

Principios y Prácticas para la Conducción de Ensayos sobre Fijación de Nitrógeno en Condiciones de Campo

Juan Carlos Rosas y
Fredrick A. Bliss *

El presente trabajo tiene como objetivo el de delinear algunos principios y prácticas a ser considerados en la conducción de ensayos de campo en donde se quieren evaluar la efectividad simbiótica de plantas hospederas y cepas de *Rhizobium*. Su aplicación ha de variar, obviamente, con la especie leguminosa, las condiciones en que se esté trabajando y el tipo de ensayo.

Como un ejemplo de la importancia sobre el uso de técnicas y métodos eficientes en ensayos de campo me gustaría mencionar el siguiente ejemplo. El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido frecuentemente considerado como una especie pobre en el establecimiento de una simbiosis efectiva y en sus niveles de fijación de nitrógeno atmosférico (N₂); sin embargo, varios resultados obtenidos usando las técnicas de reducción de acetileno y de isotopos de ¹⁵N han demostrado que el frijol cultivado posee un potencial de fijación comparable al de otras leguminosas de grano (Graham, 1981; Rennie y Kemp, 1983; Rushel et al., 1982; Westermann et al., 1981). Además, se ha demostrado que usando la variabilidad genética existente ha sido posible aumentar la capacidad de fijación de N₂ en cultivares comerciales de frijol, mediante la aplicación de métodos de mejoramiento y criterios de selección apropiados (Bliss, 1984; McFerson et al., 1982). Estos resultados rechazan lo reportado anteriormente en relación a la pobre capacidad de frijol, y sugieren que estos resultados se debieron al uso de cultivares de fri-

* Fitomejoradores, Department of Horticulture, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, U.S.A. Dirección actual de J. C. Rosas: Escuela Agrícola Panamericana, Apartado 93, Tegucigalpa, Honduras.

jol y/o cepas de *R. phaseoli* pobres en su habilidad para fijar N_2 , y condiciones adversas y/o métodos inadecuados para estimar la capacidad de fijación.

Como recomendación inicial me gustaría indicar que se debe tener en cuenta que la mayoría de los estudios con *Rhizobium* a nivel de campo han de estar íntimamente relacionados con aspectos que afectan el crecimiento de las plantas hospederas (suelo, fisiología de la planta, aspectos agronómicos, etc.), y que consultar o mejor aún tratar de trabajar en colaboración con especialistas de otras disciplinas ayudará a aumentar las posibilidades de obtener resultados de mayor valor científico y aplicación práctica.

IMPORTANCIA DE LOS ENSAYOS DE CAMPO

Las pruebas de la asociación leguminosa hospedera/cepa *Rhizobium* en el campo es el paso final, y esencial, en programas diseñados para evaluar la capacidad de fijación de N_2 . Los experimentos conducidos en cuartos de crecimiento e invernadero son valiosos para la estimación preliminar de las características simbióticas, pero por más sofisticados que estos puedan ser no pueden llegar a simular la complejidad del ambiente del suelo (Brockwell et al., 1982). Tampoco el uso de suelo en potes en experimentos de invernadero es una solución satisfactoria; ya que el suelo es perturbado en el transporte desde el campo a los potes, lo cual invariablemente conduce a cambios substanciales en su estado microbiológico y nutricional (Sylvester-Bradley et al., 1983).

Las pruebas de campo son extremadamente importantes, según Vincent (1970), por lo siguiente:

1. Una mayor diferenciación puede ser obtenida como resultado de una nodulación efectiva. Esto depende, por supuesto, de la influencia de la disponibilidad de N en el suelo, y hasta que punto las cepas efectivas de rizobios presentes en el suelo podrían confundir los resultados.
2. La asociación entre bacteria y hospedero son probadas en una situación natural y compleja. Esta compleja situación incluye: las condiciones de acidez y humedad del suelo que afecta la supervivencia y multiplicación del rizo-

bio; residuos vegetales tóxicos al rizobio; el antagonismo microbiano que puede prevenir la multiplicación del inóculo en la rizósfera; la concentración de iones de calcio que puede limitar la infección de las raíces de las leguminosas; la competencia del rizobio nativo con el inoculado en la formación de nódulos y/o el establecimiento de la fijación de nitrógeno y las deficiencias en nutrientes minerales que interfieren con el funcionamiento de los nódulos. Los resultados que se obtienen en condiciones de campo, particularmente si estos son representativos de aquellos donde se cultiva la especie de leguminosa en evaluación, tendrán un significado más práctico que aquellos resultados obtenidos en condiciones arbitrarias y generalmente favorables.

