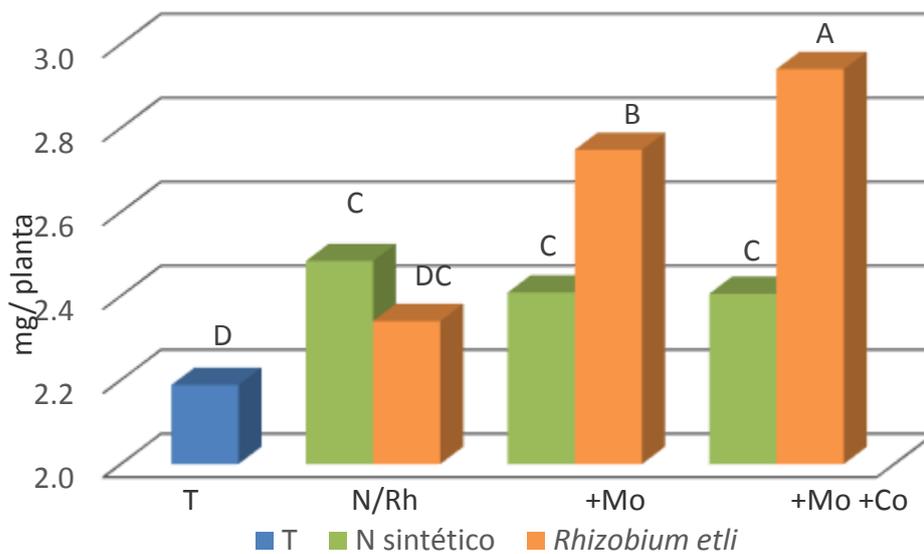


Gráfico N° 9. Efecto de la aplicación de Mo y Co en el peso de nódulos por planta de fríjol

5.11 Nitrógeno en la semilla

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 10) y gráfico N° 10, se puede observar que todos los tratamientos sintéticos nitrogenados son superiores a los rizobiales y éstos mayores al testigo, destacándose el tratamiento nitrogenado con Mo (NMo) con el valor más alto, 8.43 g N/m².

La aplicación de nitrógeno condujo a un incremento en la cantidad de nitrógeno en el principal reservorio de la planta de fríjol, la semilla, un 185 % más respecto al testigo. Pero lo más resaltante fue que al adicionar molibdeno a dicho tratamiento, se incrementó drásticamente el tenor de nitrógeno en 324 % respecto al testigo, es decir, hubo más eficiencia de absorción del nitrógeno, en la cual la enzima nitrato reductasa juega un rol importantísimo, por ser el molibdeno un cofactor esencial de esta enzima, reduciendo el nitrato a nitrito e involucrando a dos electrones (Marschner 1995),

pudiéndose explicar que la actividad enzimática aumentó dieciséis veces más al agregar 80g Mo/ha al cultivo de soya fertilizado con 60 Kg N/ha, comparado con el testigo (Pessoa *et al.*, 2001). De igual manera, se logró incrementar logarítmicamente la actividad de la nitrato reductasa al suministrar 5 µg Mo por planta de trigo frente al testigo (Marschner 1995). Pero, teniendo en cuenta la fuente de nitrógeno, como la urea, el uso del molibdeno sería innecesario, por lo que al agregar 20 g Mo/ha a un cultivo de frijol común, el aumento del contenido de nitrógeno en la semilla no fue estadísticamente significativo, 8 % más (Fullin *et al.*, 1999).

Adicionando cobalto al tratamiento NMo no se logró superar la concentración de nitrógeno en la semilla comparado con el tratamiento NMo, aumentó un 246 % respecto al testigo, lo cual se podría deber al incremento del número de nódulos.

