

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**AISLAMIENTO, EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS SIMBIÓTICAS  
NATIVAS DE *RHIZOBIUM SP.*, EN *PHASEOLUS VULGARIS L.*, DE SUELOS  
AGRICOLAS DE EL SALVADOR.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
DELMY YANET RECINOS CERRITOS  
FLOR DE LOS ANGELES GARCÍA GÓMEZ**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2007.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**AISLAMIENTO, EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS SIMBIOTICAS  
 NATIVAS DE *RHIZOBIUM SP.*, EN *PHASEOLUS VULGARIS L.*, DE SUELOS  
 AGRICOLAS DE EL SALVADOR.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
 DELMY YANET RECINOS CERRITOS  
 FLOR DE LOS ANGELES GARCÍA GÓMEZ**

**PARA OPTAR AL TITULO DE:  
 LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**Asesor: \_\_\_\_\_**

**Dr. Rigoberto Ayala.**

**Asesora: \_\_\_\_\_**

**Ing. Agr. Blanca Daisy Ávila de Solano.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2007.**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**AISLAMIENTO, EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS SIMBIÓTICAS  
NATIVAS DE *RHIZOBIUM SP.*, EN *PHASEOLUS VULGARIS L.*, DE SUELOS  
AGRICOLAS DE EL SALVADOR.**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:  
DELMY YANET RECINOS CERRITOS  
FLOR DE LOS ANGELES GARCÍA GÓMEZ**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGIA**

**Jurado: \_\_\_\_\_**

**M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura**

**Jurado: \_\_\_\_\_**

**M.Sc. Guillermo Ernesto Martínez Espinoza**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2007.**

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTORA:**

**DRA. MARIA ISABEL RODRÍGUEZ**

**SECRETARIA GENERAL:**

**LICDA. ALICIA MARGARITA RIVAS**

**FISCAL:**

**LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR**

**DECANO:**

**LIC. JOSÉ HÉCTOR ELÍAS DÍAZ**

**DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA:**

**M.SC. ANA MATHA ZETINO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO 2007.**

**ASESORES Y JURADOS**

**ASESOR:**

**DR. RIGOBERTO AYALA**

**ASESORA:**

**ING. AGR. BLANCA DAISY AVILA DE SOLANO**

**JURADO EVALUADOR:**

**M.SC. YANIRA ELIZABETH LOPEZ VENTURA**

**JURADO EVALUADOR:**

**M.SC. GUILLERMO ERNESTO MARTINEZ ESPINOZA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO 2007.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darnos sabiduría a lo largo de estos años de estudio, por permitirnos culminar una meta más en nuestra vidas.

A nuestros apreciables asesores Ing. Agr. Blanca Daisy Avila de Solano y Dr. Rigoberto Ayala por el aporte de sus conocimientos, su apoyo incondicional y orientación en el desarrollo de este trabajo.

A los jurados M.Sc. Yanira López y M.Sc Guillermo Martínez por su valiosa contribución en la revisión y evaluación de la presente tesis.

A nuestros maestros quienes contribuyeron en nuestra formación profesional brindándonos sus conocimientos, y experiencias. A nuestra respetable directora M.Sc. Martha Zetino por permitirnos trabajar en las instalaciones de los laboratorios de la Escuela de Biología.

Agradecemos a don Faustino, don Lucio, don Fermín Abarca, Julio de Jesús Acevedo, Manuel Sola, Daniel Martínez y Vicente Cruz Ardón por su colaboración en la obtención del material experimental.

A la Ing. Agr. Julia Amalia Nuila de Mejía por su aporte en el área del diseño y análisis estadístico de la presente investigación y a Ing. Agr. Doris Villeda por permitirnos el uso del autoclave donde fueron esterilizadas los dispositivos de Jarras de Leonard. Ingenieros agrónomos Leopoldo Serrano (Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador); Reyna de Serrano, Carlos Atilio Pérez (Programa granos básicos del CENTA); Carlos Represa (Laboratorio de Semilla del CENTA) por facilitarnos la obtención de las variedades de frijol.

Al Sistema Nacional de Estudios Territoriales (SNET) por su amabilidad al proporcionarnos los mapas de ubicación de los lugares en estudio.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primeramente a Dios por su amor y fidelidad; por ayudarme y sostenerme en cada momento de mi vida y por llevarme siempre, mucho más allá de mis sueños y anhelos. ¡¡¡Gracias Señor!!!

A mis padres, Santos Florinda Gómez de García y Luis Amílcar García López por todo su amor, apoyo, paciencia, consejos, trabajo y sacrificios realizados para mi formación personal y profesional.

A mi hermana Xochitl, por su ejemplo y palabras que me animaron a seguir adelante.

Delmy, te estoy agradecida por la confianza que depositaste en mí, decidiéndote a trabajar conmigo en la realización de este trabajo de graduación. Gracias por tu esfuerzo, paciencia y fuerza de espíritu que me inyectó ánimo y valor en los momentos difíciles que vivimos durante la realización de este trabajo. Pero ahora podemos decir ¡lo logramos! cerrando así un capítulo más de nuestras vidas, confiando en que Dios nos ayudará con los que están por abrirse. ¡Te quiero amiga!

A los papás de Delmy y su abuelita Blanca por apoyarnos y recibirme en sus casas cuando hubo necesidad de quedarnos a trabajar hasta la madrugada. A Hna. Cecilia Martínez y familia por sus oraciones y por apoyarme en el momento que lo necesitaba para poder realizar mi trabajo de graduación.

A Sarita, Johanna, Jairo, Guillermo, Sebastián, Melvin, Marco Tulio, Rodrigo, Xochil, Jennifer y demás amigos y compañeros con quienes aprendí y me divertí durante todos estos años de estudio. ¡Gracias a Todos!

Finalmente agradezco a toda mi familia y amigos que de una u otra manera estuvieron pendientes de mí durante mis años de estudio y me apoyaron y animaron durante el desarrollo del trabajo de graduación.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a Dios por su amor y bendición, por darme la sabiduría para salir adelante en mi carrera, y sobre todo por permitirme concluir una meta más en vida.

También a mis padres Delmy Arely de Recinos y Jose Dinoel Recinos, a mis hermanos Daniela, Dina y Carlos por su amor, cuidado y paciencia, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento, por sus sabios consejos y sacrificios realizados en pro de mi desarrollo tanto secular como espiritual.

A mi futuro esposo Danilo Ramirez por su amor, paciencia y su ayuda en todos los aspectos y en todo momento, gracias amor por todo, que el Señor derrame siempre bendiciones en tu vida.

A mi familia espiritual por preocuparse siempre por mi, por sus oraciones y consejos, por ser una parte fundamental en mi vida. Asi tambien a mi demás familia por estar siempre conmigo ayudándome y animándome a lo largo de estos años de estudio.

A Flor por ser mi mejor amiga, mi hermana con quien compartimos tantos momentos a lo largo de esta carrera, gracias por enseñarme y ayudarme a crecer a ser paciente, que el Señor la guarde y haga prosperar sus caminos,

A mi queridos amigos Sara, Johana, Jeny, Rodrigo, Xochilt,, Jairo, Guillermo, Melvin, Marco Tulio y mis demás compañeros por compartir tantos momentos inolvidables en clases y viajes de campo por su sincera amistad y apoyo, por ser aparte de mi desarrollo profesional, les deseo muchas bendiciones.

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el grado de infectividad de *Rhizobium sp.* procedente de las localidades en estudio con tres variedades de frijol y recomendar las variedades de frijol más compatibles a los rizobios presentes en los suelos de las tres localidades, se realizó el presente trabajo; el cual consistió primeramente en coleccionar nódulos radiculares “activos” provenientes de plantas de frijol cultivadas en tres diferentes localidades: Cantón El Paraíso, municipio de San Sebastián, departamento de San Vicente; Cantón Zapotitán, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad y Finca Bethania, jurisdicción de los cantones Changallo, municipio de Ilopango, y El Guaje, Municipio de Santo Tomás, del departamento de San Salvador. Estos nódulos fueron esterilizados y posteriormente macerados a fin de obtener suspensiones de los rizobios simbiotes para ser inoculados en tres variedades de frijol: Frijol Rojo de Seda, CENTA Pipil y CENTA San Andrés. Para ello se utilizaron Jarras de Leonard.

Obteniéndose como resultados que los rizobios provenientes de las tres localidades presentaron compatibilidad con determinadas variedades, evidenciándose en la producción de mayor número de nódulos.

# INDICE

- I. Introducción -----	1
- II. Fundamento Teórico -----	4
II.1 Descripción de la familia Rhizobiaceae -----	6
II.1.1 Descripción del genero <i>Rhizobium</i> -----	7
II.2 Simbiosis leguminosa- <i>Rhizobium</i> -----	8
II.2.1 Reconocimiento entre planta y <i>Rhizobium</i> -----	9
II.2.2 Invasión -----	10
II.2.3 Nitrogenasa -----	10
II.2.4 Hidrogenasa -----	11
II.2.5 Leghemoglobina -----	11
II.2.6 Genes nod -----	12
II.2.7 Regulación de la expresión de los genes simbióticos -----	12
II.3 Etapas de la formación del nódulo -----	13
II.3.1 Reconocimiento de la pareja correcta por parte de la planta Como de la bacteria y fijación de la bacteria a los pelos radiculares -----	13
II.3.2 Invasión de los pelos de la raíz por la formación bacteriana De una cadena infecciosa -----	14
II.3.3 Viaje a la raíz principal por medio de la cadena infecciosa ---	14
II.3.4 Formación de las células bacterianas deformadas, Bacteroides dentro de las células vegetales y desarrollo del estado fijador del nitrógeno -----	14
II.3.5 Formación del nódulo radicular maduro -----	15
II.3.6 Caracterización del nódulo -----	15
II.4 Factores que afectan la nodulación y la fijación de N <sub>2</sub> en las leguminosas -----	16
II.4.1 Nitrato del suelo -----	16
II.4.2 Hormonas -----	16

II.4.3 Difusión del oxígeno -----	17
II.4.4 Factores ambientales -----	17
II.4.4.1 Elementos minerales -----	17
II.4.4.2 Temperatura -----	18
II.4.4.3 Luz -----	18
II.4.4.4 Agua -----	18
II.4.4.5 Otros factores -----	18
II.5 Aprovechamiento de la simbiosis leguminosa- <i>Rhizobium</i> para la optimización del rendimiento del cultivo de leguminosas de una manera ambientalmente sana -----	19
II.6 Importancia del cultivo de frijol en El Salvador -----	20
II.6.1 CENTA Pipil -----	20
II.6.2 CENTA San Andrés -----	21
II.6.3 Frijol de Seda -----	21
III Metodología -----	22
III.1 Fase de Campo -----	22
III.1.1 Ubicación y descripción de las zonas de estudio -----	22
III.1.2 Material experimental -----	23
III.1.2.1 Colecta del material experimental -----	23
III.2 Fase de Laboratorio -----	27
III.2.1 Aislamiento de cepas de <i>Rhizobium sp</i> -----	27
III.2.1.1 Material experimental colectado -----	27
III.2.1.2 Lavado e hidratación de los nódulos -----	27
III.2.1.3 Esterilización superficial de los nódulos -----	28
III.2.1.4 Aislamiento e Incubación de los rhizobios -----	29
III.2.1.5 Purificación de cepas -----	29
III.2.2 Prueba de infectividad entre variedades de frijol y los rizobios provenientes de las localidades -----	30
III.2.2.1 Montaje y manejo del experimento -----	31
III.2.2.1.1 Preparación de la arena de río -----	31



## INDICE DE TABLAS

- TABLA 1: Cuadro de de resultados obtenidos en la prueba de nodulación en Jarras de Leonard ----- 41
  
- TABLA 2: Analisis de varianza para evaluar tratamientos con un 10% de probabilidad ----- 42
  
- TABLA 3: ANVA para los efectos principales: variedad *Rhizobium* y la interacción entre estos ----- 43
  
- TABLA 4: Cuadro de doble entrada para variedades de fríjol ----- 44
  
- TABLA 5: Cuadro de doble entrada para rizobios procedentes de las diferentes localidades ----- 44

## INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

- FIGURA 1: ubicación de los cantones en donde se realizaron los dos muestreos de colecta de nodulos de plantas de frijol en los meses de octubre 2005, enero 2006; junio, julio y diciembre del 2006 (Sistema Nacional de Estudios Territoriales SNET). ----- 25
  
- FIGURA 2: Metodo de muestreo con recorrido en zig-zag -----26
  
- FIGURA 3: Jarra de Leonard ----- 35
  
- FIGURA 4: Aislamientos de *Rhizobium* realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Genética Molecular de la Escuela de Biologia, Facultad de Ciencias Naturales y Matematica en los meses de Mayo y Junio de 2006. Donde se muestran colonias típicas de *Rhizobium sp.* contaminadas por hongos.----- 37
  
- FIGURA 5: Vista al microscopio de una tinción de Gram realizada a una de las colonias mostradas en la figura 4; a un aumento de 100X, en donde se observa la presencia de *Rhizobium sp.* ----- 38
  
- FIGURA 6: Cultivo donde se evidencia el crecimiento de colonias de bacterias contaminantes.----- 38
  
- FIGURA 7. Vista al microscopio a 100X de una tinción de Gram en donde se observa la presencia de *Bacillus subtilis* ----- 39
  
- FIGURA 8: Cultivo contaminado con larvas de insectos, específicamente del género *Megaselia* ----- 39

- FIGURA 9: Cultivo contaminado por hormigas del género *Tapinoma* ----- 40
- GRAFICO 1: Comportamiento del efecto *Rhizobium*. Se muestra la relación de dependencia entre las variables: variedades de frijol y los rizobios procedentes de las localidades ----- 46

## I. INTRODUCCIÓN

Incrementar la producción de alimentos sin deterioro ambiental y buscar tecnologías limpias de bajos costos para los agricultores de bajos recursos económicos son un reto en el presente siglo. Así como un uso racional de insumos agrícolas y la utilización de otras alternativas de producción que no dañen al ambiente son indispensables para lograr una agricultura sostenible y ambientalmente sana (Almaráz & Ferrera, 2002).

En la actualidad el uso de productos biológicos aplicados dentro de los sistemas de producción agrícola está teniendo gran auge especialmente para lograr una mayor disponibilidad de nutrientes que permiten un rendimiento sostenible de los cultivos, con la conservación del medio ambiente (Calderón, 1998).

El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en la agricultura ha ocasionando graves problemas de contaminación. No todo el fertilizante que se aplica lo aprovecha la planta sino que en una cuantía importante acaba en lagos y lagunas. La fijación biológica de nitrógeno es la opción natural de fertilización química (Web 2).

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio (Web 2).

Se estima que entre alrededor de 175 millones de toneladas métricas de Nitrógeno se fijan biológicamente cada año, lo que equivale a un poco más de dos veces la producción mundial de fertilizantes nitrogenados (Almaráz & Ferrera, 2002).

Lo anteriormente citado, sustenta el hecho del por qué la simbiosis Leguminosa-*Rhizobium* sp., es considerada la más promisoría asociación planta-bacteria en el trópico; para el incremento inmediato en proteínas, a través de la fijación biológica del Nitrógeno (Asociación Latinoamericana de Rhizobiología, 1982).

De acuerdo a Pérez & Reyes, 2002; el frijol es el cultivo más importante entre las leguminosas de grano, para nuestro país; por la superficie de siembra, ya que se cultiva en todo el país desde los 100 hasta los 1500 m.s.n.m, como por los ingresos que genera como producto de consumo interno. Asimismo, tiene mucha importancia en la dieta alimenticia de la población por su valor nutritivo conteniendo de 20 a 25% de proteínas, 1.6% de lípidos, cerca de 60% de hidratos de carbono y además, minerales como calcio, fósforo, hierro, entre otros.