ASPECTOS RELACIONADOS A LOS ENSAYOS DE CAMPO

VARIABILIDAD (heterogeneidad) DEL SUELO

La variabilidad del suelo se refiere a la falta de uniformidad del suelo de una parte a otra del campo. Este es el mayor contribuyente al error existente en ensayos de campo. La variabilidad del suelo puede *evitarse* de las siguientes maneras:

1. Evitando áreas que han sido previamente usadas en experimentos con tratamientos que pueden tener un efecto diferencial en las condiciones del suelo, p.e. fertilizantes, variedades que varían en duración del ciclo de crecimiento, diferentes densidades de siembra.
2. Evitar áreas en las que se dejaron calles sin sembrar entre las parcelas en la siembra anterior.

Con referencia a lo citado en 1) y 2), una o más siembras uniformes deben precedir la siembra de experimentos.

3. Escoger áreas de terreno donde se conoce la historia del suelo.
4. Si es posible, conducir un ensayo de uniformidad consistente en sembrar una sola variedad y usar prácticas culturales y de manejo que sean uniformes las cuales pueden reducir de alguna forma la variabilidad del suelo. Los datos

de rendimiento (de pequeñas unidades cosechadas a través del campo) pueden ser usados para describir los patrones de heterogeneidad del suelo para la propia orientación de las parcelas y bloques en experimentos subsiguientes en esta área, y para aumentar la precisión de estos experimentos usando la técnica de covariancia.

Una vez obtenido el lote donde se va a conducir los ensayos de campo, los efectos de la heterogeneidad del suelo pueden *reducirse* considerablemente mediante el uso de técnicas experimentales, entre estas se encuentran:

1. el uso de diseños experimentales apropiados,
2. escoger el tamaño y forma adecuada de la parcela,
3. orientar apropiadamente las parcelas y bloques, y
4. aumentando el número de repeticiones.

REQUERIMIENTOS PARA ENSAYOS DE FIJACION DE N₂ EN EL CAMPO

Obviamente que no es posible dar recomendaciones para cada situación en detalle, pero las siguientes notas se refieren a algunas de los aspectos más importantes a considerar en el establecimiento de experimentos de campo para evaluar la asociación leguminosa/*Rhizobium* (Brockwell et al., 1982; Vincent, 1970).

Selección del sitio experimental

La selección del lugar donde se van a efectuar ensayos con cepas de *Rhizobium* está sujeta a varias consideraciones prácticas. Algunas veces es el suelo o la localidad los que precisamente se desean investigar, pero más frecuentemente se escogerá un lugar que llene algunas de las consideraciones experimentales siguientes:

1. El suelo ideal para *ensayos de cepas* es aquel que contiene una baja concentración de N y una población baja de rizobios nativos, aunque algunas veces esta ha de requerir alguna forma de mejorar las condiciones del suelo para poder remover la barrera o factor limitante a la supervivencia del rizobio y la expresión máxima de la simbiosis.

2. En cambio para ensayos de la *capacidad competitiva* de las cepas se necesitan suelos con una población de rizobios ya establecida. La habilidad para distinguir la nodulación debido a las cepas que se están probando de la producida por el rizobio presente en forma natural será una parte esencial en este tipo de investigación.
3. El terreno experimental deberá ser nivelado y de aspecto homogéneo. El suelo deberá ser uniforme, y de una área suficientemente grande para proveer separación entre parcelas y construir drenajes para prevenir la contaminación debido al movimiento superficial del agua después de una fuerte lluvia. El tamaño del área experimental será determinado por el tamaño práctico de las parcelas, el número de tratamientos y repeticiones, y el método de siembra en relación a la mano de obra y maquinaria disponibles.