El inocular *Rhizobium etli* a las semillas de frijol, el contenido de nitrógeno en la semilla aumentó un 74 %, mientras que al agregar Mo a dicho tratamiento la absorción aumentó en un 142 %, esta mayor eficiencia podría ser explicado por una mejor desempeño o actividad de las enzimas nitrogenasa y xantina oxidasa, en la reducción del dinitrógeno y catabolismo de las purinas, respectivamente (Marschner 1995). Mientras que al suministra cobalto al frijol tratado con *Rhizobium* y molibdeno, el contenido de nitrógeno aumentó en 156 %, aumentando aún más la absorción de nitrógeno en la semilla. De manera semejante, en el cultivo de frijol “Lactao”, se pudo incrementar la eficiencia de absorción de nitrógeno entre un 73 – 75% con la aplicación de molibdeno con el inoculo y se aumentó aún más al agregar a éste cobalto, en un 73 – 90 %, teniendo en cuenta que se usaron dosis muy bajas de estos micronutrientes (Fullin *et al.*, 1999). Sin embargo, el incremento de dicho parámetro se vio favorecido en la aplicación individual de dichos micronutrientes y no en forma conjunta (Mohandas 1985).

Cabe resaltar que se presenta semejante absorción de nitrógeno en la semilla de fríjol entre el tratamiento nitrogenado simple y el RhMoCo.

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto a la cantidad de nitrógeno de la semilla por m² ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

En la prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 10), arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, pero no mostraron diferencia estadística significativa entre el tratamiento nitrogenado solo con el rizobial–Mo-Co, igualmente entre los rizobiales de Mo con Mo-Co.

5.12 Nitrógeno en el rastrojo

En el cuadro de promedios (Cuadro N° 10) y el gráfico N° 11 se puede distinguir que los promedios de los tratamientos nitrogenados muestran mayor absorción de nitrógeno en el rastrojo comparado con los tratamientos rizobiales.

La aplicación de nitrógeno incrementó el contenido de éste en el rastrojo en un 187 % respecto al testigo, sin embargo al agregar molibdeno al tratamiento nitrogenado aumentó 165 %, esta disminución podría explicarse por un mayor aumento o derivación del nitrógeno a la semilla, reservorio principal de la planta. Pero, al adicionar cobalto al tratamiento NMo, el contenido de nitrógeno fue superior al nitrogenado simple y al NMo, llegando a un 201 % más respecto al testigo.

Al inocular *Rhizobium* a la semilla de fríjol, aumentó la absorción de nitrógeno en el rastrojo en un 80 % respecto al testigo. Al igual que el tratamiento nitrogenado, al agregar molibdeno, el contenido de nitrógeno en el rastrojo aumentó un 53 %, menor que el tratamiento RhMo. Sin embargo, al agregar molibdeno al fríjol común inoculado

aumentó la absorción de nitrógeno en 1.5 %, pero a la vez se dio mayor incremento en la semilla (Pattanayak et al., 2000), es decir se incrementó en los dos reservorios.

Al suministrar cobalto a las semillas inoculadas con *Rhizobium* y molibdeno, el contenido de absorción de nitrógeno en las semillas aumentó en 83 %, es decir que resultó más eficiente ante el tratamiento RhMo. Lo cual nos da a entender que el cobalto desempeña un papel importante a través de las enzimas metionina sintasa, ribonucleótido reductasa y metilmalonil coenzima A mutasa, participando en la síntesis de proteínas, ADN y hemo, respectivamente (Mengel y Kirkby 2000).