Este grano, dentro del grupo de las leguminosas, además de ser la más importante para la alimentación humana a nivel mundial, es la de más baja capacidad de nodulación y fijación de N<sub>2</sub> atmosférico (Burdman et al.,2000).

En El Salvador, la mayoría de los suelos donde se cultiva frijol, se encuentran muy deteriorados por el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, que han ocasionado un alto desbalance de la flora microbiana benéfica normal (Calderón, 1997).

En la producción del frijol uno de los principales problemas con los que se encuentra el pequeño productor es la baja fertilidad del suelo especialmente en Nitrógeno y Fósforo. Para suplir esta necesidad del suelo, tiene que recurrir a la compra de fertilizantes, los cuales son de alto costo económico y además deterioran

el suelo ocasionándole baja rentabilidad del cultivo. Lo que hace necesario buscar alternativas de solución al problema (Calderón, 1998).

Almaráz & Ferrera, 2002, señalan que La Fijación Biológica de nitrógeno es una alternativa que puede ocupar un papel fundamental en las entradas de nitrógeno a los sistemas vía biológica. La simbiosis leguminosa - *Rhizobium* puede fijar de 24 a 584 Kg de Nitrógeno por hectárea. Sin embargo, señalan que, la cantidad de Nitrógeno que puede fijar la simbiosis está en función de la cepa de rizobio, la planta y los factores ambientales. Por lo que la selección de cepas de rizobios y variedades de leguminosas ha sido importante para incrementar la fijación de Nitrógeno en las leguminosas cultivadas.

Asimismo los autores antes citados, mencionan que durante las últimas décadas se ha generado toda una biotecnología basada en la selección de cepas de rizobios con características sobresalientes como la habilidad de las cepas para nodular la leguminosa, habilidad para formar simbiosis efectiva con el hospedante, competencia con las cepas nativas del suelo y persistencia en ausencia del hospedante. Todo esto a fin de producir inoculantes específicos para la producción de leguminosas a fin de incrementar la fijación de Nitrógeno y lograr abastecer de esta manera a las plantas del Nitrógeno que necesitan para su desarrollo.

Por lo anteriormente mencionado ha sido el interés de la presente investigación contribuir en el estudio de la Simbiosis Leguminosa- *Rhizobium* en El Salvador por su importancia en la Fijación Biológica de Nitrógeno; planteándose los siguientes objetivos: Aislar cepas nativas de *Rhizobium sp.* que hacen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Evaluar el grado de infectividad de *Rhizobium sp.* procedente de tres localidades con tres variedades de frijol y recomendar las variedades de frijol más adaptables a los rizobios presentes en los suelos de las tres localidades.

## II- FUNDAMENTO TEÓRICO

El Nitrógeno, considerado como el ladrillo que construye la vida, es un componente esencial del ADN, del ARN, y de las proteínas. Todos los organismos requieren nitrógeno para vivir y crecer. A pesar que la mayoría del aire que respiramos es  $N_2$ , la mayoría del nitrógeno en la atmósfera no está al alcance para el uso de los organismos. La razón reside en que debido al fuerte enlace triple entre los átomos N en las moléculas de  $N_2$ , el nitrógeno es relativamente inerte. En realidad, para que las plantas y los animales puedan usar nitrógeno, el gas  $N_2$  primeramente tiene que ser convertido a una forma química disponible como el amonio ( $NH_4^+$ ), el nitrato ( $NO_3^-$ ), o el nitrógeno orgánico (WEB 11).

El Nitrógeno es un elemento increíblemente versátil que existe en forma inorgánica y orgánica, a la vez que en muchos y diferentes estados de oxidación. El movimiento del nitrógeno entre la atmósfera, la biósfera y la geósfera es a lo que se le denomina Ciclo del Nitrógeno. Éste es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes. Al igual que el ciclo carbónico, el ciclo del nitrógeno consiste en varios bancos o bolsas de almacenamiento de nitrógeno y de procesos por los cuales las bolsas intercambian nitrógeno.

Los procesos principales que componen el ciclo del nitrógeno que pasa por la biósfera, la atmósfera y la geósfera son cinco: la fijación del nitrógeno, la toma de nitrógeno (crecimiento de organismos), la mineralización del nitrógeno (desintegración), la nitrificación y la desnitrificación. Los microorganismos, particularmente las bacterias, juegan un importante papel en todas las principales transformaciones del nitrógeno. Como procesos de mediación microbianos, estas transformaciones de nitrógeno ocurren generalmente más rápido que los procesos geológicos (WEB 11).

El proceso de reducción de  $N_2$  requiere de mucha energía y solamente puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por un grupo restringido de microorganismos

tales como: Bacterias Gram negativas de vida libre en el suelo, como el género *Azotobacter*. Este género comprende bacterias grandes, levaduriformes, aerobias estrictas, no esporógenas y Gram negativos; son mesófilas y su temperatura óptima de desarrollo es de 30 °C. La eficacia media en relación con el N<sub>2</sub> fijado por unidad de azúcar descompuesto es de 5 – 10 g, lo cual se cataloga como bajo. El pH óptimo de crecimiento es de 6 y a niveles inferiores disminuyen las cantidades de N<sub>2</sub> fijado y hasta puede inhibirse su actividad metabólica.

Bacterias simbióticas de algunas plantas, en las que viven de manera generalmente endosimbiótica en nódulos, principalmente localizados en las raíces. Hay multitud de especies pertenecientes al género *Rhizobium*, que guardan una relación muy específica con el hospedador, de manera que cada especie alberga la suya. Cianobacterias de vida libre o simbiótica. Las cianobacterias de vida libre son muy abundantes en el plancton marino y son los principales fijadores en el mar, son un tipo de bacterias que contienen clorofila y pigmentos fotosintéticos que utilizan para captar la energía de la luz solar y sintetizar azúcares. Pueden ser unicelulares o filamentosas, de hasta 0,5 mm de largura (WEB 12).

Brock & Madigan, 1993, señalan que una de las interacciones más interesante e importante planta-bacteria es la que hay entre plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium sp.* Las leguminosas son un grupo de plantas que incluyen especies de gran importancia económica como trébol, alfalfa, frijol, chícharos entre otros.

Las leguminosas se cuentan entre las familias más numerosas, con unas 19.000 especies distribuidas por ambientes muy dispares. Se admite que deben ese éxito adaptativo a su capacidad para fijar nitrógeno, lo que les permite colonizar suelos pobres en nutrientes (WEB 1).

De acuerdo a Brock & Madigan 1993, la infección de las raíces de una planta leguminosa con la especie apropiada de *Rhizobium*, provoca la formación de nódulos

en las raíces los cuales son capaces de llevar a cabo la conversión de Nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) a nitrógeno combinado; proceso que se denomina Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Las bacterias que viven en los nódulos proporcionan a la planta todo el Nitrógeno que requiere y la planta aporta a la bacteria compuestos orgánicos como azúcares, necesarios para el metabolismo bacteriano. Por tanto existe una correlación entre fotosíntesis y fijación de nitrógeno.

## II.1 DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA RHIZOBIACEAE

Rivas et al., 1990: en su revisión de literatura señala que la familia Rhizobiaceae está compuesta por bacterias aerobias obligadas, Gram negativas, constituida por tres principales géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium*.

Estos moran en el suelo y habitan en las zonas geográficas donde existe la planta con la que establecen simbiosis en donde la diversidad genética bacteriana tiene que ver con la manifiesta habilidad para sobrevivir y adaptarse a distintas condiciones de suelo y clima, así como para acoplarse a las variaciones que también existen dentro de las plantas de una misma especie (WEB 1).

Los géneros pertenecientes a la familia Rhizobiaceae no son particularmente exigentes en materia de nutrición, pueden usar azúcares, alcoholes y ciertos ácidos como fuentes de energía, el extracto de levadura provee factores de crecimiento y vitaminas que usualmente mejora el crecimiento, algunas especies pueden producir sus propios factores de crecimiento (FAO 1985).

El género *Bradyrhizobium* spp. Son bacilos Gram negativos considerados como bacterias de “crecimiento lento” ya que tienen un tiempo de generación de 6 a 8 horas y producen colonias planas o convexas, opacas o translúcidas y de textura variable (según CIAT citado por Rivas et al, 1990), miden 1 mm de diámetro en 7 a 10 días (FAO 1985).

*Agrobacterium* tiene muchas características parecidas a los rizobios de crecimiento rápido puede formar nódulos en algunas leguminosas pero no tiene la capacidad de fijar nitrógeno. La prueba de la Ketolactasa se emplea para diferenciar los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, de acuerdo a esta prueba los rizobios se siembran en medio Levadura-Lactosa-Agar y después de observado el crecimiento el medio se cubre con 10 a 15 ml de reactivo de Benedict; la formación de un color amarillo después de 10 minutos indica la presencia de *Agrobacterium* (CIAT, 1988).

### II.1.1 Descripción del género *Rhizobium*

Clasificación taxonómica (tomado de Dolmuz, 1992)

**Reino:** Procariota

**División:** Escotobacteriales

**Clase:** Schizomycetes

**Orden:** Eubacteriales.

**Familia:** Rhizobiaceae.

**Género:** *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos Gram negativos, aerobios que no forman esporas se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. y son capaces de formar nódulos en raíces de leguminosas, estableciendo una relación de simbiosis. Dentro del nódulo tienen forma bacteroide de 0.5 a 0.9 micras de ancho por 1.2 a 3.0 micras de largo; pero en medio de cultivo Levadura-Manitol-Agar son bacilos móviles que requieren para su óptimo crecimiento un pH entre 6 y 7 (Guzmán, et al. 1996).

En el laboratorio, las bacterias del género *Rhizobium* son consideradas como bacterias de “crecimiento rápido” las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en LMA. El crecimiento en medio de carbohidratos está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de gelatina

polisacáridos extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina (H), ácido nicotínico (B<sub>3</sub>), pantotenato (B<sub>5</sub>) o tiamina (B<sub>1</sub>) como factores de crecimiento. Hay nueve especies definidas, nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales (WEB 2). La temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 30 °C (FAO 1985).

## II. 2 SIMBIOSIS LEGUMINOSA - RHIZOBIUM

La simbiosis Leguminosa- *Rhizobium* es considerada la más promisoría asociación planta-bacteria en el trópico, para el incremento inmediato en proteínas, a través de la fijación biológica del nitrógeno (Asociación Latinoamericana de Rhizobiología, 1982).

El establecimiento de la simbiosis entre una leguminosa y *Rhizobium*, para atrapar el nitrógeno, es un proceso complejo; donde la formación de nódulos y la captación del nitrógeno se realizan en etapas sucesivas. *Rhizobium* induce en la leguminosa al desarrollo de nódulos en su raíz, los dos organismos establecen una cooperación metabólica, las bacterias reducen N<sub>2</sub> a amonio (NH<sub>4</sub>), el cual exporta el tejido vegetal para su asimilación en proteínas y otros compuestos nitrogenados complejos, las hojas reducen el CO<sub>2</sub> en azúcares durante la fotosíntesis y lo transportan a la raíz donde los bacteroides de *Rhizobium* lo usan como fuente de energía para proveer ATP al proceso de inmovilizar nitrógeno (WEB 3).

En condiciones normales ni la leguminosa ni el *Rhizobium* por si solos son capaces de fijar nitrógeno, sin embargo la interacción entre ellos da lugar a la capacidad para fijarlo. Existen muchos genes de rhizobium característicos en la simbiosis como por ejemplo los genes *nod*, *nol*, *nif* y *fix*. Cada tipo de *Rhizobium* tiene espectro específico de plantas con las que es capaz de formar nódulos (WEB 1).

Alrededor del 90% de todas las especies de plantas leguminosas pueden nodular. No obstante, existe una marcada especificidad entre la especie de la leguminosa y la cepa de *Rhizobium*. Esto implica que una cepa de *Rhizobium* será capaz de infectar a determinada leguminosa, pero no siempre será capaz de provocar la producción de nódulos fijadores de nitrógeno; porque si la cepa no es efectiva los nódulos formados serán pequeños, blanco verdosos, e incapaces de fijar Nitrógeno; si la cepa es efectiva el nódulo será grande, rojizo y fijador de nitrógeno. La efectividad está determinada por los genes de la bacteria que se pueden perder por mutaciones o adquirir por transformación genética (Brock & Madigan, 1993).

En el establecimiento de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, las bacterias sintetizan y secretan a la rizósfera metabolitos de naturaleza lipoquito-oligosacáridica denominados factores Nod (FN); los cuales actúan como señales simbióticas y juegan un papel esencial en la especificidad de la infección y en la formación del nódulo fijador de nitrógeno. Los FN inducen en los pelos radicales de la planta huésped varias respuestas, las cuales incluyen cambios en el influjo de calcio, inducción de proteínas conocidas como nodulinas, rearreglos del citoesqueleto, alteraciones en la morfología y en el crecimiento del pelo, morfogénesis de estructuras tipo nódulo, entre otros. Estos cambios, son inducidos a concentraciones muy bajas, lo cual aunado a que la estructura química de estos morfógenos, es un determinante de la especificidad de la bacteria por el huésped y sugiere la presencia de un receptor en la planta involucrado en la percepción y en la transducción de las señales disparadas por los FN. Recientemente, usando mutantes incapaces de nodular, se han identificado algunos genes de la familia de receptores tipo-cinasa, que están involucrados en la percepción y en la señalización inducida por estos metabolitos Nod (WEB 4).

### **II.2. 1 Reconocimiento entre planta y *Rhizobium***

Las raíces de plantas forman exudados que inducen la expresión de genes rhizobiales característicos en el comienzo de la simbiosis. Uno de esos factores

son flavonoides que producen una interacción con la proteína codificada por el gen *nodD*. La proteína NodD y las sustancias flavonoides forman parte del reconocimiento hospedador-específico debido a que no todos los flavonoides pueden interactuar con una NodD de una especie bacteriana dada. Después, las proteínas codificadas por los genes *nod* catalizan la formación de los metabolitos *nod*. Esos son oligómeros de N-acetil glucosamina con algunas alteraciones químicas (WEB1).

### **II.2.2 Invasión**

La invasión de las plantas se lleva a cabo por los pelos radiculares. Las bacterias inducen una curvación de esos pelos mediante el contacto con la planta y la producción de metabolitos *nod*. Las bacterias invaden las plantas mediante el desarrollo de canales de infección, por lo que se forman túneles transcelulares. Durante la penetración, y la simbiosis, las bacterias no quedan alojadas directamente dentro del citoplasma de las células de la planta hospedadora, sino que permanecen alojadas en "vesículas" rodeadas por una membrana derivada de la membrana citoplasmática de la célula de la planta (WEB1).

### **II.2.3 Nitrogenasa**

La Nitrogenasa es la enzima responsable de la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio en la simbiosis entre leguminosa y *Rhizobium*. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, compuesto por dos enzimas: dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa se encarga de transferir electrones a la dinitrogenasa, que unida a un cofactor de hierro y molibdeno reduce luego al  $N_2$  mediante una serie de reacciones. Para que esta reducción tenga lugar es necesaria la ausencia de  $O_2$ , incluso en organismos aerobios, pues este gas inactiva la nitrogenasa. En este proceso se reduce pues el nitrógeno a amoníaco, y éste será empleado luego para elaborar compuestos orgánicos (WEB 9).

## II.2. 4 Hidrogenasa

Esta proteína no es sintetizada por todas las especies de la familia Rhizobiaceae y cataliza la reacción de oxígeno con el hidrógeno formado durante la fijación del nitrógeno. De esta forma reduce la concentración del hidrógeno y del oxígeno dentro del nódulo. Existen especies de *Rhizobium* que tienen la posibilidad de utilizar la energía que resulta de esa reacción para formar ATP (WEB 1).