Preparación del suelo

La preparación y cultivo del suelo por métodos convencionales tiene las ventajas de asegurar una buena germinación, el crecimiento de la leguminosa y el control de las malezas. Sin embargo, esto frecuentemente produce suficiente mineralización del N del suelo que puede oscurecer o atrasar los efectos de la inoculación. Estos efectos, así como en casos de suelos de alto contenido de N, se pueden aliviar de la siguiente manera:

1. Sembrando un cultivo de un cereal, dos veces si es necesario, para reducir los niveles de disponibilidad de N del suelo,
2. Mediante la incorporación abundante de materia orgánica con bajo contenido de N, como paja de cereales, varias semanas antes de la siembra,
3. Reduciendo la labranza mecánica mediante la siembra directa sobre los residuos del cultivo anterior y el uso de la llamada "labranza química" (herbicidas), y
4. Cuando sea posible, dejar el suelo preparado y sin sembrar por una o dos semanas esperando que parte del N disponible sea reducido por efecto de "lavado por las lluvias",

fijado por las partículas del suelo y/o materia orgánica, denitrificación, etc. El control químico de malezas será necesario en éste caso para mantener el terreno limpio.

Aplicación de fertilizantes

La efectividad simbiótica de la asociación leguminosa/*Rhizobium* no se puede expresar si otros elementos necesarios para el crecimiento de las plantas son deficientes en el suelo. Según esto, es necesario mejorar las deficiencias minerales antes de empezar la experimentación. Algunas veces los requerimientos de un suelo dado se conocen, sin embargo muchos recomiendan la aplicación de una fertilización completa.

Es difícil definir lo que podríamos denominar la "fertilización óptima" para ensayos de campo sobre la fijación de N_2 . Lo más aconsejable es usar una fertilización que permita reducir las deficiencias del suelo pero utilizando niveles de fertilización que no sean demasiados altos en relación a las recomendaciones prácticas para los agricultores. Lo que se desea es tener condiciones experimentales en que se equilibren las recomendaciones basadas en análisis de suelo y de plantas para facilitar la detección de las diferencias entre tratamientos, pero asegurándose que estos resultados puedan tener aplicación práctica. Los objetivos del ensayo también han de considerarse antes de tomar decisiones al respecto; la experiencia del investigador ha de jugar un rol importante en estas decisiones como en muchas otras relacionadas al estudio de la simbiosis leguminosa/*Rhizobium*.

En nuestros ensayos de campo en Honduras (EAP-El Zamorano) estamos usando la siguiente fertilización por hectárea; 300 kg de carbonato de calcio, 150 kg de superfosfato triple, 25 kg de sulfato de magnesio (deficiente según análisis de suelo), y proporcionando los requerimientos de molibdeno (esencial para la fijación de N_2) mediante el uso de fungicidas, que contiene Thiram + Molibdeno, aplicado a las semillas.

CARACTERISTICAS DE LA PLANTA HOSPEDERA Y EL RHIZOBIUM

LA PLANTA (LEGUMINOSA) HOSPEDERA

Rol del hospedero en la prueba y selección de cepas

La planta hospedera puede también afectar el proceso de nodulación simplemente siendo incompatible con la cepa o especies de *Rhizobium* con que se está tratando de infectarla (Meiner y Gross, 1980). El mecanismo exacto de esta incompatibilidad es aún desconocido, pero la llamada especificidad puede ser identificada genéticamente, como en el gene *ryI* que determina la característica de no-nodulación en soya, o que puede ser definido a nivel de variedades de planta como en el caso de frijol (Graham, 1981; Graham y Rosas, 1977; Graham y Halliday, 1977). Por lo tanto, en un ensayo en que se esté probando la efectividad de las cepas es necesario incluir uno o más hospederos que permitan la expresión de esta característica de las cepas. Un hospedero de escasa capacidad para establecer una simbiosis eficiente y en mantener la actividad de fijación de la bacteria, indudablemente limitará la expresión de las cepas y hará más difícil la identificación de su potencial para fijar N_2 .