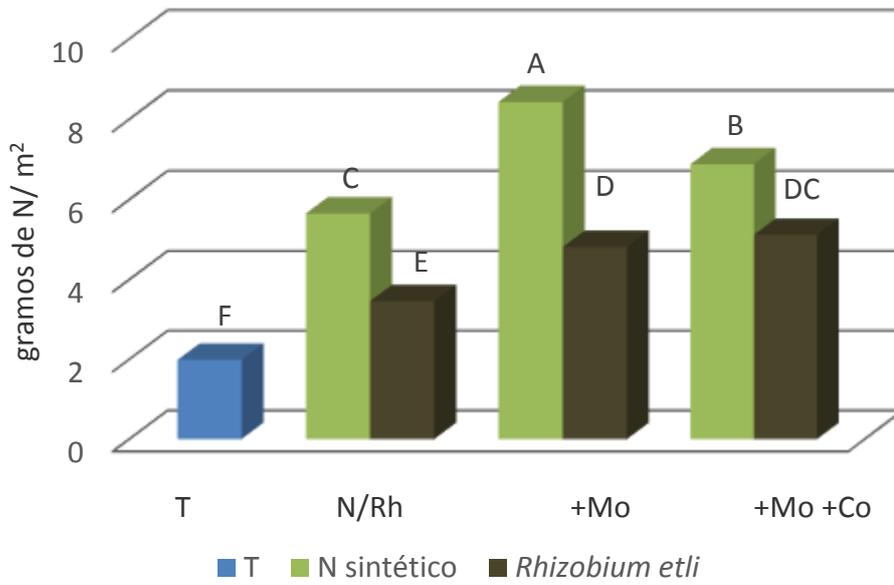


Gráfico N° 10. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno de la semilla de la planta de fríjol

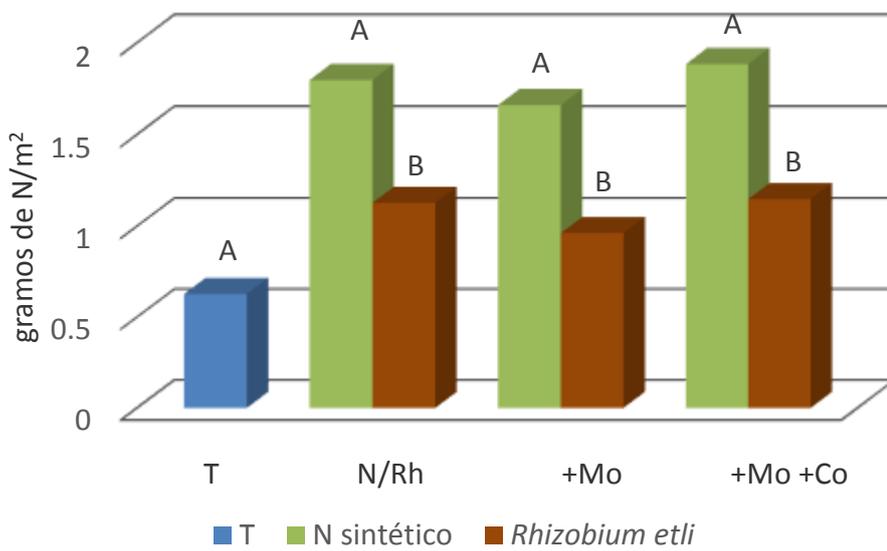


Gráfico N° 11. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno del rastrojo de la planta de fríjol

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto al contenido de nitrógeno en el rastrojo ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 10) mostró tres agrupaciones, sin diferencia estadística entre los nitrogenados, de igual modo para los rizobiales y como última agrupación individual muestra al testigo. Siendo los nitrogenados los de mayor jerarquía que los rizobiales y éstos superiores al testigo.

5.13 Nitrógeno total

En el cuadro de promedios de nitrógeno total (Cuadro N° 10) y en la gráfica N° 12 se observa que todos los tratamientos nitrogenados sintéticos presentan mayor valor cuantitativo y estadístico que los rizobiales.

Los tratamientos nitrogenados y rizobiales muestran mayor concentración de nitrógeno a partir del suministro de molibdeno y solamente se aprecia un efecto complementario al agregar cobalto en el tratamiento rizobial con molibdeno (RhMo).