## II.2.5 Leghemoglobina

En el nódulo las condiciones precisas de O<sub>2</sub> son controladas por una proteína que se une con el O<sub>2</sub> llamada “Leghemoglobina”. Esta es una proteína roja que se encuentra siempre en nódulos sanos fijadores de N<sub>2</sub>. Su formación es inducida mediante la interacción simbiótica de leguminosa-*Rhizobium*.

La Leghemoglobina es una proteína globular que es codificada por un gen de la leguminosa, se localiza en el nódulo, fuera de la bacteria y es distinta para cada tipo de *Rhizobium* (WEB 3).

Esta es la encargada de proteger a la nitrogenasa de los altos niveles de oxígeno evitando la inactivación de esta enzima. La Leghemoglobina sirve como un “amortiguador de oxígeno”, haciendo un ciclo entre las formas oxidada (Fe<sup>3+</sup>) y la reducida(Fe<sup>2+</sup>) para conservar los niveles de O<sub>2</sub> libre dentro del nódulo a un valor bajo pero constante (Brock & Madigan, 1993).

Leghemoglobina es una proteína que contiene una porción hemo. La subunidad hemina es formada por las bacteroides, mientras que la globina es formada por la planta. Leghemoglobina es responsable del color rojo de los nódulos activos. Sirve para limitar la concentración de oxígeno dentro del nódulo. De esta forma los bacteroides reciben suficiente oxígeno para sobrevivir y se evita que la nitrogenasa sea inactivada por la presencia del oxígeno.

Después de la fase de fijación de nitrógeno, el color del nódulo llega a ser verde debido a la conversión de leghemoglobina en biliverdina.

### **II.2.6 Genes *nod***

Se diferencian en genes comunes de nodulación, *nodA*, *nodB* y *nodC*, y en genes *nod* que son hospedador-específicos. Existe una regulación de los genes de la fijación de nitrógeno sobre la base del gen *nodD*. El producto de este gen interactúa con los flavonoides característicos producidos por la planta hospedadora y por eso es responsable de la especificidad de las simbiosis. Debido a la interacción con los flavonoides de la planta, la proteína NodD activa la transcripción de genes, que por su parte tienen una "caja de nodulación". Esta se encuentra en la región donde está el promotor de los genes regulados por *nodD*. La expresión de estos genes es específica para la simbiosis (WEB 1).

Las diferentes cepas de *Rhizobium* son muy específicas de cada planta. Esta especificidad depende de un grupo de genes (genes *nod*) que están en el plásmido *sym* (WEB 8).

### **II.2.7 Regulación de la expresión de los genes simbióticos**

La especificidad de *Rhizobium* que nodula una leguminosa está determinada en el código genético y se dice que es la presencia de un plásmido en el ADN, plásmido que se trasmite a la bacteria por conjugación del *Rhizobium* específico (WEB 1).

El sistema FixLJ, NifA y RpoN, es un sistema de regulación de expresión de genes en relación a la concentración de oxígeno. Las proteínas FixL y FixJ tienen un papel importante en esta regulación. FixL se autofosforila y es capaz de transferir el fosfato a FixJ. En caso de baja concentración de oxígeno, se aumenta la concentración de FixJ fosforilada dentro de la célula. La proteína FixJ fosforilada activa los genes *nifA* y otros genes. *NifA* es un regulador positivo de

los genes necesarios para la fijación de nitrógeno. Un factor sigma necesario para la transcripción eficaz de muchos genes simbióticos es el *RpoN* (WEB 1).

### **II.3 Etapas en la formación del nódulo:**

El nódulo viene a ser un órgano de la leguminosa encargado de fijar y asimilar nitrógeno para la planta, y la planta le proporciona al nódulo carbohidratos producto de la fotosíntesis. Se ha establecido que la información genética que determina qué *Rhizobium* sea capaz de infectar específicamente una leguminosa y fijar nitrógeno en asociación con ella está codificada en cierta molécula de ADN extracromosómica conocidas como plasmidios. A cada especie de leguminosa le corresponde un *Rhizobium* específico.

De acuerdo a los autores Brock & Madigan, 1993 y WEB 3: el proceso de infección y desarrollo de nódulos en las raíces de leguminosas, presenta etapas características, las cuales se detallan a continuación:

#### **II.3.1 Reconocimiento de la pareja correcta por parte tanto de la planta como de la bacteria y fijación de la bacteria a los pelos radiculares.**

Las raíces de las plantas leguminosas secretan varias sustancias orgánicas que estimulan el desarrollo de una microflora en la rizósfera. Este estímulo no está restringido a los rizobios, sino que abarca muchas bacterias diferentes de la rizósfera. Si hay rizobios en el suelo, se desarrollan en la rizósfera y construyen altas densidades de poblaciones. La fijación en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* depende del reconocimiento apropiado de las macromoléculas de la superficie de los pelos superficiales de la raíz que interactúan con los polisacáridos de la superficie de la célula del *Rhizobium*. Estas macromoléculas son conocidas con el nombre de Lectinas, las cuales son proteínas vegetales que presentan una alta afinidad por residuos específicos de azúcar (esto explica la especificidad que existe entre la especie de leguminosa y la cepa de *Rhizobium*)

y son las responsables de adherir o fijar las células de *Rhizobium* al pelo de la raíz de la leguminosa.

### **II.3.2 Invasión de los pelos de la raíz por la formación bacteriana de una cadena infecciosa.**

Después que la bacteria de *Rhizobium* penetra en el pelo radicular a través de la punta de este, la bacteria prolifera y forma la llamada “ruta de infección”, que se extiende hacia la base del pelo radicular.

### **II.3.3 Viaje a la raíz principal por medio de la cadena infecciosa.**

La cadena infecciosa atraviesa la pared de la célula cortical adyacente quedando infectada. Si esta célula es del tipo diploide normal, generalmente es destruida por la infección, sufriendo necrosis y degeneración; pero si es una célula tetraploide, puede convertirse en la precursora de un nódulo. En la raíz siempre hay un pequeño número de células tetraploides que se han originado espontáneamente y si una de ellas queda infectada se estimula su división. Las divisiones progresivas de células infectadas de esta manera da lugar a la producción de un nódulo parecido a un tumor. Es muy probable que la producción de Citocininas por parte de la bacteria de *Rhizobium* tenga lugar en las células infectadas, ocasionando la división de las células tetraploides.

### **II.3.4 Formación de las células bacterianas deformadas, bacteroides, dentro de las células vegetales y desarrollo del estado fijador del nitrógeno.**

Las bacterias se multiplican rápidamente dentro de las células tetraploides y quedan rodeadas individualmente o en pequeños grupos por porciones de la membrana plasmática del hospedero. Las bacterias generalmente pierden su pared celular y son transformadas en formas ramificadas, edematosas,

contrahechas llamadas “bacteroides”. Únicamente después de que ha tenido lugar la formación de los bacteroides se inicia la fijación del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) el cual es reducido a amonio por acción de la enzima Nitrogenasa, localizada dentro de los bacteroides mismos y asimismo por la acción de la Leghemoglobina que se localiza en el nódulo fuera de las bacterias. El nódulo presenta zonas meristemáticas formadas por células pequeñas que no están contaminadas por *Rhizobium*, las cuales posibilitan el crecimiento del nódulo.

### **II.3.5 Formación del nódulo radicular maduro.**

En determinado momento, los nódulos se deterioran y liberan las bacterias hacia el suelo. Las formas de bacteroides son incapaces de dividirse, pero siempre queda un pequeño número de células en forma de bastón en dormancia. En estos momentos, dichas células proliferan empleando como nutrientes algunos de los productos del nódulo en deterioro y pueden iniciar la infección en otras raíces o mantener una existencia de vida libre en el suelo.

### **II.3.6 Caracterización de los nódulos:**

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en forma (esféricos, alargados o ramificados) y tamaño (0.5 – 5.0 mm de diámetro), pero siempre se destacan fácilmente de las raíces. El color interno de un nódulo vivo y activo varía de rojo claro a rojo oscuro, su consistencia es firme, y al abrirlo, sus tejidos liberan una savia de color rojo; los nódulos muertos tienen consistencia esponjosa y color interna oscura o negra. Los nódulos vivos que tienen una coloración interna verde o blanca son inactivos; los nódulos con coloración rojo o rosada no siempre son activos pero tienen mayor probabilidad de serlo. La localización de los nódulos en el sistema radical depende de la especie hospedante y de las condiciones ambientales. Sin embargo, en la mayoría de las leguminosas de uso agronómico los nódulos se encuentran cerca de la raíz principal y se les puede obtener fácilmente, cavando con cuidado alrededor de la planta con una pala o

una herramienta similar. Nunca debe halarse la planta para extraerla del suelo porque es muy probable que así se rompa la frágil ligazón que une los nódulos a las raíces, y gran parte de aquellos quedarían dentro del suelo (CIAT, 1988).

Las características morfológicas de los nódulos que indican efectividad son: grandes, compactos y un color rosado en su interior.

#### **II.4. Factores que afectan la nodulación y la fijación de N<sub>2</sub> en las leguminosas.**

**II.4.1 Nitrato del suelo:** La nodulación también está controlada por factores externos entre los que el nitrato del suelo resulta de especial significación. Las Leguminosas pueden obtener N a través de la absorción de N combinado del suelo (principalmente NO<sub>3</sub>), y mediante la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico. La presencia de N combinado es esencial en las primeras etapas de desarrollo de la mayoría de las leguminosas, una vez que han consumido las reservas de la semilla y antes de que la FBN (Fijación Biológica de Nitrógeno) esté suficientemente activa. Sin embargo, es bien conocido que el N combinado, sobre todo el NO<sub>3</sub>, inhibe las sucesivas etapas de la nodulación y el proceso de fijación de N<sub>2</sub>.

Se ha descrito que el NO<sub>3</sub>, inhibe estadíos tempranos de la nodulación como: la deformación de los pelos radiculares, el anclaje de Rhizobium a los mismos o el desarrollo de los cordones de infección. La presencia de NO<sub>2</sub> también retrasa la formación de los nódulos y disminuye la masa nodular.

Una vez desarrollados los nódulos, la aplicación de N combinado puede causar la inhibición de su actividad fijadora de N<sub>2</sub> y provocar una senescencia prematura. No obstante, existen diferencias entre las especies y cultivares de leguminosas en cuanto a su sensibilidad a la adición de NO<sub>3</sub>. (WEB 10)

**II.4.2 Hormonas:** en los nódulos radiculares de diversas leguminosas se pueden detectar cuatro tipos de hormonas vegetales, auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico todas ellas a concentraciones superiores a las

existentes en las raíces vecinas. Los rizobios producen auxinas, citoquininas y giberelinas. Si se suministran exógenamente, las fitohormonas pueden inhibir la formación de los nódulos, por lo que un posible papel inhibitor para estos reguladores podría estar en la autorregulación de la nodulación bloqueando el transporte, lo cual induce a la formación de estructuras parecidas a nódulos (nódulos vacíos o pseudonódulos (WEB 5)).

**II.4.3 Difusión de oxígeno:** durante los últimos años, la limitación de la actividad fijadora se ha relacionado con variaciones en la resistencia de la difusión de oxígeno en los nódulos; una menor disponibilidad de este elemento tendría como consecuencia una limitación en la capacidad de generar ATP por parte de los bacteroides, que serían incapaces de mantener la actividad nitrogenasa. La existencia de una capacidad, por parte de los nódulos, de regular el intercambio gaseoso, a través de la llamada barrera de difusión de oxígeno. La capacidad metabólica de los nódulos puede ser modificada debido a descensos en la actividad sacarosa sintasa, lo que conduce a una acumulación de sacarosa y una falta de sustratos respirables para los bacteroides. Como consecuencia de esta situación, los nódulos restringirían el flujo de oxígeno para evitar la inhibición irreversible de la nitrogenasa (WEB 5).

**II.4.4 Factores ambientales:** hay muchos factores limitantes de la simbiosis, pero presumiblemente las más importantes son: los elementos minerales, la temperatura, la luz, el agua, etc.

**II.4.4.1 Elementos minerales:** deficiencias o excesos en determinados elementos minerales afectan directamente o indirectamente en la nodulación, por ejemplo el molibdeno es un constituyente de la nitrogenasa, así que un defecto de Mo en el medio causa un efecto directo y negativo en la fijación del nitrógeno. Sin embargo el Fe (que también es un elemento constituyente de la nitrogenasa) no tiene un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno cuando este escasea en el medio. También

son importantes otros elementos como Calcio, Fósforo, Azufre, Cobre o Zinc ya que originan cambios en el pH que va a afectar directamente a la fijación. Los fertilizantes químicos utilizados tratan de influenciar un mayor crecimiento de la planta y una mayor fijación del nitrógeno (WEB 6).

**II.4.4.2 Temperatura:** esta interacción es de modo indirecto aparece de un modo no específico a través de los procesos metabólicos de la planta como respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración.

Con menos de 7° C la nodulación se hace muy poco probable. En el caso extremo de altas temperaturas, se reduce el número de raíces laterales y pelos radicales, haciendo que la probabilidad de nodulación sea menor. A temperaturas extremas tiene lugar una degradación de los nódulos (WEB 6).

**II.4.4.3 Luz:** afecta a la simbiosis a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Existen evidencias de algunos efectos directos de la luz sobre la nodulación, así es por ejemplo que la nodulación es pobre bajo luz azul y máxima bajo efecto de la luz roja; esto implica una evidencia de la participación del fitocromo reversible en el proceso de nodulación. Se han hecho experimentos con la defoliación gradual de las plantas y se ve claramente como hay una reducción en la fijación del nitrógeno.

**II.4.4.4 Agua:** las deficiencias en la disponibilidad de agua causan una disminución en la fijación del nitrógeno en leguminosas de todo el mundo, de todos modos hay diferentes adaptaciones de estas plantas a las diversas condiciones de sequía.

**II.4.4.5 Otros factores:** pueden ser los gases que hay en el terreno, las enfermedades como hongos, virus o micoplasmas (se ha estimado que

estas enfermedades causan una pérdida de al menos el 24 % de las leguminosas del forraje) (WEB 6).

## **II.5. Aprovechamiento de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* para la optimización del rendimiento de los cultivos de leguminosas de una manera ambientalmente sana.**

El uso racional de insumos agrícolas y la utilización de otras alternativas de producción que no dañen al ambiente son indispensables para lograr una agricultura sostenible y ambientalmente sana. La Fijación Biológica de Nitrógeno es una de esas alternativas que permite la entrada de nitrógeno a los sistemas vía biológica. Ya que se estima que alrededor de 175 millones de toneladas métricas de nitrógeno se fijan biológicamente cada año, lo que equivale a un poco más de dos veces la producción mundial de fertilizantes nitrogenados. Entre los diversos organismos que fijan el nitrógeno del aire, las plantas leguminosas y *Rhizobium* son tal vez las más sobresalientes por la cantidad de nitrógeno que pueden aportar a los sistemas agrícolas, ya que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa puede fijar de 24 a 584 kg de nitrógeno por hectárea (Almaraz & Ferrera, 2002).

Sin embargo, la cantidad de nitrógeno que puede fijar la simbiosis está en función de la cepa de *Rhizobium*, la planta y los factores ambientales. Por lo que la selección de cepas de *Rhizobium* y variedades ha sido importante para incrementar la fijación de nitrógeno en las leguminosas cultivadas. En las últimas décadas se ha generado toda una biotecnología basada en la selección de cepas de *Rhizobium* con características sobresalientes y en la producción de inoculantes, provenientes de estas cepas, para inducir la simbiosis y lograr de esta manera abastecer en lo posible a las leguminosas del nitrógeno que necesitan para su desarrollo sin recurrir al uso de fertilizantes químicos (Almaraz & Ferrera, 2002).