Plantas hospederas para ensayos de inoculación

El uso de un solo genotipo de la planta hospedera trae como consecuencia resultados de significado limitado y altamente asociado a este genotipo; además, si este genotipo posee una reducida capacidad simbiótica producirá una respuesta limitada a la inoculación. Se recomienda para ensayos de prueba de cepas el incluir los siguientes genotipos:

1. Un genotipo de alta capacidad de fijación, previamente identificado,
2. El uso de plantas que no fijan N_2 como líneas de soya que no nodulan y/o cereales (p.e. arroz de secano), para estimar el efecto del N del suelo y del aplicado como fertilizante. En ensayos con frijol se podrá usar genotipos de pobre fijación, ya que en esta especie no existen materiales que no nodulan, y

3. El uso de cultivares locales.

Es importante el seleccionar hospederos con características de crecimiento lo más similares posibles y así reducir las diferencias asociadas a otras características de la planta, p.e. floración/maduración tardía vs. temprana, y hábito de crecimiento arbustivo vs. trepador.

Plantas hospederas uniformes vs. genéticamente variables

En muchos estudios se han de usar plantas hospederas que son uniformes y que poseen patrones similares de crecimiento y desarrollo. En este caso las evaluaciones para estimar la fijación de N₂ podrán hacerse en base a un mismo tiempo (días) después de la siembra o emergencia. Por otro lado, para el caso de poblaciones genéticamente variables, como ocurre en programas de mejoramiento de especies hospederas, y donde se presentan variaciones en el crecimiento y la ocurrencia de las diferentes etapas de desarrollo, se deberá tener en cuenta de hacer las determinaciones en la misma etapa de desarrollo de cada genotipo, aunque estos ocurran en tiempos (días) diferentes. Por ejemplo, se ha encontrado que la nodulación y actividad de fijación está asociada con la etapa (floración tardía vs. temprana) y hábito (determinado vs. indeterminado) de crecimiento de los genotipos de frijol (Graham, 1981; Graham y Halliday, 1977; Graham y Rosas, 1977). Sería erróneo estimar la fijación de N₂ en un mismo día en genotipos con diferente etapa en que ocurre la floración o hacer comparaciones entre genotipos arbustivos vs. trepadores, aunque cada uno de estos han de ser de importancia pero en sistemas de producción diferentes.

ENSAYOS DE INOCULACION

Hay varios métodos que pueden ser utilizados en ensayos de inoculación con leguminosas; generalmente se ha de escoger uno de acuerdo a los objetivos del ensayo. Sin embargo, algunos de los principios generales que se aplican a todos ellos son:

1. Si se incluyen controles no inoculados, estos deben ser manipulados antes que los tratamientos con inoculación. Esto reduce el riesgo de contaminación y subsecuente nodulación del control.

2. Los niveles de inoculación deben de ser siempre los más altos posibles dentro de los objetivos del experimento para reducir los efectos de contaminación.
3. El *Rhizobium* es un organismo que es fácilmente transportado por el agua, viento, humanos y animales, o aún accidentalmente de un tratamiento a otro.
4. El *Rhizobium* no se puede aplicar en contacto con muchos pesticidas usados con las semillas.

Las determinaciones de campo incluye la necesidad de medir el suceso de las cepas aplicadas en la formación de nódulos en la presencia o ausencia de una población de rizobios nativos. Tres situaciones pueden presentarse cuando se evalúan cepas de *Rhizobium* en el campo. Según Norris y Date (1976), estas son:

1. Las plantas testigos no inoculados no presentan nódulos o si los presentan estas plantas son pequeñas y deficientes en N en comparación con las plantas inoculadas. La respuesta en las plantas inoculadas puede ser uno de los casos siguientes:
 - a. Plantas sin nódulos, indicando la falta de infectividad de la cepa aplicada,
 - b. Plantas noduladas pero pequeñas, deficiente en N y sin mostrar aumento en peso seco, indicando que la cepa es inefectiva, o
 - c. Plantas noduladas que muestran una respuesta substancial en peso seco y/o rendimiento, indicando que la cepa es efectiva.
2. Plantas testigos no inoculadas que presentan nódulos que se consideran inefectivos desde que los tratamientos inoculados muestran plantas sanas y de buen crecimiento con un aumento significativo en el peso seco, sobre aquellas no inoculadas. Obviamente que en este caso solo algunos de los nódulos en el tratamiento inoculado son formados por la cepa usada como inóculo. No sería de valor práctico determinar la proporción de nódulos formados

por la cepa ya que esta es la única que contribuye a la fijación de N₂.