En los tratamientos sintéticos nitrogenados, el nitrogenado solo, aumentó el contenido de nitrógeno total en 185.1 % respecto al testigo. Al agregar molibdeno al tratamiento anterior, incrementó el contenido de dicho parámetro en 286.2 %, aumentando 101 % más respecto al nitrógeno solo y resaltando la mayor absorción de N en las semillas que en la parte aérea. La mayor eficiencia de absorción de N al suministrar Mo podría explicarse por la mejor actividad de la enzima nitrato reductasa para el metabolismo del nitrato, en la cual los electrones son transferidos directamente desde el molibdeno al nitrato, convirtiéndose en nitrito para que luego éste sea convertido en otros compuestos aminados en el metabolismo de la planta (Marschner 1995). Sin embargo, no en todos

los cultivares de frijoles comunes ocurre lo mismo, la aplicación de Mo a los tratamientos sintéticos nitrogenados, incrementó la concentración de N en el cultivar “Pérola”, pero no en el cultivar “IAC carioca” (Fernandes *et al.*, 2005), tampoco, utilizando cualquier fuente de nitrógeno, como la urea, no se logró aumentar la concentración de N en fríjol común al suministrar Mo (Fullin *et al.*, 1999).

En este experimento al agregar cobalto al tratamiento nitrogenado con molibdeno, la absorción de N aumentó en 235 %, disminuyó un 51 % respecto al tratamiento NMo, anulando la posibilidad de una complementariedad con el Mo (Cuadro N° 9), pero cabe remarcar que aún presenta mayor tenor de N que el tratamiento nitrogenado simple, en un 50 % más, tal vez pudiéndose explicar por un mayor incremento en el número de nódulos, lo cual representa otro reservorio de la planta.

En los tratamientos rizobiales, este inóculo solo, incrementó el contenido de N total en 75.5 % respecto al testigo, menos de la mitad del efecto mostrado en el tratamiento nitrogenado simple. Al agregar molibdeno a dicho tratamiento, se incrementó el contenido de N total en 121 % y al suministrar cobalto al tratamiento rizobial con Mo mostró un efecto sinérgico en la absorción de N aumentando en un 139.8 % (Cuadro N° 10). La mayor eficiencia de absorción de N, al aplicar Mo al tratamiento rizobial, puede sustentarse en que este microelemento es parte esencial de varias enzimas de bacterias fijadoras de nitrógeno, fortaleciéndose este proceso. La nitrogenasa descompone el nitrógeno de la atmósfera, rompiendo el triple enlace iónico entre los dos átomos de N (Sylvia *et al.*, 1999), donde el primer paso es la protonización del Mo para atrapar el N₂ y lo reduce a amonio (Marschner 1995).

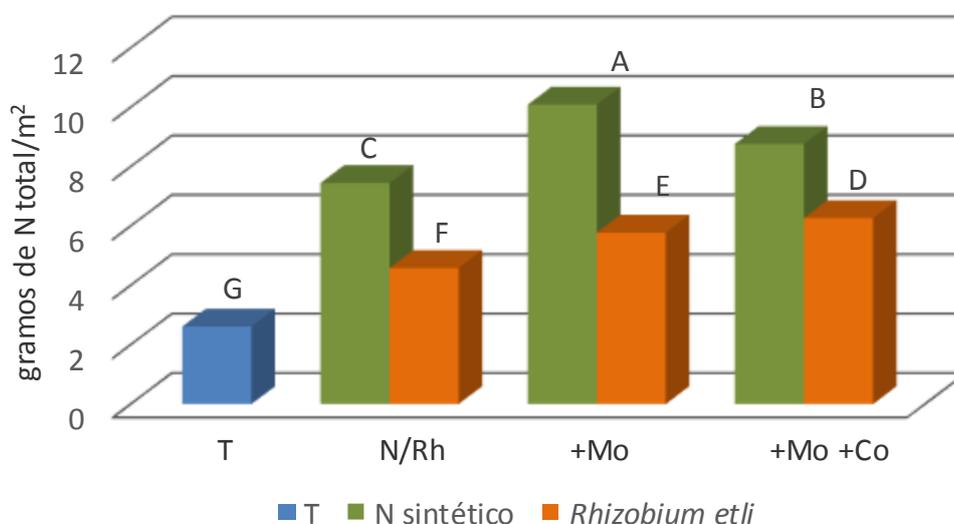


Gráfico N° 12. Efecto de la aplicación del Mo y Co en el contenido de nitrógeno total de la planta de fríjol