De acuerdo al autor antes citado: Entre las características más importantes que se deben considerar en la selección de cepas de *Rhizobium* están: habilidad de la

cepa para nodular la leguminosa (infectividad), habilidad para formar simbiosis efectiva con el hospedante (eficiencia para la fijación de Nitrógeno), competencia con las cepas nativas del suelo y persistencia en ausencia del hospedante.

## **II.6 Importancia del cultivo de frijol en El Salvador**

De acuerdo a Pérez y Reyes, 2002; el frijol es el cultivo más importante entre las leguminosas de grano, por la superficie de siembra cultivándose en todo el país desde los 100 hasta los 1500 m.s.n.m, como por los ingresos que genera como producto de consumo interno.

Tiene mucha importancia en la dieta alimenticia de la población por su valor alimenticio conteniendo de 20 a 25% de proteínas, 1.6% de lípidos, cerca de 60% de hidratos de carbono y además, minerales como Calcio, Fósforo, Hierro, entre otros.

Es por ello que instituciones como el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) a través de sus programas de innovación y el uso de tecnología generan e introducen nuevas variedades de frijol que cumplan con características que permitan mejores resultados en la producción de este grano básico.

Dentro de las variedades que se les ha entregado a los agricultores por sus destacadas características se tienen:

### **II.6. 1 CENTA Pipil (CENTA, 2005).**

Fue introducida originalmente al país en 1998 como línea experimental PRF9653-16B-3 del vivero de Líneas Tolerantes a Altas Temperaturas (LITOLAT). Fue sembrada por primera vez en el distrito de riego Lempa Acahuapa, siendo seleccionada por sus buenas características en ese ambiente de altas temperaturas. Posteriormente fue sembrada en Santa Cruz Porrillo y seleccionada por las mismas características. En ambientes normales muestra un alto potencial de rendimiento, además de la resistencia o tolerancia a algunas enfermedades. Esta nueva variedad se deriva de la cruce triple bribri/MD30-

37//RS3 Realizada en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras 1996. Tiene un rendimiento promedio de 35qq/mz y el color del grano es rojo brillante.

#### **II.6.2 CENTA San Andrés (CENTA, 2002).**

La variedad de frijol CENTA San Andrés se deriva de la cruce CENTA 2000 x DICTA 105, realizada en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano Honduras. Fue introducida al país en 1998 como línea EAP9510-77, a través del Vivero de Adaptación Centroamericano (DIDAC) con el apoyo de PROFRIJOL, CENTA San Andrés es una variedad resistente al virus del Mosaico Dorado del frijol, presenta buena tolerancia a altas temperaturas, alto potencial de rendimiento, amplia adaptación y excelente calidad comercial del grano. Tiene un rendimiento de 33qq/mz y el color es rojo brillante.

#### **II.6.3 Frijol de Seda (CENTA, 1993).**

A pesar que esta variedad es susceptible a virus y plagas de la semilla y del suelo, sigue siendo cultivada por los agricultores por ser más atractivo para el consumidor. Rinde 25qq/ mz.

### III. METODOLOGIA

El desarrollo de la presente investigación consistió de dos fases denominadas, Fase de Campo y Fase de Laboratorio.

#### III.1 FASE DE CAMPO.

##### III.1.1 UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS DE ESTUDIO (FIGURA 1)

El material experimental utilizado en esta investigación fue colectado de terrenos agrícolas localizados en los departamentos de San Vicente, San Salvador y La Libertad. Estos departamentos se caracterizaron por presentar una abundante producción de frijol durante la cosecha 2004-2005, de acuerdo a las estadísticas de superficie y producción de frijol por departamento, del Ministerio de Agricultura y Ganadería ( anexo 1).

Las localidades donde se realizaron las colectas fueron las siguientes:

**a) Cantón El Paraíso, municipio de San Sebastián, departamento de San Vicente**, situado a 2.7 Km. al Noreste de la ciudad de San Sebastián. Ubicado entre LN 13°43'55'' y LWG 88°47'53'' con una elevación de 580 m.s.n.m (Ministerio de Obras Publicas, 1985). La humedad relativa es de 73%, la temperatura promedio anual es 26.8 ° C, la velocidad del viento es de 5.6 Km/h, y la precipitación anual es 1626 mm (Centro de Meteorología e Hidrología, 1993). El tipo de suelo presente en la zona es Litosol (Ministerio del Medio Ambiente, 2000).

**b) Cantón Zapotitán, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad**. situado 4 km. Al sur de Ciudad Arce. Se encuentra ubicado entre LN 13°48'13'' y LWG 89°27'05'' con una elevación de 510 m.s.n.m. (Ministerio de Obras Publicas, 1985).

La velocidad del viento es de 5.5 Km/h, la temperatura promedio anual es 23.8 ° C, la humedad relativa anual es de 76%, el promedio de precipitación anual es 1601 mm (Centro de Meteorología e Hidrología, 1993). El tipo de suelo es Aluvial, según las Coberturas Nacionales del Ministerio del Medio Ambiente del año 2000.

**c) Finca Bethania**, ubicada aproximadamente a 500 metros de la Urbanización Vista al Lago, jurisdicción de los cantones Changallo, municipio de Ilopango, y El Guaje, Municipio de Santo Tomás, del departamento de San Salvador. Situada entre LN 13°40'0" y LWG 89°7'15" En esta zona hay una precipitación de 1800 mm. La temperatura varía entre los 22.5 a 27.5 ° C. y la altura fluctúa entre los 500 a 1000 m.s.n.m (Fundación ABA, 2002). La precipitación anual es de 1754 mm con una humedad relativa anual de 76%, la velocidad del viento es de 8.3 Km/h (Centro de Meteorología e Hidrología, 1993) De acuerdo a Coberturas Nacionales 2000 del Ministerio del Medio Ambiente el tipo de suelo es Litosol-Andisol.

### **III.1.2. MATERIAL EXPERIMENTAL**

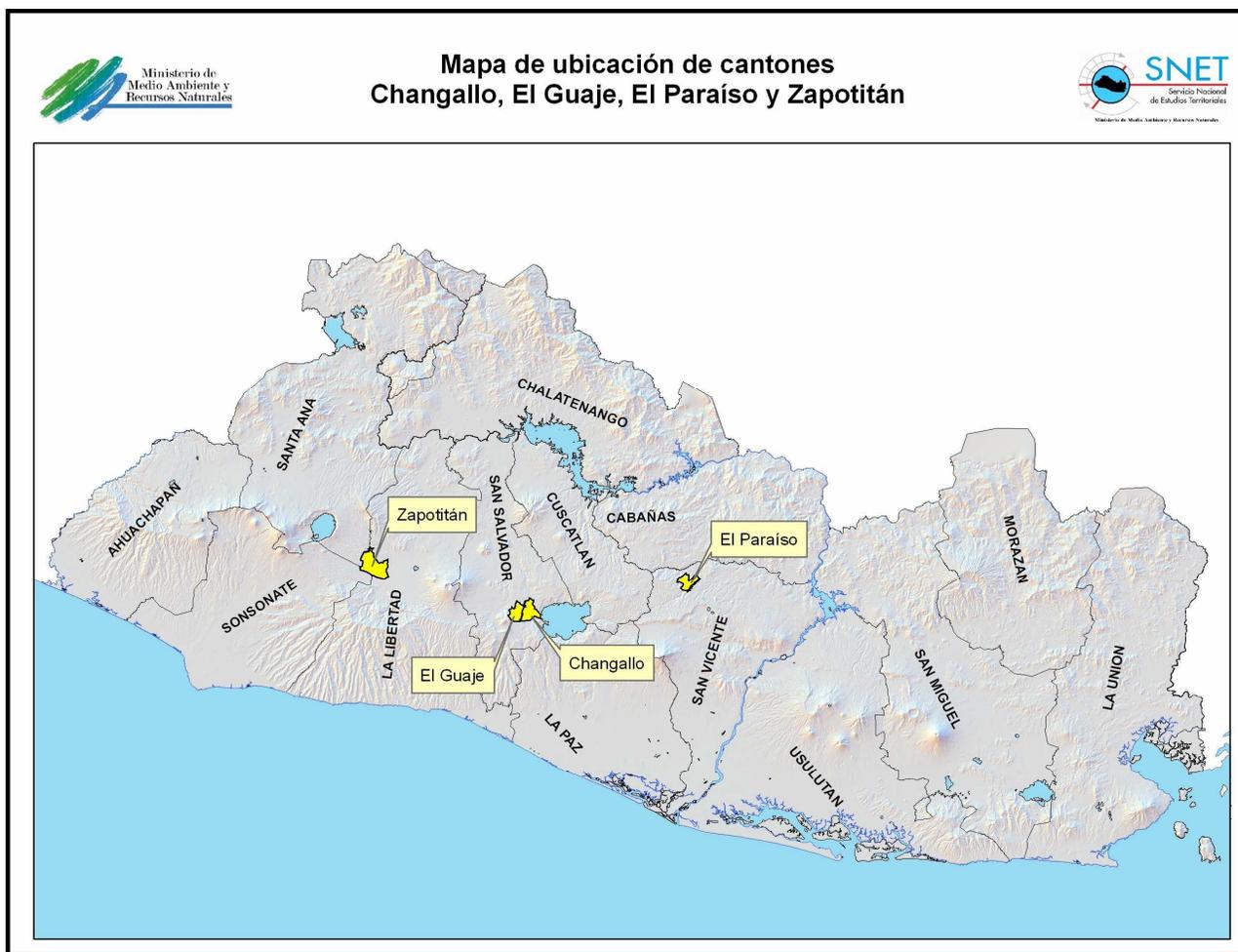
El material experimental para el aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium sp.* consistió de nódulos provenientes de las raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris L.* cultivadas en las localidades seleccionadas. Se colectaron aquellos nódulos que presentaron las características de estar vivos y ser efectivos: grandes, firmes o compactos y de color rojo claro a oscuro en su interior. Para lo cual se abrieron algunos nódulos en el momento de la colecta para verificar la presencia de esa coloración roja característica de los nódulos activos.

#### **III.1.2.1 Colecta del Material Experimental**

Con el propósito de colectar nódulos provenientes de los cultivos de frijol, en las zonas seleccionadas, se realizó una visita a cada uno de los lugares para

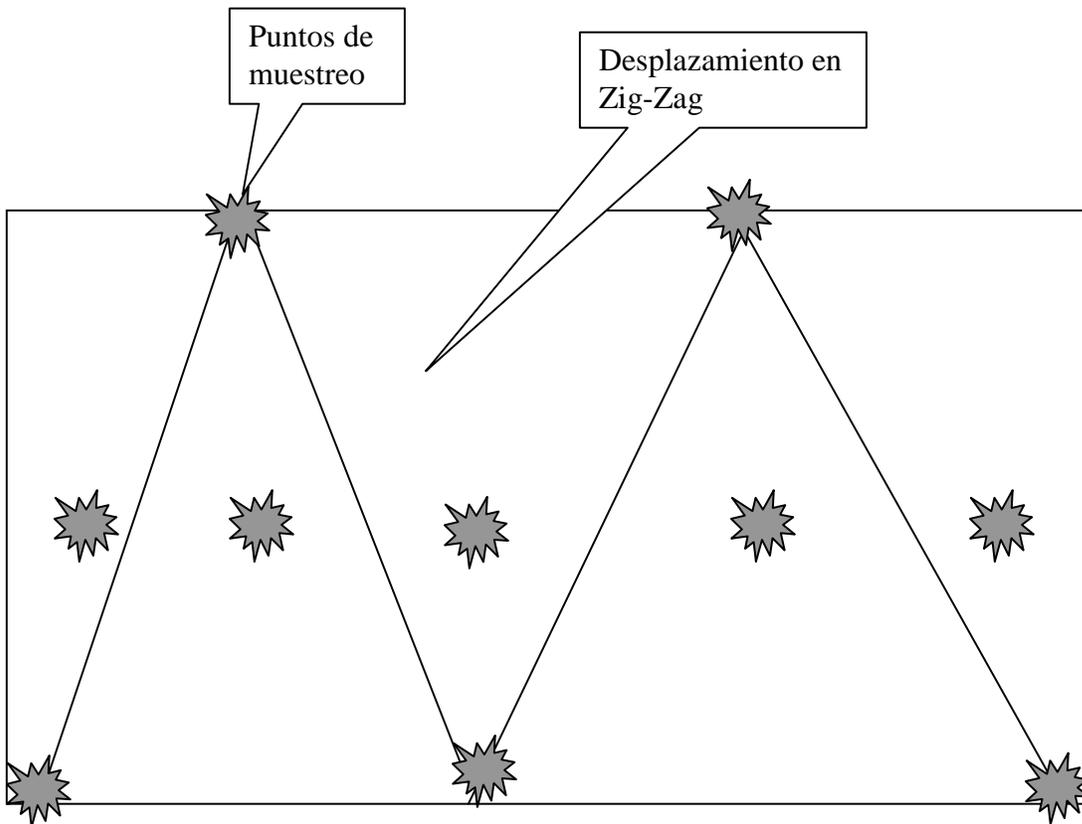
contactar a los dueños de los cultivos; obteniéndose el permiso, para la extracción de las plantas de frijol. Los muestreos se realizaron en parcelas de 1.5 manzanas (aproximadamente 1 Hectárea), una en cada localidad (Anexo 2), durante la época de floración de las plantaciones de frijol; correspondiente al período de mayor actividad de los nódulos. En cada parcela, se realizó un muestreo, con un patrón de recorrido al interior de la parcela en forma de zig-zag (ver figura 2). Obteniéndose puntos de muestreo en cada vértice donde se cambió la dirección del recorrido y en cada uno de los espacios que quedaron al interior de la parcela. En total se obtuvieron diez puntos de muestreo, cinco en los costados y cinco al centro de la parcela. De cada punto, en un radio de circunferencia de aproximadamente 1.5 m se seleccionó una planta fenotípicamente sana y vigorosa que se encontraba en fase de floración. Posteriormente utilizando una “cuchara de albañilería” se excavó alrededor de la planta y se procuró extraer completo su sistema radical. Una vez extraída la planta se procedió a coleccionar de las raíces todos aquellos nódulos con características de efectividad. Para coleccionar y preservar los nódulos de cada planta, se usaron frascos plásticos opacos con tapa. Conteniendo en su interior sílica-gel y sobre ésta una capa de algodón para evitar el contacto directo con los nódulos. La sílica-gel actúa como un desecante que permite preservar los nódulos mientras estos no son utilizados (Anexo 3). Cada frasco se identificó con el nombre del lugar de recolección, la hora de colecta, número de muestra y si los nódulos fueron coleccionados al centro o a los costados de la parcela. Posteriormente las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología Celular y Genética Molecular de la Escuela de Biología, donde se mantuvieron en refrigeración a 4° C. Durante este trabajo se realizaron dos muestreos, debido a que el material coleccionado en el primero fue insuficiente. El primer muestreo se realizó en los meses de Octubre de 2005 y Enero de 2006. El segundo se realizó en los meses de Junio, Julio y Diciembre de 2006.

**FIGURA 1: UBICACIÓN DE LOS CANTONES EN DONDE SE REALIZARON LOS DOS MUESTREOS DE COLECTA DE NODULOS DE PLANTAS DE FRIJOL EN LOS MESES DE OCTUBRE 2005, ENERO 2006; JUNIO, JULIO Y DICIEMBRE DEL 2006 (Sistema Nacional de Estudios Territoriales SNET).**



Ana Maria Araujo, 2006. Departamento de Hidrología. Sistema Nacional de Estudios Territoriales

**FIGURA 2. MÉTODO DE MUESTREO CON RECORRIDO EN ZIG-ZAG**  
(Tomado de Reyes, 2005 & WEB 7)



Área de parcela = 1.5 manzanas  $\approx$  1 Hectárea

---

Reyes, Jesús.2005. Catedrático de la Escuela de Biología. Universidad de El Salvador. Comunicación personal.

