

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS



**AISLAMIENTO IDENTIFICACION Y EVALUACION
DE CEPAS NATIVAS DE Rhizobium leguminosarum
biovar phaseoli PROCEDENTES DE LA CUENCA
DEL LAGO DE ILOPANGO A NIVEL
DE INVERNADERO**

Por:

CARLOS UZIEL GUZMAN ALFARO
FULVIO ENRIQUE RIVAS RIVERA
HUMBERTO SALVADOR ZELEDON GONZALES

Requisito para Optar al Título de:

INGENIERO AGRONOMO

SAN SALVADOR, NOVIEMBRE DE 1996

1346
EJ. 1

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : DR. BENJAMIN LOPEZ GUILLEN

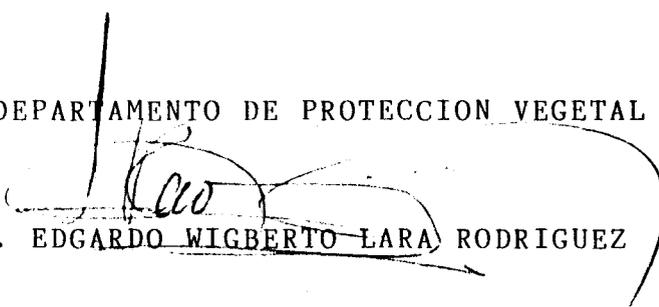
SECRETARIO GENERAL : LIC. ENNIO LUNA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. JORGE RODOLFO MIRANDA GAMEZ

SECRETARIO : ING. AGR. LUIS HOMERO LOPEZ GUARDADO

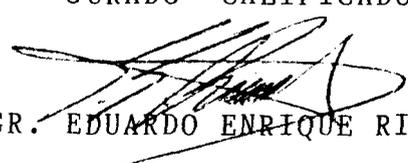
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL

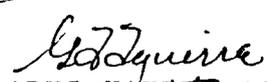

ING. AGR. EDGARDO WIGBERTO LARA RODRIGUEZ

ASESOR:


ING. AGR. BLANCA DAISY AVILA DE SOLANO

JURADO CALIFICADOR:


ING. AGR. EDUARDO ENRIQUE RIVERA FAGUNDO


ING. AGR. GLADYS HAYDEE AGUIRRE VIGIL


ING. AGR. FRANCISCO ELIAS ESCOBAR DURAN

TJH
1987
E977
1987

1346
E.S. 1

R E S U M E N

Con el fin de determinar la eficacia de cepas nativas de Rhizobium phaseoli en la fijación biológica de nitrógeno en frijol Phaseolus vulgaris se realizaron muestreos en las zonas frijoleras de la Cuenca del Lago de Ilopango. De los nódulos con características de ser efectivos se efectuaron aislamientos y purificación de las cepas de Rhizobium; además, a las cepas aisladas se les realizó la prueba de nodulación en Jarras de Leonard, estableciéndose cinco categorías de nodulación según metodología sugerida por CIAT 1987. Nueve de las cepas que presentaron mayor nodulación en las Jarras de Leonard más la cepa CIAT 613, se evaluaron a nivel de invernadero, para lo cual se utilizó suelos proveniente de la Cuenca del Lago de Ilopango y tres variedades de frijol: Centa Cuzcatleco, Centa Jiboa y Rojo de Seda. El ensayo se cosechó a los 65 días, evaluándose el contenido de nitrógeno de la parte aérea por el método de micro kjeldahl. Después de los análisis estadísticos se determinó que no existía diferencia significativa entre las cepas, pero sí entre la interacción variedad cepa siendo las mejores interacciones la de la variedad Centa Jiboa con las cepas 3, 4, 6 y 7.

AGRADECIMIENTOS

- A NUESTRA ASESORA

Ing. Agr. Blanca Daisy Avila de Solano, por su apoyo y orientación.

- A LOS MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

Ingenieros Agrónomos: Eduardo Enrique Rivera Fagundo

Glady Haydée Aguirre Vigil

Francisco Elías Escobar Durán

Por sus valiosas observaciones.

- A MR. BRIAN SCHULTZ

Profesor de Hampshire College, quien gestionó los fondos ante FOOD HEALTH AND CONSERVATION FOUNDATION para financiar proyectos de Investigación en la Cuenca del Lago de Ilopango y, a la vez, a los docentes de la Universidad de El Salvador que administraron dichos fondos.

- AL CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT)

Por su valiosa colaboración donando reactivos para el desarrollo de este trabajo.

- A DOÑA MARINA DEL CARMEN RODRIGUEZ

Por su ayuda en el mecanografiado del presente documento.