Es así que al aplicar 80g de Mo/ha foliarmente en un cultivo de fríjol común cv “Ouro Negro” inoculado con *Rhizobium*, con 20 kg N/ha de fondo, se pudo incrementar 16 veces la actividad de la nitrato reductasa, comparado con las plantas que no recibieron Mo (Pessoa *et al.*, 2001). De modo semejante, al agregar Mo (6.4 y 12.8 g/80 kg de semilla), a semillas de fríjol lacteo “Puri local” inoculadas con *Rhizobium*, la absorción de N total aumentó en un 24.9 % con la dosis más baja y 77.5 % con la dosis más alta. Mientras que con la aplicación de Co (1.28 y 0.64 g/80 kg de semilla), a las semillas inoculadas con *Rhizobium*, aumentó la absorción de N en un 78 % y 70.5 %, con la dosis baja y alta, respectivamente. También, se observó un aumento sinérgico en la absorción de N en todas las combinaciones de *Rhizobium*, Mo y Co, siendo la más eficiente, la rizobial con la máxima dosis de Mo y la mínima de Co, en 112 % más respecto al testigo (Pattanayak *et al.*, 2000). En otro experimento semejante, pero en soya inoculada con *Bradyrhizobium*, los microelementos en cuestión funcionaron mejor, en forma individual, en la fijación de N, sin mostrar efecto sinérgico al ser aplicados en

forma conjunta (Mohandas 1985). La acción del cobalto al ser un componente metálico de las enzimas metionina sintasa, ribonucleótido reductasa y metilmalonil coenzima A mutasa, genera mayor eficiencia en la fijación del nitrógeno de plantas leguminosas inoculadas al mejorar las propiedades cualitativas y cuantitativas del *Rhizobium*, sintetizando proteínas, ADN y porfirinas de hierro, respectivamente (Marschner 1995). Finalmente, podemos decir que los tratamientos rizobiales tratados con molibdeno, con y sin cobalto presentan semejante tenor en la cantidad de nitrógeno total absorbido al tratamiento nitrogenado simple, pero los tratamientos sintéticos nitrogenados con la adición de molibdeno y/o cobalto prácticamente duplicaron el contenido de N total comparado con los tratamientos rizobiales con Mo y/o cobalto (Cuadro N° 10).

En el análisis de variancia, el efecto de la aplicación de Mo y Co a las semillas de fríjol Canario Centenario, con y sin inoculación, mostró diferencias estadísticas altamente significativas en cuanto a la cantidad de nitrógeno total de la planta por m² ($\alpha = 0.05$) (Anexo N° 2).

La prueba de comparación de Tukey (Cuadro N° 10) arrojó diferencias estadísticamente significativas entre todos los promedios de los tratamientos.

VI. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se condujo el experimento se llegó a las siguientes conclusiones:

1.- La aplicación de molibdeno en los tratamientos sintéticos nitrogenados y rizobiales mostró un incremento sobre la absorción de nitrógeno, parámetros biométricos y componentes de rendimiento del fríjol Canario Centenario, siendo superior los tratamientos nitrogenados en comparación con los rizobiales, a excepción del número de nódulos y peso de éstos.

2.- El efecto de la aplicación de cobalto aplicado conjuntamente con el molibdeno mostró un efecto significativo en los tratamientos rizobiales, solamente en el número de nódulos, peso de nódulos y en la absorción de nitrógeno; y en todos los tratamientos sintéticos nitrogenados la adición de cobalto al tratamiento nitrogenado con molibdeno disminuyó todas las variables en estudio.