## **III.2. FASE DE LABORATORIO:**

### **III.2.1. AISLAMIENTO DE CEPAS DE *RHIZOBIUM SP.***

El trabajo de aislamiento de los rizobios contenidos en los nódulos colectados durante la fase de campo; se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología y Biología Celular y Genética Molecular de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática; y en el Laboratorio del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas, en la Universidad de El Salvador.

Se Tomó como base la metodología descrita por el CIAT, 1988 y que fue utilizada por Guzmán *et al*, 1996. A la que se le efectuó algunas variantes, que fueron requeridas durante el proceso de investigación.

#### **III.2.1.1. Material Experimental colectado**

En el laboratorio, las muestras de nódulos fueron puestas en refrigeración a 4° C. Y debido a que los nódulos no fueron utilizados inmediatamente después de ser colectados, se optó por su preservación. Para lo cual se les cambió varias veces la sílica-gel, hasta que ésta dejó de absorber humedad. Luego cada frasco fue sellado con película selladora para laboratorio Parafilm M y se mantuvieron en refrigeración. Hasta que se inició la fase de laboratorio en Mayo de 2006 finalizando en Enero del 2007.

#### **III.2.1.2. Lavado e hidratación de los nódulos:**

Los nódulos preservados en refrigeración, fueron primeramente lavados, a unos se les aplicó simplemente agua proveniente directamente del grifo y a otros se les aplicó un poco de jabón de baño y agua con la finalidad de eliminar las partículas de tierra y otras impurezas que los recubrían. Luego ambos

grupos fueron sumergidos, por espacio de una a dos horas, en agua destilada estéril a temperatura ambiente para hidratarlos (Anexo 4).

### **III.2.1.3. Esterilización superficial de los nódulos:**

Para la esterilización superficial de los nódulos, en una cámara de flujo laminar se practicaron los siguientes procedimientos y variantes:

- i) Para la esterilización se utilizaron cajas Petri estériles. Los nódulos previamente hidratados, fueron expuestos por espacio de 1 minuto en alcohol Etílico al 70% contenido en la primera caja Petri; luego se trasladaron a la segunda caja con Hipoclorito de Sodio comercial (lejía) al 3% por espacio de 3 minutos. Posteriormente, los nódulos fueron lavados 5 veces en agua destilada estéril contenida en igual número de cajas.
- ii) También se utilizó el procedimiento anterior, con la variante que se disminuyó el tiempo de exposición al Hipoclorito de Sodio de la siguiente manera: 2.5, 2.0, 1.5 y 1.0 minutos.
- iii) Otra forma fue descartándose el Hipoclorito de Sodio y se utilizó para la esterilización únicamente alcohol Etílico al 70%, al cual fueron expuestos los nódulos probando diferentes tiempos: 1.0, 1.5 y 2.0 minutos. Enjuagándose siempre los nódulos 5 veces con agua destilada estéril.
- iv) Finalmente se esterilizaron los nódulos empleando alcohol Etílico al 95% contenido en una caja Petri, sumergiéndolos por 2 minutos y luego enjuagándolos 5 veces con agua destilada esterilizada.

Al finalizar la esterilización, los nódulos fueron colocados en cajas petri estériles, que contenían papel toalla, para que éste absorbiera el exceso de humedad de los nódulos (Anexo 4).

#### **III.2.1.4. Aislamiento e incubación de los Rizobios:**

Para el aislamiento se utilizó medio de cultivo Levadura-Manitol-Agar (LMA) (Anexo 5). Con un pH entre 6.8-7.0, contenido en cajas Petri, al cual se le adicionó indicador Rojo Congo, empleándose las siguientes técnicas de aislamiento:

- Cada nódulo esterilizado fue tomado con una pinza de disección, previamente sumergida en alcohol etílico al 70% y flameada en el mechero. El nódulo fue presionado con la pinza, procurando que su contenido se vaciara en la caja Petri conteniendo LMA más Rojo Congo. Luego ese contenido fue extendido por estrías con un Asa bacteriológica (Anexo 6).
- Después de ser debidamente identificadas, las cajas Petri fueron selladas con película selladora para laboratorio Parafilm M y luego fueron cubiertas utilizando papel periódico o papel empaque (Anexo 6). Ya que los rizobios no absorben el rojo congo, cuando las cajas Petri se incuban en la oscuridad; mientras que otros microorganismos contaminantes si lo absorben (lo cual permite diferenciar los rizobios de los contaminantes). Posteriormente las cajas Petri fueron puestas en incubación durante 48 a 72 horas a temperatura ambiente, en posición invertida, para evitar que el líquido de condensación goteara sobre la superficie del medio.

#### **III.2.1.5. Purificación de las cepas:**

Pasado el tiempo de incubación se descartaron las cajas que presentaron mucha contaminación y a las colonias que crecieron en las Cajas Petri con menos contaminación y que presentaron las características típicas de *Rhizobium*: morfología plana o convexa, textura elástica o cremosa y apariencia gelatinosa se les hizo la Prueba de Tinción de Gram (Anexo 8), para determinar la presencia de *Rhizobium*, ya que son bacilos gram negativos. Las colonias que resultaron ser efectivamente *Rhizobium* fueron subcultivadas varias veces, haciendo dos repeticiones por cada cepa; siendo considerada como una cepa,

el crecimiento obtenido en cada caja Petri a partir de un solo nódulo perteneciente a una planta de *Phaseolus vulgaris*.

También se emplearon los métodos de dilución y siembra por extendido para la purificación de las cepas de (Anexo 7). Se utilizaron 4 tubos de ensayo con tapón de rosca, al primero de los cuales se le agregó 10 ml de agua destilada y 9 ml a los restantes, esterilizándose en autoclave.

Se suspendió una colonia individual en el primer tubo, agitándose posteriormente con ayuda del vórtex. Luego de este primer tubo se extrajo 1 ml de la suspensión y se adicionó al segundo tubo de ensayo, agitándose de igual manera con el vórtex. Este procedimiento se repitió con los restantes dos tubos obteniéndose diluciones 1 / 10, 1 / 100, 1 / 1000 y 1 / 10000.

De cada una de las diluciones se tomó 1 ml y se transfirió a medios de cultivo LMA contenidos en cajas Petri, una para cada dilución. El extendido se realizó con un ángulo de vidrio estéril con movimientos en sentido de las agujas del reloj.

### **III.2.2. PRUEBA DE INFECTIVIDAD ENTRE VARIEDADES DE FRIJOL Y LOS RHIZOBIOS PROVENIENTES DE LAS LOCALIDADES.**

Esta prueba consistió en evaluar la compatibilidad genética existente entre los Rizobios procedentes de las localidades: San Sebastián, Finca Bethania, Zapotitán y las variedades de frijol: Rojo de Seda, CENTA Pipil y CENTA San Andrés; através de la medición de la capacidad que tuvieron estos rizobios para infectar las tres variedades de frijol; para lo cual se desarrolló la siguiente metodología:

### **III.2.2.1. Montaje y manejo del experimento.**

Primeramente se construyeron los dispositivos denominados “Jarras de Leonard”, utilizando 36 botellas de vidrio de 750 ml y 36 botellas de vidrio de 1 L; 39.69 lb de arena, tela de algodón, papel aluminio, plástico adhesivo, 27 L de solución nutritiva de Sandman, 4.5 L de solución de calcio, papel Kraft, 24 semillas germinadas de cada una de las tres variedades de frijol y los inoculantes hechos a partir de los nódulos colectados en las tres localidades. El procedimiento se detalla a continuación:

#### **III.2.2.1.1. Preparación de la arena de río**

Se prepararon 50 Lb. de arena las cuales fueron pasadas por un tamiz de un poro de aproximadamente 3mm de diámetro, con la finalidad de que no quedara gruesa.

Luego para lavar la arena y eliminar cualquier resto de material orgánico se utilizó una solución de 0.333 L de HCL puro diluido en 1.665 L de agua. La arena se colocó en un recipiente plástico profundo, agregándole el HCL diluido, luego se completó con agua hasta un nivel que cubrió la arena totalmente y se mezcló bien con ayuda de una paleta de madera de aproximadamente 1.5 m y se dejó reaccionar durante 24 horas, posteriormente se introdujo una manguera hasta el fondo del recipiente y se dejó fluir el agua, mezclándose la arena constantemente con la paleta de madera, para que la arena se lavara.

#### **III.2.2.1.2. Construcción de las jarras de Leonard (FIGURA 3).**

La parte superior de la jarra se construyó a partir de una botella de vidrio de 750 ml de capacidad, a la que se le quitó el fondo tomando la forma de un embudo, la parte inferior de la jarra la constituyó una botella de vidrio de 1 L

de capacidad a la cual se le cortó el cuello quedando en forma de vaso. Para cortar las botellas se usaron los siguientes métodos:

- Se usó cordel el cual era sujetado en la zona de la botella donde se deseaba partirla, se le agregaba alcohol y se le encendía fuego con un cerillo; inmediatamente la llama se terminaba, la botella era sumergida en un recipiente plástico lleno de agua, partiéndose de esta manera la botella.

- Debido a que muchas de las botellas no pudieron ser partidas por el primer método, también se optó por usar una resistencia eléctrica, para calentar el área de la botella donde se requería partir; luego de calentada de 2 a 3 minutos de manera uniforme, se sumergía en el recipiente plástico que contenía agua, lográndose de ésta manera cortes más uniformes.

Se cortaron un total de 72 botellas de vidrio, a las cuales se les colocó en las orillas cortadas, papel aluminio, para evitar heridas a la hora de manipularlas.

A la parte en forma de embudo se le colocó una mecha de tela de algodón en el cuello y fue rellena con 500 gr de arena de río previamente preparada. Luego se incrustó el cuello del embudo conteniendo la mecha de algodón, en la botella en forma de vaso la cual contenía 750 mililitros de solución nutritiva de Sandman (Anexo 9) la cual ascendió hasta la parte superior de la jarra por capilaridad. Luego se cubrió la parte superior de la botella con papel aluminio. Se construyó un total de 36 Jarras de Leonard, las cuales fueron esterilizadas en autoclave por espacio de 1 hora a 1 Atmósfera de presión. Cuando se enfriaron se selló con plástico adhesivo el área de unión entre las dos botellas que conformaban cada jarra. Y posteriormente fueron envueltas en su totalidad con papel Kraft, asegurándolo con cinta adhesiva.

### **III.2.2.1.3. Esterilización y germinación de las semillas**

Las semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* utilizadas fueron donadas por CENTA las cuales fueron tres variedades Rojo de Seda, CENTA Pipil y CENTA San Andrés. Cuatro días antes de ser sembradas, las semillas fueron colocadas en un Erlenmeyer de 125 ml y cubiertas de alcohol Etílico al 95% agitándolas durante 3 minutos. Se vació el Erlenmeyer y luego se llenó nuevamente con hipoclorito de Sodio comercial (lejía) al 3% dejando las semillas en reposo durante 3 minutos. Luego las semillas fueron lavadas 5 veces con agua esterilizada; al finalizar este proceso se dejaron con agua esterilizada durante dos horas para que las semillas se hidrataran. Posteriormente fueron trasladadas a una serie de cajas Petri que contenían dos láminas de papel filtro humedecidas, todo este sustrato previamente esterilizado. Las semillas se mantuvieron en las cajas Petri hasta que germinaron.

### **III.2.2.1.4. Preparación del inoculante**

Para la fabricación de los inoculantes, los nódulos colectados en las localidades, fueron primeramente lavados con jabón de baño y posteriormente fueron hidratados en agua destilada estéril por media hora; seguidamente fueron esterilizados en alcohol Etílico al 95% por espacio de un minuto, siendo posteriormente enjuagados en agua esterilizada. Finalmente fueron macerados en 35 ml de agua destilada esterilizada y colocados en un Erlenmeyer de 125 ml. Al final se obtuvo un total de tres inoculantes, correspondientes a cada localidad.

#### **B.2.1.5. Siembra e inoculación de la semilla.**

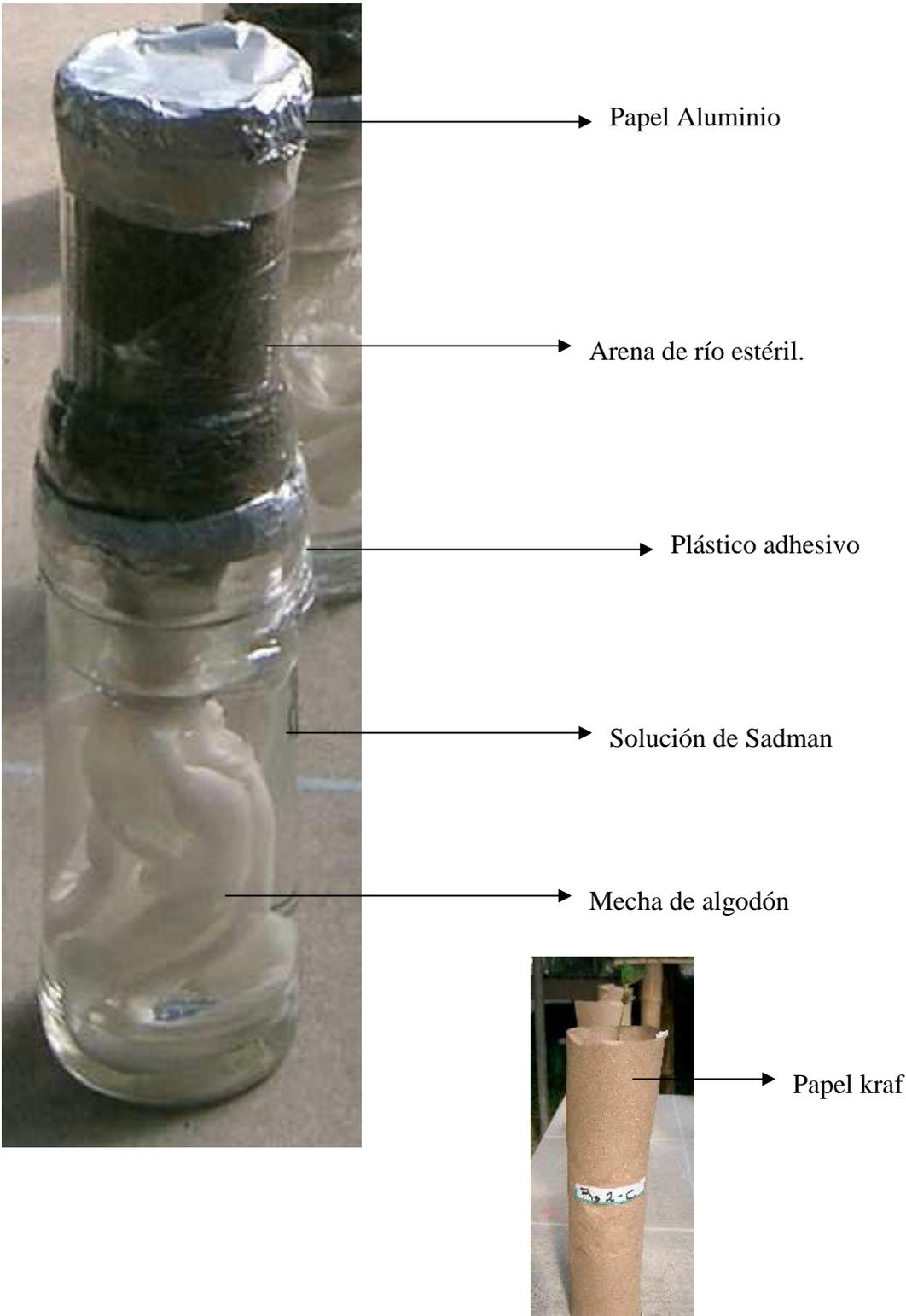
Las Jarras de Leonard fueron colocadas sobre mesas, en la zona del invernadero de la facultad de Ciencias Agronómicas a una distancia de 25 cm entre cada jarra (Anexo 10).