3. Plantas testigos no inoculadas con nódulos activos en fijar N₂ y peso seco similar a las plantas que han sido inoculadas. En estos casos es esencial la determinación de la proporción de nódulos formados por la cepa aplicada como inóculo y estimar su contribución al total del N₂ fijado.

APLICACION DEL INOCULANTE

Cepas individuales vs. mezclas de varias cepas

Una vez identificada la efectividad simbiótica de las cepas, la pregunta siguiente sería si se debe usar una sola cepa o una mezcla de varias de ellas como fuente de inóculo. Algunos investigadores se inclinan por el uso de una cepa altamente eficiente y competitiva en base a resultados obtenidos en condiciones controladas. Este concepto favorece la opinión de que la selección debe hacerse simultáneamente, y tendiendo a identificar combinaciones específicas de cepa x hospedero; la validez de este método queda aún por ser evaluada en condiciones de campo. En las condiciones actuales se recomienda el uso de una mezcla de varias cepas efectivas seleccionadas en ensayos previos para ofrecer una mayor oportunidad en el establecimiento de una simbiosis efectiva en condiciones en que los factores ambientales y la competencia por el rizobio nativo presentes en el suelo, varían de un lugar a otro. De acuerdo a esto, en el proceso de selección de plantas hospederas por su mayor efectividad simbiótica se recomienda el uso de inóculos preparados con varias cepas, los cuales deberán cambiarse y/o rotarse con cierta frecuencia para evitar la selección de plantas con alta especificidad por una o pocas cepas, y en vez de ello seleccionar aquellas plantas que presentan una buena habilidad de fijación con un rango amplio de cepas efectivas de *Rhizobium*.

Tipo de inoculante

La forma en que se aplica el inoculante y el número de bacterias contenidos en él, han de afectar de alguna manera su comportamiento. A menos que el ensayo de campo es tal que requiere comparaciones de diferentes procedimientos de inoculación, este será aquel que se recomienda por su probada

efectividad. El revestimiento (peletizado) de las semillas con carbono de calcio o roca fosfatada después de ser inoculadas ha sido recomendado en situaciones en que el inóculo necesita ser protegido contra condiciones adversas como bajo pH y falta de humedad (Graham et al., 1974; Norris y Date, 1976; Vincent, 1970). Ultimamente se está usando, con buen éxito, inoculantes a base de turba de tipo granulada que se aplica al suelo al momento de la siembra, y el cual ofrece cierta protección a la bacteria y facilita la distribución del inóculo.

DISEÑO Y TECNICAS PARA EXPERIMENTACION EN EL CAMPO

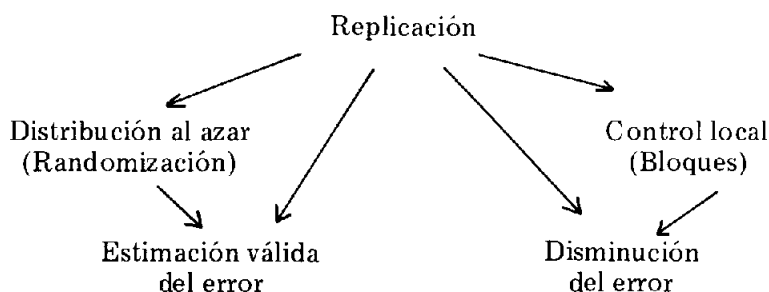
CONCEPTOS SOBRE DISEÑOS EXPERIMENTALES

Generalidades

Diseño experimental se refiere a las reglas que regulan la distribución de tratamientos en las parcelas experimentales. Cuando esto se ejecuta apropiadamente permite la comparación válida entre tratamientos y el control de la fuente principal de variación de los experimentos de campo, es decir la heterogeneidad del suelo. La selección del mejor diseño para un experimento depende primariamente de la magnitud de la variabilidad del suelo en el área donde se va a conducir el ensayo, el tipo y el número de tratamientos a ser probados, y el grado de precisión deseado. Cuando se va a empezar un nuevo experimento, consulte con un investigador con experiencia o un estadístico competente, siempre que sea posible.