3.- La aplicación de molibdeno a la semilla de fríjol Canario Centenario condujo a buenos resultados, aún en suelos calcáreos de tendencia alcalina en la costa.

4.- La aplicación de molibdeno en el tratamiento rizobial con o sin cobalto, bajo un sistema de cero labranza en la costa central, presentó un rendimiento más cercano al tratamiento nitrogenado simple con un rendimiento menor a éste por 154 kg/ha.

VII. RECOMENDACIONES

1. Conocer la concentración de molibdeno y cobalto en el suelo que se siembra para adecuar la nutrición de estos microelementos.
2. Realizar la aplicación de cobalto a las semillas de fríjol Canario Centenario inoculado con *Rhizobium*, debido a la alta importancia de dicho micronutriente en el desarrollo y crecimiento del nódulo, más aun en suelos de pH alcalino por la disminución de la disponibilidad de dicho micronutriente en este pH.
3. Comparar la aplicación de molibdeno y/o cobalto vía foliar e inoculado a la semilla de fríjol Canario Centenario en suelos alcalinos y ácidos.
4. Analizar la dosis óptima de molibdeno en la fertilización nitrogenada tradicional debido al costo relativamente alto del micronutriente y explorar fuentes disponibles.
5. Aplicar molibdeno a la dosis de 200 g/80 kg de semilla en el cultivo de fríjol Canario Centenario, fertilizadas tradicionalmente con nitrato de amonio o con inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno, incrementa el rendimiento en más de 500 kg /ha.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, A., Peres R., Itamar, R. 2008. Aplicação foliar de molibdênio, produtividade e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro irrigado. *Bragantia*, Campinas, 67 (2): 377-384
- Berton, F., Pires, C., Medeiros C y Klauberg O. 2008. Effect of inoculation associated to leaf sprayed Co+Mo on the yield and grain nutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51 (6): 1089-1096
- Corrêa, V., Junqueira-Neto, A.; Rezende, M., Andrade, L. (1990), Efeitos de *Rhizobium* molibdênio e cobalto sobre o feijoeiro comum cv. Carioca. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 25(4): 513-519.
- Campo, R., Albino, R., y Hungria, M. 1999. Métodos de aplicação de micronutrientes na nodulação e na fixação biológica de N₂ em soja. Londrina: *EMBRAPA-CNPSO*. (Documento Técnico 19). 7 pp
- Dechen, A., Haag, H. y Carmello, Q. 1991. Função de micronutrientes nas plantas. *In Micronutrientes na Agricultura. Associação Brasileira Para Pesquisa da Potassa e do Fosfato*. Piracicaba. 65-78.
- Fernández F, Orivaldo Arf1, Ferreira F, Romanini , Ferreira. 2005. Molibdênio foliar e nitrogênio em feijoeiro cultivado no sistema plantio direto. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, 27 (1) 7-15.
- Fullin E, Bauchour M, Lani J, Furtado de Mendonça, N. 1999. Nitrogênio e molibdênio na adubação do feijoeiro irrigado. *Pesquisa agropecuaria brasileira Brasília*, 34 (7)1145-1149.

Ferris, G. y Couretot, L. 2004. Evaluación de la inoculación y de diferentes dosis de cobalto y molibdeno como tratamiento de semillas o foliar en soja de primera. *Desarrollo Rural INTA Pergamino- Santa Fe*.

Gassen, D. 2002. *Informativos técnicos COOPLANTIO*. Passo Fundo RS - Brasil

Gad, N. 2006. Increasing the Efficiency of Nitrogen Fertilization Through Cobalt Application to Pea Plant. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(6): 433-442

Gonzales, G, los de Reyes M. y Siu T. 2002. Molybdenum as Component for N₂-Fixation and Yield Enhancement in Bean Varieties. *Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. 38 (VI): 334.