El día de la siembra se humedeció la arena de las jarras con 125 ml de solución de calcio (Anexo 9). Con la ayuda de paletas de madera estériles se removió la arena y se colocaron dos semillas germinadas en cada jarra, posteriormente se agregó 3 ml de inoculante de la cepa correspondiente, cubriéndose luego las semillas con la arena. Las Jarras se cubrieron con tapas de cajas Petri y cuando las plántulas alcanzaron las tapas de las cajas Petri, estas fueron retiradas.

Durante 6 semanas se le dió mantenimiento al experimento revisándose cada dos días el nivel de la solución nutritiva; agregando solución de Sandman diluida 1:4 con agua esterilizada al frasco inferior de la jarra.

El grado de infectividad de los rizobios con las variedades de frijol, se determinó evaluando estadísticamente la nodulación de las tres variedades de frijol infectadas por los rizobios originarios de las tres localidades.

**FIGURA 3. JARRA DE LEONARD**



### III.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental utilizado fue un diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 3 x 3 con 3 repeticiones, resultando un total de 27 unidades experimentales (Nuila, 2006).

Para determinar los tratamientos, las variedades de frijol fueron identificadas con números (1,2,3) y los rizobios procedentes de las localidades con letras mayúsculas (A,B,C), combinándose las primeras con los segundos; teniéndose al final un total de 9 tratamientos y 3 testigos (ver anexo 11).

Con el objetivo de verificar si los datos cumplían con los supuestos del análisis de varianza, se aplicó la prueba de Homogeneidad de las Varianzas de Cochran. Después de esta prueba se realizó el Análisis de Varianza.

Seguidamente se aplicó la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (D.M.S.), tanto para las variedades de frijol como para los rizobios procedentes de las localidades. A fin de determinar cualquier diferencia significativa entre los tratamientos.

VARIABLES EN ESTUDIO:

- Variedades de frijol: Tres variedades ( Rojo de Seda, CENTA Pipil y CENTA San Andrés)
- Rizobios procedentes de las localidades: El Paraíso, San Vicente; Finca Bethania, San Salvador y Zapotitán, La Libertad.

---

Nuila de Mejía, Julia Amalia.2006. Catedrática de la Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador. Asesoría personal.

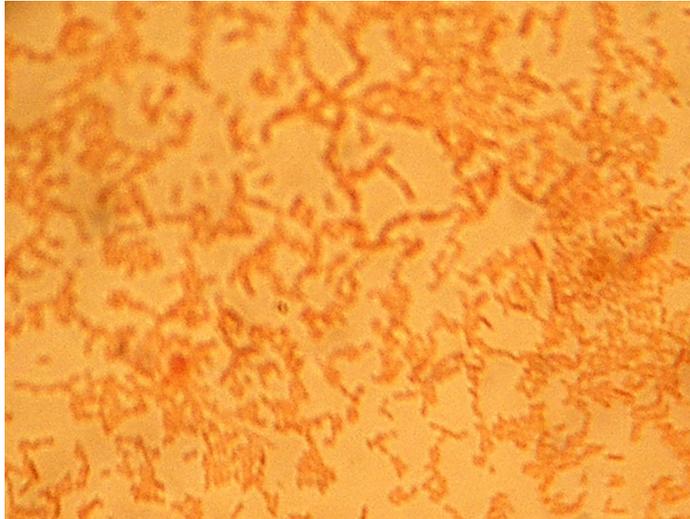
## IV. RESULTADOS

### IV. 1 - AISLAMIENTO DE LOS RHIZOBIOS

Las figuras 4, 5 y 6 muestran el crecimiento de colonias, como resultado del aislamiento, en el cual se observan colonias con características típicas de *Rhizobium sp.*, así como la presencia de contaminantes (hongos y otras bacterias). Por tal motivo las colonias fueron subcultivadas a fin de purificar las cepas, sin embargo la presencia de hongos y otros contaminantes persistió imposibilitando su purificación.



**Figura 4:** Aislamientos de *Rhizobium* realizados en el Laboratorio de Biología Celular y Genética Molecular de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática en los meses de Mayo y Junio de 2006. Donde se muestran colonias típicas de *Rhizobium sp.* contaminadas por hongos.



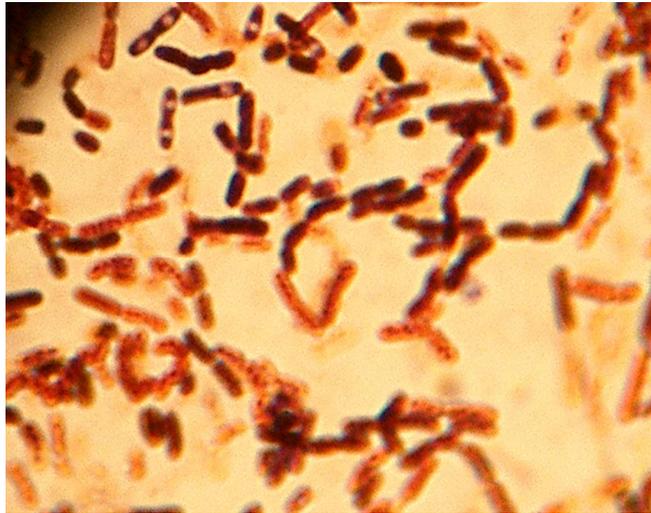
**Figura 5: Vista al microscopio de una tinción de Gram realizada a una de las colonias mostradas en la figura 4; a un aumento de 100X, en donde se observa la presencia de *Rhizobium sp.***



**Figura 6: Cultivo donde se evidencia el crecimiento de colonias de bacterias contaminantes.**

En la figura 7 se muestran fotografías tomadas del microscopio óptico a un aumento de 100X de tinciones de Gram realizadas a las colonias de bacterias contaminantes en donde se observó la presencia de bacterias con características

diferentes a *Rhizobium sp.* principalmente *Bacillus subtilis*, la cual se encontró en la mayoría de aislados como principal contaminante.

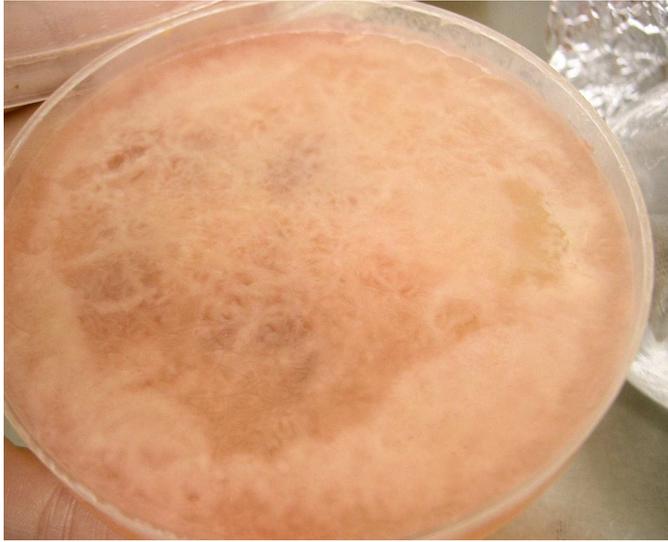


**Figura 7. Vista al microscopio a 100X de una tinción de Gram en donde se observa la presencia de *Bacillus subtilis*.**

Durante el proceso de aislamiento también se presentaron problemas de contaminación con larvas de insectos del Orden Díptera, Familia Phoridae y la presencia de Hymenopteras de la familia Formicidae dentro de las cajas Petri que contenían los medios de cultivo. Ver Figura 8 y 9.



**Figura 8. Cultivo contaminado con larvas de insectos, específicamente del género *Megaselia*.**



**Figura 9. Cultivo contaminado por hormigas del género *Tapinoma***

## IV. 2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INFECTIVIDAD ENTRE LOS RIZOBIOS PROVENIENTES DE LAS LOCALIDADES Y LAS VARIEDADES DE FRIJOL.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de nodulación en Jarras de Leonard, donde se observan los tratamientos, sus respectivas repeticiones y los testigos; así como el número de nódulos producidos por cada unidad experimental.

**Tabla 1: Resultados obtenidos en la prueba de nodulación en Jarras de Leonard.**

VARIABLE: Número de nódulos promedio por tratamiento, a las 6 semanas de instalado el experimento.												
Número de repeticiones por tratamiento	Tratamientos y número de nódulos por tratamiento.											
	1-A	1-B	1-C	2-A	2-B	2-C	3-A	3-B	3-C	1-0	2-0	3-0
R <sub>1</sub>	86	115	105	160	47	58	102	128	55	0	0	0
R <sub>2</sub>	120	66	50	83	39	48	40	92	0	22	0	0
R <sub>3</sub>	101	15	33	155	56	140	110	65	19	0	0	0
Suma	307	196	188	398	142	246	252	285	74	22	0	0
Promedio	102.33	65.33	62.66	132.66	47.33	82	84	95	24.66	7.33	0	0

#### IV. 2.1 Análisis de varianza (ANVA)

En la tabla 2 se muestran los resultados del Análisis de varianza (ANVA) para un nivel de confianza del 10%, en donde se obtuvo que F calculada es mayor que F tablas rechazándose la hipótesis nula por lo que existió diferencia significativa entre los tratamientos; es decir que las variedades respondieron de forma diferente según los rizobios procedentes de las localidades con los cuales fueron inoculadas.

**Tabla 2: Análisis de varianza para evaluar tratamientos con un 10% de probabilidad.**

FACTOR DE VARIACION.	G.L	S.C	C.M	F.C (F calculada)	F
					TABLA 10%
TRATAMIENTOS	a-1 8	24294	3036.75	2.29*	2.04
ERROR EXPE.	A (n-1) 18	23862	1325.67		
TOTAL	26	48156			

En la tabla 3 al descomponer el factor tratamientos en efecto variedad, efecto *Rhizobium* y la interacción entre estos, se obtuvo que para el efecto variedad un valor de F calculada menor que F tablas para el nivel del 5% de significancia lo que indicó que las variedades de frijol se comportaron de igual forma produciendo similar número de nódulos.

Para el efecto de *Rhizobium*, F calculada resultó mayor que F tablas para un nivel de confianza del 5% de significancia. Esto significa que los Rhizobios

procedentes de las 3 localidades produjeron efectos diferentes en la formación de nódulos, cuando fueron inoculados a las variedades de frijol.

La interacción entre variedades de frijol y los Rizobios procedentes de las localidades dió como resultado que F calculada es menor que F tablas, lo cual implica que no existió dependencia de las variedades respecto a los rizobios procedentes de las localidades para la formación de nódulos.

**Tabla 3: ANVA para los efectos principales: variedad, *Rhizobium* y la interacción entre estos.**

Factor de Variación	G.L	S.C	CM	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABLAS</sub>	
					5%	10%
TRATAMIENTOS	8	24294	3036.75	2.29*		2.04
EFECTO (V)	2	1705.55	852.78	0.64 <sup>N.S</sup>	3.55	
EFECTO (R)	2	12118.22	6059.11	4.57*	3.55	
INT. VxR	2	10470.23	2617.56	1.97 <sup>N.S</sup>	2.93	
ERR. EXPE.	4	23862	1325.67			
TOTAL	18	59056				

\* Significativo al 5%

#### **IV. 2.2 Prueba de Diferencia Mínima Significativa (D.M.S).**

Con el objetivo de determinar estadísticamente qué variedad de frijol y cuáles rizobios procedentes de alguna de las localidades producían mayor número de nódulos, se realizó la Prueba de Diferencia Mínima Significativa, en la cual se obtuvieron los siguientes resultados.

En la tabla 4 se presenta el cuadro de doble entrada para las variedades Rojo de seda ( $V_1$ ), CENTA pipil ( $V_2$ ) y CENTA San Andrés ( $V_3$ ), determinándose que no existe diferencia en el comportamiento de las variedades de frijol en cuanto a la producción de nódulos; es decir que producen similar número de nódulos.

**Tabla 4. Cuadro de doble entrada para variedades de frijol.**

<b>MEDIAS</b>	<b>V<sub>2</sub> = 87.33</b>	<b>V<sub>1</sub> = 76.77</b>	<b>V<sub>3</sub> = 67.88</b>
<b>V<sub>3</sub> = 67.88</b>	19.45 <sup>NS</sup>	8.89 <sup>NS</sup>	-----
<b>V<sub>1</sub> = 76.77</b>	10.56 <sup>NS</sup>	-----	
<b>V<sub>2</sub> = 87.33</b>	-----		

**V1: Rojo de seda      V2: CENTA Pipil      V3: CENTA San Andrés**

En la tabla 5 se muestra un cuadro de doble entrada para las diferencias de medias de los rizobios procedentes de las localidades, en el cual se obtuvieron los siguientes resultados: Los rizobios provenientes de la localidad A (El Paraíso, San Sebastián, San Vicente) producen mayor cantidad de nódulos que los Rizobios procedentes de las localidades B (Finca Bethania, San Salvador) y C (Zapotitán, La Libertad).

Además no existe diferencia entre los rizobios procedentes de las localidades B (Finca Bethania, San Salvador) y C (Zapotitán, La Libertad), lo que indica que se comportan iguales, produciendo la misma cantidad de nódulos.

**Tabla 5 Cuadro de doble entrada para rizobios procedentes de las diferentes localidades.**

<b>MEDIAS</b>	<b>A = 106.33</b>	<b>B = 69.22</b>	<b>C = 56.44</b>
<b>C = 56.44</b>	49.89**	12.78 <sup>NS</sup>	-----
<b>B = 69.22</b>	37.11**	-----	
<b>A = 106.33</b>	-----		

**A: El Paraíso      B: Finca Bethania      C: Zapotitán**

<sup>NS</sup> No Significativo    \*\* Significativo

En el grafico 1 se muestra la relación de dependencia entre las variables: variedades y los rizobios procedentes de las localidades; en donde los rizobios procedentes de El Paraíso muestran un comportamiento similar con los de Zapotitán, mostrando una mayor producción de nódulos al interactuar con la variedad de frijol CENTA Pipil y menor producción con la variedad CENTA San Andrés.

A diferencia los rizobios originarios de la Finca Bethania produjeron mayor cantidad de nódulos con la variedad de frijol CENTA San Andrés y menor producción con la variedad CENTA Pipil.

Puede observarse que los rizobios procedentes del cantón el Paraíso(A) fueron los que produjeron mayor cantidad de nódulos, cuando estos se aplicaron a la variedad CENTA Pipil ( $V_2$ ); además se observa que su comportamiento es paralelo respecto al Rhizobium procedente de Zapotitán(C), lo cual indica que su comportamiento es igual en relación a las tres variedades de frijol; es decir producen menos nódulos con la variedad Rojo de Seda ( $V_1$ ), aumentan ambos con la variedad CENTA Pipil ( $V_2$ ) y baja la producción con la variedad CENTA San Andrés ( $V_3$ ); en cambio los rizobios procedentes de la Finca Bethania, la formación de nódulos es aproximadamente igual cuando se aplica a las variedades Rojo de Seda( $V_1$ ) y CENTA Pipil ( $V_2$ ); pero aumenta la producción con CENTA San Andrés ( $V_3$ ).