Principios de los diseños experimentales

Los principios básicos del diseño experimental son replicación, randomización y control local (uso de bloques). Es de primordial importancia para el investigador el entender la lógica de estos principios de manera a diseñar experimentos que sean efectivos. El siguiente diagrama de LeClerc et al. (1962), nos puede ayudar a entender estos principios.



Replicación. El número de veces que un grupo de tratamientos es repetido se denomina el número de replications. Es aparente por el diagrama que las funciones de la replicación son:

1. Proveer una estimación de la magnitud del error al cual es muy probable que las comparaciones entre tratamientos estén sujetos, y
2. Disminuir el error experimental.

Con respecto a la función 1, los diferentes tratamientos deben ser distribuidos al azar de manera tal a satisfacer la base matemática para la estimación válida del error.

Para la disminución del error, o función 2, esta puede ser conducida a cualquier grado de precisión preveyéndose que un número suficiente de replications sean usadas conjuntamente con control local o bloques. Más aún el error standard promedio ($S\bar{x}$) es proporcional a la raíz cuadrada del número de replications u observaciones, $S\bar{x} = \sqrt{s/n}$.

Randomización. Es uno de los principios básicos del diseño experimental. Hace posible que la estimación del error sea válida, lo cual es esencial en la comparación de tratamientos. Randomización es el procedimiento para asignar tratamientos de tal manera que cada parcela (unidad) experimental tiene el mismo chance de recibir cualquier tratamiento. Es importante recordar que la estimación del error depende de las diferencias entre parcelas tratadas igualmente.

Control local (bloqueo o uso de bloques). El error experimental es más adecuadamente controlado y medido a través

de la división del terreno a ser ocupado por el experimento de campo en áreas llamadas bloques. El uso de bloques, se refiere a la asignación de un grupo de parcelas o tratamientos a un bloque de terreno con un suelo relativamente homogéneo, como una de las maneras más simples y más efectivas de afrontar la heterogeneidad del suelo. De esta manera la variación entre bloques puede ser removida del error experimental permitiendo la reducción del error y el aumento en la precisión de un experimento. Cuanto más grandes son las diferencias entre bloques, más grande es la reducción del error experimental. Aún más, el uso apropiado de bloques debe producir diferencias grandes entre ellos haciendo que las parcelas dentro de cada bloque sean más homogéneas.

TRATAMIENTOS Y PLANTAS USADAS COMO TESTIGOS

La respuesta a la inoculación debe de ser considerada en relación al comportamiento de tratamientos no inoculados usados como testigo. En cuanto a *testigos no inoculados y sin N* pueden considerarse como standards para juzgar la habilidad para nodular y fijar N_2 del rizobio presente en el suelo en el lugar experimental, y que debe ser incluido siempre en los ensayos de campo. Los tratamientos *testigos no inoculados y con N* pueden ser usados para determinar la habilidad de la planta hospedera para responder al N aplicado bajo las condiciones del experimento.

Cuando se están comparando la habilidad simbiótica de variedades de plantas hospederas es recomendable incluir un genotipo de alta fijación, uno de escasa fijación o mejor uno que no forma nódulos, y uno de los cultivares locales, como testigos. En ensayos con isótopos de ^{15}N se utilizan genotipos que no producen nódulos para estimar la cantidad de N_2 fijado y la proporción del N total que proviene de la fijación. En la práctica, se pueden usar estos genotipos que no nodulan para estimar en forma conservativa la cantidad de N proveniente del suelo y/o fertilizante, lo cual es más efectivo en suelos de bajo contenido de N, y donde se puede asumir que una gran proporción del N total en las plantas proviene ya sea de la fijación o del fertilizante aplicado.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PARCELAS EXPERIMENTALES