González, E., Gálvez, L., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, L., y Arrese-Igor C. 2006. Metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos en la fijación de nitrógeno. *Fundamentos y Aplicaciones. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno*.

Havlin, J., Beaton, J., Tisdale, S., and Nelson, W. 1999. Soil Fertility and Fertilizers An Introduction to Nutrient Management.

Junqueira Netto, A., Santos, O., Adair, H. y Vieira, C. 1977. Ensaios preliminares sobre a aplicação de molibdênio e cobalto na cultura do Feijoo (*Phaseolus vulgaris L.*). *Revista Ceres*, 24(136): 628-633.

Marcondes, A., Caires E. 2005. Aplicação de molibdênio e cobalto na semente para cultivo da soja. *Bragantia*, Campinas 64 (4): 687-694

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. San Diego, CA – USA

Mengel, K. y Kirkby, E. 2000. Principios de Nutrición Vegetal.

Mohandas, S. 1985. Effect of presowing seed treatment with molybdenum and cobalt on growth, nitrogen and yield in bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Plant and Soil* 86, 283 - 285

PattanayaK S.K., Dash D., Jena M.K. and Kayak R.K. 2000. Seed treatment of green gram with molybdenum and cobalt. Effect on nodulation, biomass production and N uptake in an acid soil. *Journal of the Indian Society of Soil Science*. 48 (4): 769 – 773.

Pessoa, S., Ribeiro, C., Chagas, M. y Cassini A. 2001. Atividades de nitrogenase e redutase de nitrato e produtividade do feijoeiro “ouro negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio.. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 25 (1): 217-224

Rodríguez F. 1982. Fertilizantes Nutrición Vegetal.

SAS Institute Inc. 2008. SAS/STATUser’s Guide. Ver.9.1. Cary, NC.SAS Institute.

Sylvia, D., Furhmann J., Hartel P. y Zuberer D. 1998. Principles and Applications of Soil Microbiology. New Jersey - USA

Tenywa, S. 1997. Influence of molybdenum and cobalt fertilisation on symbiotic nitrogen fixation indicators in an oxisol in Uganda. *African Crop Science Journal*. 5: 87-92

Tisdale, S. y Nelson, W. 1970 . Fertilidad de Suelos y Fertilizantes.

X. ANEXOS

ANEXO N°1. Cronograma del cultivo

Actividad	Agosto				Setiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Preparación de terreno																												
Aplicación de herbicida	x																											
Aplicación de rastrojo	x																											
1º riego	x		x																									
2º riego				x																								
3º riego																												
Siembra					x																							
Germinación						x																						
Evaluación – área foliar													x															
Evaluación – peso fresco													x															
1º fertilización								x																				
1º riego ligero								x																				
Control fitosanitario																												
“Tizón del halo”									x																			
“Gusanos de tierra”								x																				
“Mosca minadora”										x																		
“Comedor de hoja”											x																	
“Caracol”											x																	
“Pegador de brotes”																x												
“Gusano barrenador”																												
2º fertilización													x															
2º riego ligero													x															
Evaluación -vaina/planta																							x					
Evaluación – grano/vaina																							x					
Control de malezas									x																			
1º riego pesado													x															
Cosecha																								x				
Evaluación – 100granos																											x	
Evaluación – rendimiento																											x	
Evaluación – IC																											x	

**ANEXO N° 2: Análisis de varianza (ANVA) para los parámetros biométricos,
componentes de rendimiento, nodulación y absorción de N del frijón Canario Centenario**

ANVA – ALTURA DE PLANTA (cm)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	1613.35	268.89	40.98	< 0.0001	***
Bloq	4	8.8	2.2	0.34	0.8514	ns
Error	24	157.48	6.56			
Total	34	1779.64				
Promedio = 62.22						
CV (%)= 4.12						