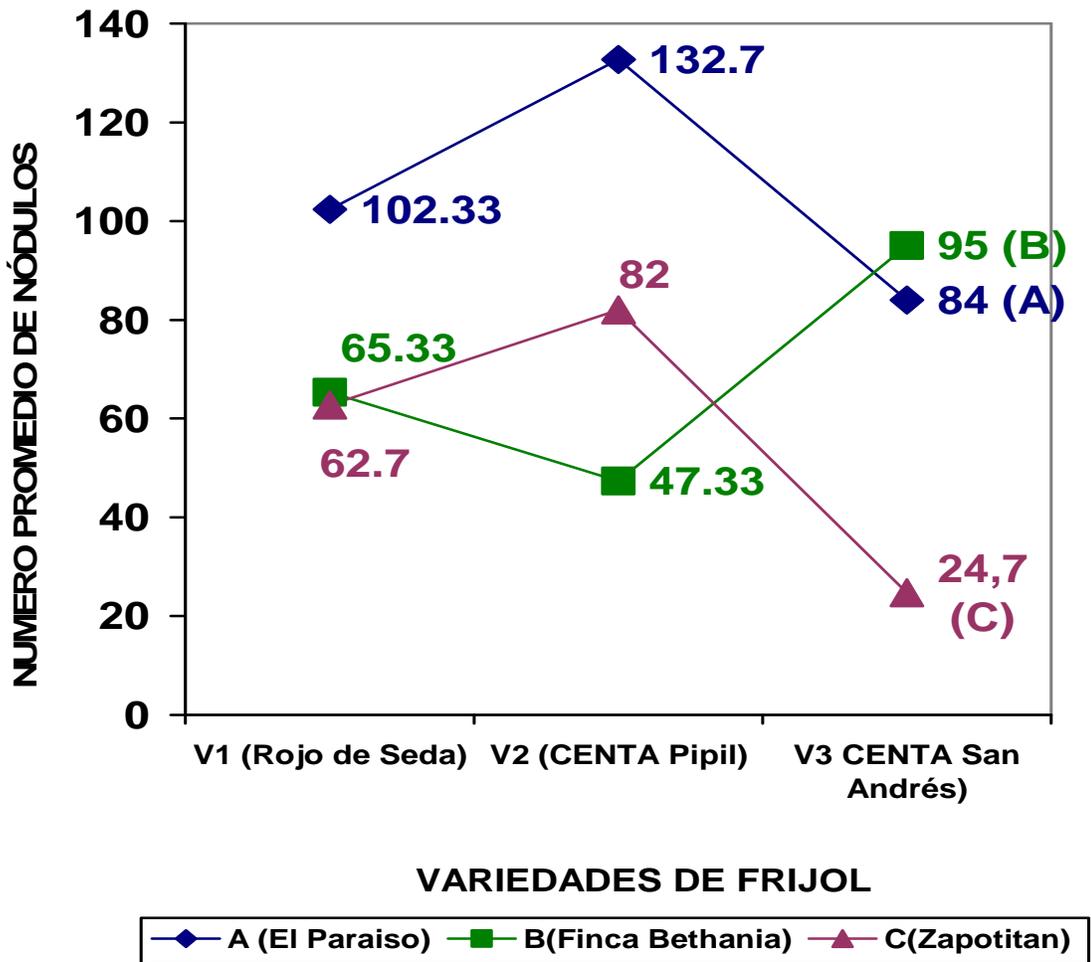


Grafico 1: Comportamiento del efecto *Rhizobium*. Se muestra la relación de dependencia entre las variables: variedades de frijol y los rizobios procedentes de las localidades.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### V.1 Contaminación de aislados de *Rhizobium*

Los resultados obtenidos durante el proceso de aislamiento, mostraron un alto porcentaje de contaminación por hongos. Esto pudo deberse a que los nódulos de los cuales se hicieron los aislamientos, tenían muchos meses de haber sido colectados, lo que pudo haber provocado el desarrollo persistente de hongos, lo cual coincide con lo señalado por Vincet (1975), acerca del desarrollo masivo de hongos que suele observarse en aislamientos provenientes de nódulos viejos.

Asimismo, otros factores que contribuyeron, fueron las condiciones inadecuadas de asepsia del lugar, el uso del mismo equipo para la realización de trabajos con hongos al mismo tiempo que se realizaba el nuestro. Y es por ello que Rivas *et al.* (1990) señala dentro de sus recomendaciones que es necesario trabajar en condiciones asépticas adecuadas y almacenar las muestras en lugares donde no se almacenen otras de naturaleza diferente, que puedan contaminar el ambiente.

A pesar de haber empleado las técnicas sugeridas por CIAT (1988) para lograr el aislamiento de colonias típicas de *Rhizobium sp.* en esta investigación no se lograron aislar las bacterias; a diferencia de Guzmán, *et al.* (1996) quienes lograron aislar 16 cepas nativas empleando esta misma metodología. Esto motivó a emplear otra estrategia para inocular.

### V.2 Prueba de infectividad entre los rizobios provenientes de las localidades y las variedades de frijol.

Al observar la tabla 1 puede notarse que todas las variedades de frijol nodularon con los rizobios procedentes de las localidades, lo que indica que estos rizobios son capaces de infectar a las tres variedades de frijol, esto coincide con los resultados

obtenidos por Rivas *et al.* (1990) los cuales concluyeron que en todos los lugares muestreados existen cepas nativas capaces de infectar diferentes variedades de frijol.

Según los resultados obtenidos en esta investigación para el Análisis de Varianza (ANVA) existió diferencia significativa entre los tratamientos; es decir que las variedades respondieron de forma diferente según la procedencia de los rizobios.

Al descomponer los resultados en efectos variedades y efectos rizobios podemos decir que entre las variedades de frijol estudiadas todas nodularon produciendo similar cantidad de nódulos, lo cual fue también determinado por la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (tabla 4).

En cambio para el efecto rizobio se tuvo que existe diferencia según su lugar de procedencia en relación a su capacidad de infectar las diferentes variedades, dando como resultado que los rizobios procedentes de El Paraíso, San Vicente produjeron mayor cantidad de nódulos que los provenientes de Finca Bethania, San Salvador y Zapotitán, La Libertad según D.M.S. (tabla 5 y el gráfico 1).

El análisis del efecto de interacción entre variedades de frijol y los Rizobios procedentes de las localidades dio como resultado que no existe dependencia de las variedades respecto a la procedencia de los rizobios para la formación de nódulos, es decir que independientemente de la procedencia de los rizobios estas siempre nodularán; y también los rizobios formarán nódulos en las plantas de frijol independientemente cual sea su variedad.

Brock y Madigan (1993), señalan que existe una marcada especificidad entre la especie de leguminosa y la cepa de *Rhizobium*. Y según (WEB 2). Esta especificidad de *Rhizobium* que nodula una leguminosa, está determinada en el código genético por un grupo de genes denominados “genes Nod” contenidos en un plásmido “Sym”. El producto de este gen interactúa con los flavonoides característicos producidos por la planta hospedadora y por eso es responsable de la especificidad de las simbiosis.

Por esto mismo se cree que la variedad CENTA Pipil presentó mayor nodulación con los rizobios procedentes de El Paraíso y Zapotitán. A diferencia la variedad CENTA San Andrés que presentó mejor compatibilidad con los rizobios originarios de la Finca Bethania.

## VI. CONCLUSIONES

- No existe dependencia de las variedades de frijol respecto a los rizobios procedentes de las localidades, para la formación de nódulos.
- Los rizobios procedentes de El Paraíso, San Vicente son altamente infectivos con las variedades de frijol CENTA Pipil y Rojo de Seda.
- La variedad de frijol CENTA Pipil es la más compatible a los rizobios presentes en los suelos de El Paraíso y Zapotitán.
- La variedad de frijol CENTA San Andrés es la más compatible a los rizobios presentes en los suelos de La Finca Bethania.
- El uso de los dispositivos Jarras de Leonard son efectivos cuando se desea evaluar la capacidad de infección de los rizobios en estudio y mantener al mismo tiempo un buen control microbiológico
- La falta de un lugar adecuado para realizar investigaciones de esta naturaleza, así como el uso de material experimental no reciente causan problemas de contaminación que dificultan el aislamiento de la bacteria en estudio.

## VII. RECOMENDACIONES.

- Recomendamos para cultivos de frijol en El Paraíso y Zapotitán la variedad de frijol CENTA Pipil y para la finca Bethania, la variedad de frijol CENTA San Andrés ya que de acuerdo a los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, durante esta investigación, son las más compatibles con los rizobios presentes en esos suelos. Sin embargo es necesario continuar esta investigación a nivel de campo involucrando otras variables como son los factores ambientales a fin de obtener más información sobre el comportamiento de los rizobios con las variedades de frijol en estudio.
  
- Realizar otros trabajos a fin de lograr aislar cepas nativas de *Rhizobium sp.* provenientes de estos suelos agrícolas, a las que se les puedan realizar las pruebas necesarias tanto en el laboratorio como en el campo; con el objetivo de identificar y seleccionar aquellas que presenten características óptimas en cuanto a su habilidad para infectar y establecer una simbiosis efectiva con *Phaseolus vulgaris*.
  
- Trabajar con nódulos recién colectados y usar un antimicótico en el medio de cultivo LMA para minimizar el crecimiento de hongos.
  
- Asimismo, recomendamos trabajar en instalaciones adecuadas con respecto al equipo y asepsia del lugar, para minimizar problemas de contaminación

## VIII. REFERENCIAS

- Almaráz Suárez, J. J. & R. Ferrera-Cerrato. 2002. Inoculación de Leguminosas con cepas de Rhizobios. La Fijación Biológica de Nitrógeno en América Latina: El Aporte de las Técnicas Isotópicas. IMPROSA S.A. de C.V. p 53-66.
- Asociación Latinoamericana de Rhizobiología (ALAR). 1982. XI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Memorias. Lima-Perú. 383pp.
- Brock, T. T. & M. T. Madigan. 1993. Microbiología. 6° Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México 956 pp.
- Burdman, S.; Sarig, S.; Kigel, J. y Okon, Y. Field inoculation of common bean (*P. vulgaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*) with *Azospirillum brasilense* strain Cd. Symbiosis 21. 1996: 41-48
- Calderón de Durán, Vilma Ruth.1997. Identificación de la Presencia y Agresividad de Rhizobios Nativos en Zonas Frijoleras de la Región Occidental de El Salvador. Resúmenes de Investigación 1996. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) – Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) p. 16
- Calderón de Durán, Vilma Ruth.1998. Respuesta a la Inoculación con *Rhizobium Leguminosarum phaseoli* Bajo Manejo de Factores Edáficos Limitantes. Recopilación de Trabajos de Investigación 1996. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) – Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) p. 83

Centro de Meteorología e Hidrología, Dirección General de Recursos Naturales, M.A.G. 1993. Almanaque Salvadoreño. El Salvador. 99 pp. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Simbiosis Leguminosa – Rizobio. Unidad de Publicación CIAT. Colombia. 197 pp.

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). 2005. CENTA Pipil variedad de Frijol de Grano Rojo Resistente al Virus del Mosaico Dorado Amarillo y Tolerante al Calor. Programa de Granos Básicos. Divulgativo informativo. San Andrés, La Libertad, El Salvador.

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). 2002. CENTA San Andrés. Programa de Granos Básicos. Divulgativo informativo. San Andrés, La Libertad, El Salvador.

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). 1993. El Cultivo de Frijol. Programa de Granos Básicos. Divulgativo informativo. San Andrés, La Libertad, El Salvador.

Dolmuz, M. V. 1992. Fundamentos básicos de bacteriología agrícola. Universidad Nacional Agraria. Managua Nicaragua. 120 pp.

Fundación para el Fomento de Empresas de Recolección y Tratamiento Ambiental de los desechos sólidos (FUNDACION ABA). 2002. Proyecto “protección ambiental con participación ciudadana y equidad genérica de los recursos naturales en la micro cuenca hidrográfica situada en la comunidad Bethania”.

Guzmán Alfaro, C. U.; F. H, Rivas Rivera & H. S. Zeledón Gonzáles. 1996. Aislamiento e Identificación y Evaluación de Cepas Nativas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* Procedentes de la Cuenca del Lago de Ilopango a Nivel de Invernadero. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de El Salvador. 82 p.

Ministerio del Medio Ambiente. 2000. Coberturas Nacionales. Ministerio de Obras Públicas (MOP), Instituto Geográfico Nacional (ING), Ingeniero Pablo Arnoldo Guzmán. 1985. Diccionario Geográfico de El Salvador Tomo I. Editorial Ministerio de Obras Públicas, Instituto Geográfico Nacional, Ingeniero Pablo Arnoldo Guzmán. 667 pp.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. Italia 61 pp.

Perez Cabrera, C. A. & C. H. Reyes. 2002. Variedad de frijol. Boletín técnico N° 2. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). 21 pp.

Rivas Flores, A. W.; C. A. Barrientos Rivas; C. A. Hernández Montenegro & N. E. Saz. 1990. Recolección, Aislamiento e Identificación de Cepas Nativas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de El Salvador. 71 pp.

Vincent J. M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur Argentina. 195 pp.

#### **Citas de Internet:**

Web 1:

\_\_\_\_\_. Rhizobium. Ecuador. Disponible En:

<http://html.rincondelvago.com/rhizobium.html>

Web 2:

Wang, Tao; Julio Martínez Romero & Isabel López Lara. Rhizobium y su destacada Simbiosis con plantas. México. Disponible en:

<http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>

Web 3:

Sánchez Yáñez, Juan Manuel. 2004. Inoculación de leguminosas con *Rhizobium*. Disponible en:

[www.monografias.com/trabajos16/rhizobium/rhizobium.shtml](http://www.monografias.com/trabajos16/rhizobium/rhizobium.shtml).

Web 4:

Quinto, María del Carmen; Luis Cárdenas; David Jauregui; Ana Luisa Ramos; Noreide Nava; Olivia Santana; Liliana Martínez; Nancy Elizabeth Martínez Jesús Montiel y Karla García. Instituto de Biotecnología UNAM. Última Actualización: 13 de Abril 2007. Disponible en:

<http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?tipo:doc,dir:PRG.grupo,par:Gcq,tit: GrupoM.C. Maria del Carmen Quinto>

Web 5:

Torres Gutiérrez, Roldán; Eleia Miguelina Soria Arteaga; Carlos Pérez Navarro; Juliana García Zquierdo. 2003. Incrementos de la Fijación Biológica del Nitrógeno Mediante la Inoculación Combinada de Bacterias Fijadoras de N<sub>2</sub>. Cuba. Disponible en:

<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpypZkykVIQGLUhfDt.php#fac>

Web 6:

Pérez S. & Torralba A. 1997. La Fijación del Nitrógeno por los Seres Vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. 21 pp. Disponible en: <http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/simbiosis.html>

Web 7:

Buduba, Carlos. 1994. Muestreo de suelos. Criterios básicos. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico. Disponible en: [http://ciefap.org.ar/documentos/fichas/FTA10N1Muestreo de \*\*suelos\*\*.pdf](http://ciefap.org.ar/documentos/fichas/FTA10N1Muestreo_de_suelos.pdf)

Web 8:

Aplicaciones de la Interacción Microorganismos - Plantas. Disponible en: <http://www.galeon.com/victorhotpants/tres.htm>

Web 9:

Pérez Rodríguez, Antón David. El Ciclo del Nitrógeno. Disponible en: <http://www.drpez.com/drcol132.htm>

Web 10:

Rodríguez Navarro, Dulce N. Efectos del Nitrato sobre la simbiosis Rhizobium-Leguminosa Disponible en: <http://nostoc.usal.es/sefin/Dulce.html>

Web 11:

Harrison, John Arthur El Ciclo del Nitrógeno De Microbios y de Hombres Disponible en: [http://www.visionlearning.com/library/module\\_viewer.php?mid=98&l=s&c3](http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=98&l=s&c3)

Web 12:

Ciclo del nitrógeno disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo del nitrógeno - 29k](http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_del_nitrógeno_-_29k)