Tamaño de parcela

El tamaño, como la forma y la orientación, de una parcela puede afectar grandemente la magnitud del error experimental de un experimento de campo. En general, el error experimental decrece de acuerdo al aumento en tamaño de parcela, pero la reducción no es proporcional, y siempre y cuando al aumentar el área total experimental no estamos incrementando el error debido a una mayor heterogeneidad del suelo. Por otro lado, el tamaño de parcela no solo afecta la variabilidad pero puede ocasionar parcialidad en los resultados; para una área específica de terreno, el número de replicaciones decrece de acuerdo a como el tamaño de parcela aumenta. Si el tamaño mínimo de parcela es obtenido, un mayor incremento en la precisión puede esperarse con el aumento en el número de replicaciones. En relación al tipo de experimento, podemos decir que las prácticas culturales relacionadas al experimento pueden influenciar el tamaño y la forma de las parcelas para poder facilitar las operaciones. Los experimentos de fertilización requieren parcelas más grandes que los de prueba de rendimiento de variedades; los ensayos de riego pueden requerir parcelas aún más grandes. Cuando la cantidad de semilla es limitada o un gran número de genotipos (como ocurre en programas de mejoramiento) o cepas de *Rhizobium* necesitan ser evaluados, se tendrá que usar parcelas pequeñas; en este caso la técnica de campo deberá ser suficientemente refinada para asegurar suficiente precisión en la conducción del experimento. El uso de parcelas pequeñas no ha presentado mayor problema en ensayos conducidos para evaluar la efectividad simbiótica de la asociación frijol/*R. phaseoli* (McFerson, 1983; McFerson et al., 1982; Rosas, 1983).

Número de plantas

Para determinaciones de la fijación simbiótica y caracteres relacionados en frijol común se han estado usando un mínimo de 5 plantas; el rendimiento en estos ensayos ha sido determinado en muestras de 10 plantas (McFerson, 1983; McFerson et al., 1982; Rosas, 1983). Es indudable que determinaciones en un mayor número de plantas han de incrementar la precisión de los ensayos, sin embargo, es preferible tener parcelas con el

mínimo necesario de plantas y permitir un aumento en el número de replicaciones.

Para asegurar el número deseado de plantas por parcela se recomienda sembrar dos semillas por golpe; después de completada la emergencia de las plántulas proceder a "ralear" y dejar la población deseada, es decir una planta por golpe para especies como frijol común. Se recomienda dejar las dos plantas en un golpe determinado si en el siguiente no ha emergido ninguna plántula; en frijol, esto tiene un efecto compensatorio (Sullivan y Bliss, 1981). Se debe evitar las resiembras y/o transplantes ya que estas plantas no llegan a alcanzar el tamaño y vigor de las otras plantas dentro de la parcela.

Replicaciones por experimento

El número de replicaciones que se necesitan dependen de la magnitud del error experimental más probable de ser obtenida en el experimento y el grado de precisión que se desea. En los cuadros 1 y 2 se presentan el número de replicaciones que son necesarias para obtener un determinado grado de precisión bajo una magnitud de error experimental (coeficiente de variabilidad) más probable de ser obtenida en el experimento. Además, hay que considerar en forma práctica (mano de obra, terreno disponible, costo, etc) el número de replicaciones que es posible conducir, asegurándose que el número de replicaciones a escogerse debe proveer no menos de 10 grados de libertad para estimar el error experimental. Cuando existen dudas al respecto consulte con un estadístico.

Cuadro 1. Error standard promedio de tratamientos expresado en porcentaje del promedio según el número de replicaciones y el coeficiente de variabilidad (CV), K. Gómez (1972).

Número de replicaciones	Error standard (o/o)		
	CV = 10 o/o	CV = 12 o/o	CV = 14 o/o
2	7.1	8.5	9.9
4	5.0	6.0	7.0
6	4.1	4.9	5.7
8	3.5	4.2	5.0

Cuadro 2. Diferencia entre promedio de dos tratamientos que puede ser detectada (95o/o confidencial) según el número de replicaciones y el coeficiente de variabilidad (CV), K. Gómez (1972).

Número de replicaciones	Diferencia detectable (o/o)		
	CV = 10o/o	CV = 12o/o	CV = 14o/o
2	22.6	27.1	31.7
4	14.5	17.4	20.3
6	11.6	14.0	16.3
8	10.0	12.0	14.0

RECONOCIMIENTOS

Los fondos para estos trabajos fueron proveidos por USAID/CSRS (Donación No. 59-2551-1-5-006-0, Programa de Factores Limitantes de la Fijación Biológica de Nitrógeno).