ANVA - ÁREA FOLIAR (dm²)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	44969552	7494925	229.87	< 0.0001	***
Bloq	4	274758.7	68689.7	2.11	0.1113	*
Error	24	782505.7	32604.4			
Total	34	46026817				
Promedio = 3181.914						
CV (%)= 5.67						

ANVA – N° VAINAS POR PLANTA

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	1812.738	302.123	76.12	< 0.0001	***
Bloq	4	13.14	3.285	0.83	0.1113	*
Error	24	95.256	3.969			
Total	34	1921.134				
Promedio = 17.714						
CV (%)= 11.24						

ANVA – NÚMERO DE GRANOS POR VAINA

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	11.94	1.99	12.67	< 0.0001	***
Bloq	4	1.028	0.257	1.64	0.1977	*
Error	24	3.77	0.1571			
Total	34	16.74				
Promedio = 4.09						
CV (%)= 9.70						

ANVA – PESO DE 100 GRANOS (g)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	15.4	2.56	12.77	< 0.0001	***
Bloq	4	0.3798	0.09495	0.47	0.7555	ns
Error	24	4.8238	0.2			
Total	34	20.6				
Promedio = 41.56						
CV (%)= 1.07						

ANVA – PESO TOTAL (RASTROJO Y SEMILLAS, kg/ha)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	385.9	96.48	0.02	0.999	ns
Bloq	4	52507566	8751261	2005.59	< 0.0001	***
Error	24	104722.3	4363.43			
Total	34	52612674				
Promedio = 3381.6						
CV (%)= 1.95						

ANVA – ÍNDICE DE COSECHA (%)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	162.49	27.08	25.78	< 0.0001	***
Bloq	4	1.3013	0.325	0.31	0.8686	ns
Error	24	25.21	1.05			
Total	34	189.01				
Promedio = 51.83						
CV (%)= 1.97						

ANVA – RENDIMIENTO (kg/ha)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	14172511	2362085.12	8473.89	< 0.0001	***
Bloq	4	499.03	124.76	0.45	0.7731	ns
Error	24	6689.97	278.75			
Total	34	14179700				
Promedio = 1759.943						
CV (%)= 0.95						

ANVA - NÚMERO DE NÓDULOS /PLANTA

FV	GL	Cmed	SC	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	1081.72	6490.35	62.08	0.0001	***
Bloq	3	8.035	24.1	0.46	0.7128	ns
Error	18	17.42	313.64			
Total	27		6828.1			
Promedio = 30.32						
CV (%)= 13.76						

ANVA - PESO DE NÓDULOS /PLANTA (mg/planta)

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	1.5839	0.2639	46.5	0.0001	***
Bloq	3	0.006	0.002	0.35	0.788	ns
Error	18	0.1022	0.0056			
Total	27	1.6921				
Promedio = 2.5						
CV (%)= 3.01						

ANVA - GRAMOS DE N /m² - SEMILLA

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	107.86	17.97	239.69	0.0001	***
Bloq	3	0.431	0.143	1.92	0.1632	*
Error	18	1.35	0.075			
Total	27	109.64				
Promedio = 5.19						
CV (%)= 5.27						

ANVA - GRAMOS DE N /m² - RASTROJO

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	5.34	0.89	54.18	0.0001	***
Bloq	3	0.1115	0.37	2.26	0.116	*
Error	18	0.2958	0.016			
Total	27	5.75				
Promedio = 1.31						
CV (%)= 9.75						

ANVA - GRAMOS DE N /m² - TOTAL

FV	GL	SC	Cmed	Valor de F	Pr > F	Nivel de significancia
Trat	6	153	25.5	634.71	0.0001	***
Bloq	3	0.775	0.258	6.43	0.0038	*
Error	18	0.7231	0.04017			
Total	27	154.5				
Promedio = 6.5						
CV (%)= 3.08						

ns : no significativo

*** : altamente significativo