## IX. APÉNDICES

### ANEXO 1. SUPERFICIE, PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DE FRIJOL 2004-2005



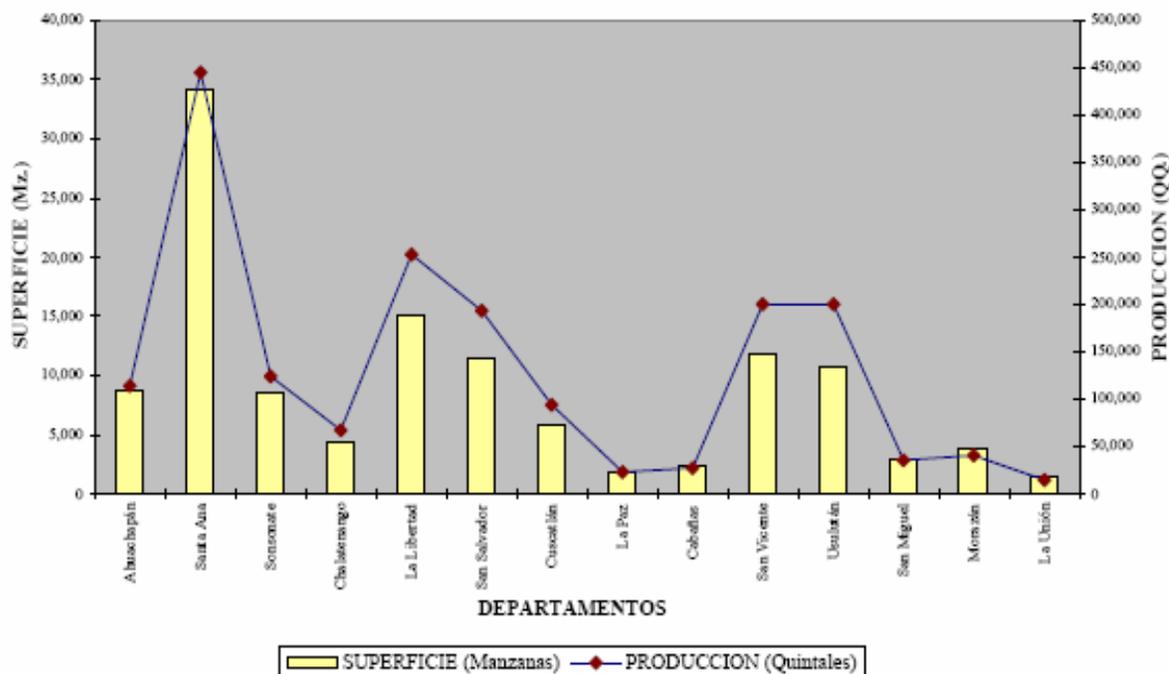
EL SALVADOR  
SUPERFICIE, PRODUCCION Y RENDIMIENTO DE FRIJOL  
SEGUN REGION, DEPARTAMENTO Y COSECHA  
2004 - 2005  
(Cosecha Resumen)



DEPARTAMENTO	SUPERFICIE (Manzanas)	PRODUCCION (Quintales)	RENDIMIENTO (QQ/Mz.)
<b>REGION I</b>	<b>51,482</b>	<b>683,745</b>	<b>13.3</b>
Ahuachapán	8,676	114,511	13.2
Santa Ana	34,166	445,060	13.0
Sonsonate	8,640	124,174	14.4
<b>REGION II</b>	<b>36,910</b>	<b>608,926</b>	<b>16.5</b>
Chalatenango	4,459	67,955	15.2
La Libertad	15,152	252,815	16.7
San Salvador	11,478	193,960	16.9
Cuscatlán	5,821	94,196	16.2
<b>REGION III</b>	<b>16,092</b>	<b>251,185</b>	<b>15.6</b>
La Paz	1,903	23,303	12.2
Cabañas	2,315	27,279	11.8
San Vicente	11,874	200,603	16.9
<b>REGION IV</b>	<b>19,060</b>	<b>292,703</b>	<b>15.4</b>
Usulután	10,837	200,573	18.5
San Miguel	2,883	36,008	12.5
Morazán	3,891	41,091	10.6
La Unión	1,449	15,032	10.4
<b>TOTAL 1a y 2a cosecha</b>	<b>123,544</b>	<b>1,836,558</b>	<b>14.9</b>
Primera Cosecha (Mayo - Junio)	20,594	293,787	14.3
Segunda Cosecha (Agosto - Sept.)	102,950	1,542,771	15.0
Tercera Cosecha (Nov. -Dic.)	1,000	18,000	18.0
<b>TOTAL PAIS (1a, 2a y 3a.)</b>	<b>124,544</b>	<b>1,854,558</b>	<b>14.9</b>

NOTA: El total neto es la suma de las filas de la primera, segunda y tercera cosecha. Tercera Cosecha no está distribuida en el cuadro resumen.

SUPERFICIE Y PRODUCCION DE FRIJOL POR DEPARTAMENTO 2004-2005.



**ANEXO 2: Parcelas de 1.5 Manzanas donde se realizaron los muestreos en cada localidad.**



Cantón El Paraíso, municipio de San Sebastián, departamento de San Vicente.



Finca Bethania jurisdicción de los cantones Changallo, municipio de Ilopango, y El Guaje, Municipio de Santo Tomás, del departamento de San Salvador.



Cantón Zapotitán, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad.

### ANEXO 3. Muestreo: Proceso de colecta de nódulos.

1. Adición de Silicagel en el frasco de plástico.



2. Colocación de algodón sobre la Silicagel.



3. Extracción de la planta.



4. Extracción del sistema radical con sus nódulos.



5. Colecta de los nódulos dentro del frasco plástico.



## ANEXO 4: Proceso de lavado, hidratación y esterilización de los nódulos.

### 1. Lavado de los nódulos



### 2. Hidratación de los nódulos



### 3. Esterilización superficial de los nódulos



## ANEXO 5. Tomado de CIAT 1988.

### MEDIO LEVADURA MANITOL - AGAR (LMA).

#### Componentes:

Manitol -----	10.0 g
Agua de levadura <sup>1</sup> -----	100.0 ml.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O -----	0.1 g
NaCl -----	0.2 g
FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O -----	0.01 g
CaCl <sub>2</sub> -----	0.15 g
Agar (Difco-Bacto) <sup>2</sup> :	
En medio neutro -----	15.0 g
En medio acido -----	20.0 g
Solucion indicadora de pH <sup>3</sup> -----	5.0 ml
Ó solución de rojo congo <sup>4</sup> -----	10.0 ml
Agua destilada, agregar hasta -----	1000 ml.

1. Para preparar el agua de levadura disolver 600 g de levadura (Fleischmann) en 5400 ml de agua y hervir durante una hora en el autoclave sin presión. Dejar enfriar y centrifugar a falta de una centrifuga, dejar precipitar durante 2 a 4 días en el refrigerador. Envasar volúmenes de 100 ml del sobrenadante y guardarlos sin esterilizar en el congelador.
2. Para medio líquido no se agrega el agar.
3. Azul de bromotimol 0.5 % en 0.016 N de NaOH, para pH 6.8 (ABT).  
Púrpura de bromocresol 0.5% en 0.016 N NaOH, para Ph 5.5 (PBC)  
Verde de bromocresol 0.3% en 0.016N NaOH, para pH 4.5 (VBC).
4. Solucion acuosa de rojo congo 1 g por 400 ml de H<sub>2</sub>O

#### Preparación:

Se hierva el medio hasta disolver el agar, agitando de vez en cuando. Después se esteriliza en el autoclave y se corrige su pH a 6.8 con 0.8 – 1.0 ml de NaOH 0.5 N estéril o se acidifica hasta el pH 5.5 con aproximadamente 1.7 ml de HCl 1.0 N esterilizado.

Se acidifica después de esterilizar porque la acides, combinada con la alta temperatura de la autoclave ocasiona la degradación del agar, por esta razón se utiliza una concentración mayor de agar para el medio acido.

## ANEXO 6. Proceso de aislamiento de *Rhizobium* en Medio de Levadura Manitol-Agar.

1. Extracción del contenido de un nódulo en LMA.



2. Estriado del contenido en LMA.



3. Sellado de las cajas Petri con Parafilm



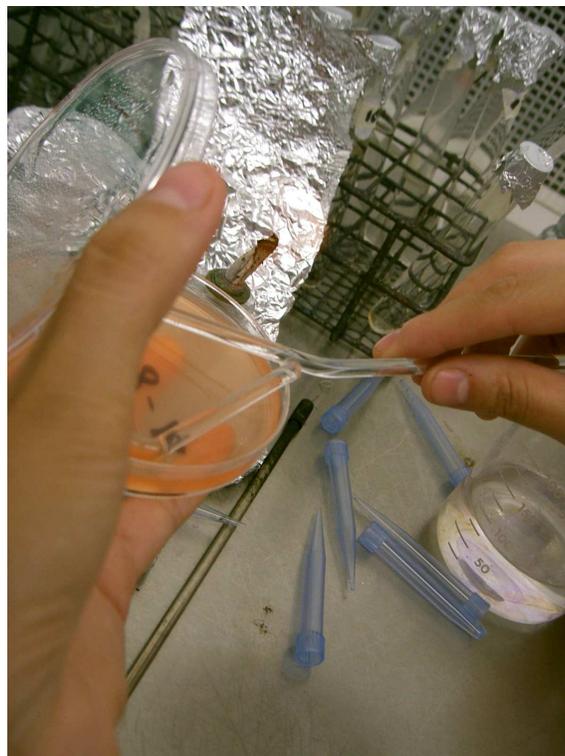
4. Incubación de los cultivos



## ANEXO 7: Métodos de dilución y extendido.



Método de dilución.



Extendido del contenido de la dilución.

## ANEXO 8. Tomado de CIAT 1988.

### COLORACION DE GRAM

#### 1. Reactivos.

##### **A) Solución cristal violeta.**

Cristal violeta ----- 10 g  
Oxalato de amonio ----- 4 g  
Etanol ----- 100 ml  
Agua destilada ----- 400 ml

##### **B) Solución de yodo.**

Yodo ----- 1 g.  
Yoduro de potasio ----- 2g  
Etanol ----- 25 ml  
Agua destilada ----- 100 ml

##### **C) Alcohol (yodado).**

Solucion de yodo (B) ----- 5 ml  
Etanol ----- 95 ml

##### **D) Colorante de contraste.**

Safranina en etanol al 2.5%----- 10 ml  
Agua destilada ----- 100 ml.

#### 2. Procedimiento

- Extender bien una pequeña porción de un cultivo de rizobios sobre un porta objetos y dejarla secar al aire.
- Pasar el frotis seco, una sola vez sobre la llama de un mechero bunsen.
- Teñir con la solución (A) durante un minuto.
- Enjuagar suavemente con agua.
- Cubrir el frotis con la solución yodada (B) y dejar durante un minuto.
- Decolorar cubriendo con alcohol (C) durante uno a cinco minutos.
- Lavar con agua.
- Teñir con el colorante de contrate (D) de uno a cinco minutos
- Lavar con agua y dejar secar.
- Examinar directamente por inmersión en aceite: las celular gram positivas toman un color violeta oscuro las gram negativas son de color rojo claro.

## ANEXO 9. Tomado de CIAT 1988.

### MEDIO DE SANDMAN:

#### 1. Soluciones de reserva (Stock):

##### A) Solucion de Hierro

FeSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O ----- 5.0 g  
Acido citrico ----- 5.0 g  
Agua destilada , agregar hasta ----- 1000 ml

##### B) Solucion de micronutrientos.

CuSO<sub>4</sub> . 5 H<sub>2</sub>O ----- 0.157 g  
ZnSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O ----- 0.44 g  
MnSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O ----- 3.076 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> . 4 H<sub>2</sub>O ----- 0.02 g  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ----- 2.26 g  
Agua destilada, agregar hasta ----- 1000 ml

#### 2. Preparación del medio a una jarra: a 750ml de agua destilada adicionar:

KCl ----- 0.149 g  
MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O ----- 0.493 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 0.348 g  
Solucion de hierro ----- 0.5 ml  
Solucion de micronutrientos 0.5 ml

#### 3. Si es necesario, ajustar el pH a 6.7 (con NaOH ò HCl estéril), después de esterilizar el medio

#### 4. Solucion de Calcio:

KNO<sub>3</sub> ----- 0.2g  
CaSO<sub>4</sub> ----- 2.5g  
Agua destilada, agregar hasta 1000 ml

Para una jarra de Leonard se agregan 200 ml de esta solución a la arena antes de sembrar.

## ANEXO 10. Montaje de Jarras de Leonard en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agronómicas.

### 1. Preparación de la arena de río: lavado y secado



### 2. Construcción y esterilización de las jarras de Leonard.



### 3. Esterilización y germinación de las semillas



#### 4. Preparación del inoculante



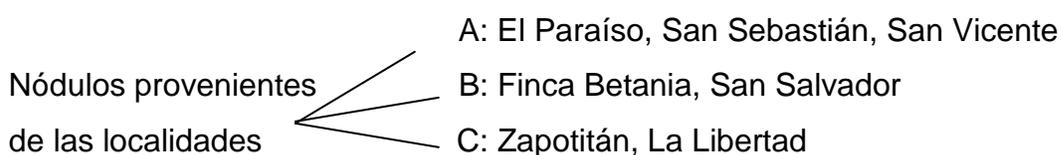
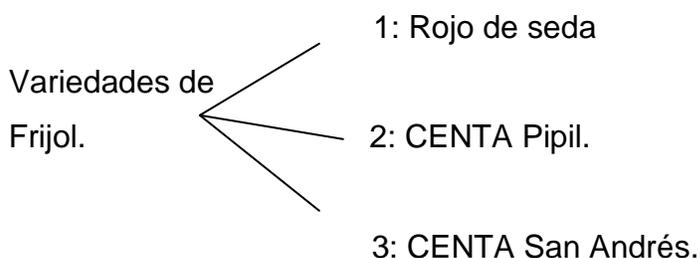
#### 5. Montaje de Jarras de Leonard, Siembra e inoculación de la semilla.



#### 6. Plantas de *Phaseolus vulgaris* en desarrollo.



## ANEXO 11: Esquema del diseño experimental.



Diseño Completamente al Azar con Arreglo Factorial 3 x 3

Nº de repeticiones: 3

Tratamientos: 1-A, 1-B, 1-C, 2-A, 2-B, 2-C, 3-A, 3-B, 3-C, 1-0, 2-0, 3-0  
(9 tratamientos)

Testigos: 1-0, 2-0, 3-0 (3 testigos)

Unidad experimental: una jarra de Leonard con dos plantas de frijol.

### Distribución de los tratamientos

R <sub>2</sub> (1-A)	R <sub>3</sub> (1-A)	R <sub>1</sub> (2-C)	R <sub>1</sub> (1-0)	R <sub>1</sub> (1-A)	R <sub>1</sub> (3-A)	R <sub>2</sub> (3-0)	R <sub>3</sub> (1-C)	R <sub>1</sub> (2-A)	R <sub>3</sub> (3-B)	R <sub>1</sub> (2-0)	R <sub>3</sub> (1-B)
R <sub>1</sub> (3-C)	R <sub>3</sub> (2-0)	R <sub>2</sub> (2-A)	R <sub>1</sub> (1-C)	R <sub>2</sub> (3-C)	R <sub>3</sub> (2-A)	R <sub>3</sub> (2-B)	R <sub>2</sub> (1-C)	R <sub>2</sub> (2-C)	R <sub>1</sub> (1-B)	R <sub>3</sub> (1-0)	R <sub>1</sub> (3-B)
R <sub>3</sub> (2-C)	R <sub>2</sub> (3-B)	R <sub>2</sub> (2-0)	R <sub>3</sub> (3-C)	R <sub>2</sub> (1-B)	R <sub>3</sub> (3-0)	R <sub>3</sub> (3-A)	R <sub>2</sub> (1-0)	R <sub>1</sub> (3-0)	R <sub>2</sub> (2-B)	R <sub>1</sub> (2-B)	R <sub>2</sub> (3-A)