LITERATURA CITADA

- BLISS, F.A. 1984. En: P.H. Ludden and J.E. Burris (eds), Nitrogen Fixation and Carbon Metabolism. Proc. Fourteen Steenbock Symp., Univ. Wisconsin, Madison, June 17-22, 1984. Elsevier Publ., New York. pp. 303-310.
- BROCKWELL, J., A. Diatloff, R.J. Roughley y R.A. Date. 1982. En: J.M. Vincent (ed), Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, New York. pp 173-191.
- GOMEZ, K. 1972. Techniques for field experiments with rice. International Rice Research Inst. Los Baños, Phillipines. 46 p.
- GRAHAM, P.H. 1981. Field Crops Res. 4:93-112.
- GRAHAM, P.H. y J. Halliday. 1977. En: J.M. Vincent (ed), Exploiting the Legume - *Rhizobium* Symbiosis in Tropical Agriculture. Univ. Hawaii Misc. Publ. 145. pp 313-334.
- GRAHAM, P.H. y J.C. Rosas. 1977. J. Agric. Sci. Camb. 88:503-508.
- GRAHAM, P.H., V.M. Morales y R. Cavallo. 1974. Turrialba 24:47-50.

- LeCLERC, E.L., W.H. Leonard y A.G. Clark. 1962. Field Plot Technique. Burgess Publ. Co., 2nd edition, Minnesota. 373 p.
- McFERSON, J.R. 1983. Genetic and Breeding Studies of Dinitrogen Fixation in Common Bean, *Phaseolus vulgaris* (Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison).
- McFERSON, J.R., F.A. Bliss y J.C. Rosas. 1982. En: P.H. Graham y S. Harris (eds), Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. CIAT, Cali, pp 39-44.
- MEINER, C.A. y H.D. Gross. 1980. Some guidelines for the evaluation of the need for and response to inoculation of tropical legumes. North Carolina State Univ. 59 p.
- NORRIS, D.O. y R.A. Date. 1976. En: N.H. Shaw y W.W. Bryan (eds) Tropical Pasture Research. Principles and Methods, Bull. 51 Commonwealth Agric. Bureaux. pp 134-174.
- RENNIE, R. J. y G. A. Kemp. 1983. Agron. J. 75: 645-649.
- ROSAS, J.C. 1983. Partitioning of Dry Matter, Nitrogen Fixation and Seed Yield of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Influenced by Plant Genotype and Nitrogen Fertilization (Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, Madison).
- RUSHEL, A.P., P.B. Vose, E. Matsui, R.L. Victoria y S.M. Tsai Saito. 1982. Plant and Soil 65: 397-407.
- SULLIVAN, J.G. y F.A. Bliss. 1981. Hortscience 16:185-186.
- SYLVESTER-Bradley, R., M.A. Ayarza, J.E. Méndez y J. Moriones. 1983. Use of undisturbed soil cores for evaluation of *Rhizobium* strains and methods for inoculation of tropical forage legumes in a Colombian Oxisol. Plant and Soil 74: 237-247.
- VINCENT, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IPB Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publ., England. 164 p.
- WESTERMANN, D.T., G.E. Kleinkopf, L.K. Poster y G.E. Leggett. 1981. Agron. J. 73: 660-664.

PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA

Jairo Castaño Z.

MIPH—EAP No. 95. 1986. 45 p.

Esta guía constituye un auxiliar didáctico valioso para la enseñanza y aprendizaje de 16 prácticas y técnicas de laboratorio importantes de la fitopatología.

El manual incluye las instrucciones básicas para la utilización apropiada del microscopio compuesto, microscopio ocular y hemacitómetro. Asimismo, explica la manera de preparar medios de cultivos apropiados para el aislamiento, multiplicación y montaje de hongos y bacterias fitopatógenas. También se describen prácticas de asepsia en el laboratorio, inoculación y diagnóstico de enfermedades de plantas causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos.

Debido a la importancia que reviste la patología de semillas y el conocimiento del tipo de acción que poseen los fungicidas, se describen algunos métodos para detectar microorganismos en las semillas, el tratamiento químico de éstas y demostración del poder residual de fungicidas en el follaje. Se incluyen también dos apéndices acerca de la composición de medios de cultivo y soluciones para el aislamiento y montaje de hongos y bacterias.