- A los señores Bibliotecarios de la Facultad de Ciencias Agronómicas por su colaboración en el préstamo de material bibliográfico.

- A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

- A DIOS :
Por haberme brindado salud y guiarme en el camino para poder finalizar esta meta.

- A MI PADRE :
LUIS ANTONIO GUZMAN, que aunque ya no esté, su ejemplo y consejos en vida me dieron fortaleza en el trabajo de mi carrera.

- A MI MADRE :
INES ALFARO VDA. DE GUZMAN, por su amor y sacrificio, porque gracias a ella he culminado mi carrera.

- A MIS HERMANOS:
MARCO ALFREDO, BOANERGES, JORGE ALBERTO, LUIS ANTONIO, LIGIA DEL CARMEN, JOSE ARTURO y EDWIN FABRICIO, por su ayuda y comprensión.

- A MIS SOBRINOS :
FATIMA DEL ROSARIO, FLOR, ROCIO MAGALI, YVANIA NATALI, KARLA MARIELA, GABRIEL ALFREDO, LIGIA VERONICA y EDWIN FABRICIO, por su amor.

- A MIS AMIGOS:
Por su amistad.

CARLOS UZIEL GUZMAN ALFARO

DEDICATORIA

- A JEHOVA DIOS, por permitirme culminar la meta propuesta

- A MI MADRE:
EMILIA MERCEDES GONZALEZ, por su apoyo incondicional y comprensión lo que me permitió alcanzar la meta deseada.

- A MI PADRE:
RAUL HUMBERTO ZELEDON, de grata recordación.

- A MIS HERMANOS:
MARTA LILIAN, RAUL ARMANDO, MIRNA ELIZABETH y CARMEN DELIA por su apoyo y comprensión.

- A MI TIO:
OSCAR ALBERTO GONZALEZ, por su valiosa ayuda.

- A MIS SOBRINOS:
XIOMARA ISOLINA, EMILIA MERCEDES, HANS STEVE, HECTOR RAUL, DOUGLAS ALEXANDER, EDWUIN ARMANDO, MIGUEL ANGEL; CARLOS ALBERTO, BRIAN EDILBERTO, ARIEL HUMBERTO y ERIK, por su cariño.

- A MIS AMIGOS:
* VIDAL ERNESTO FIGUEROA, por su desinteresada colaboración y apoyo.
* NORMA MARINA DE RIVAS, por su valiosa ayuda.

- MUY ESPECIALMENTE A MI ABUELA:
ANGELA CONZALEZ, quien aunque materialmente no se encuentra entre nosotros, existe en mi corazón apoyándome constantemente.

HUMBERTO SALVADOR ZELEDON

DEDICATORIA

- Dedico este esfuerzo a Dios Todopoderoso por permitirme llegar hasta el final.

- A MIS PADRES:
TITO RIVAS y FALY DE RIVAS, por saber esperar hasta la culminación de este triunfo.

- A MIS HERMANAS:
PATY, ZULMA y CARO, por tener confianza en mi todo el tiempo.

- A MI ESPOSA:
NORMA, con mucho amor y cariño.

- A MIS HIJOS:
CAROLA y ELMER, con todo mi amor y ternura.

- A mis familiares y amigos, con todo el respeto que se merecen.

- Y a todas las personas que de una u otra forma me incentivaron a seguir adelante, GRACIAS.

FULVIO ENRIQUE RIVAS RIVERA

I N D I C E

	Página
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xv
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
3. REVISION DE LITERATURA	6
3.1. Generalidades	6
3.2. Importancia de la fijación de Nitrógeno ...	6
3.3. Ciclo de Nitrógeno	8
3.4. Características de la familia Rhizobiacea .	9
3.4.1. Características morfológicas y de - crecimiento del género <u>Rhizobium</u> ..	10
3.4.2. Clasificación taxonómica	10
3.5. Simbiosis Leguminosa- <u>Rhizobium</u>	11
3.5.1. Proceso de infección de las Legumi- nosas por <u>Rhizobium</u>	12
3.5.2. Características de los nódulos	14
3.5.3. Factores que inciden en la fijación simbiótica del Nitrógeno	15
3.5.3.1. Potencial de hidrógeno -- (pH)	16

	Página
3.5.3.2. Temperatura	16
3.5.3.3. Humedad	17
3.5.3.4. Intensidad de luz solar .	18
3.5.3.5. Aplicación de Nitrógeno .	20
3.5.3.6. Influencia de fungicidas e insecticidas	20
3.5.3.7. Nutrientes minerales o ele- mentos menores	21
3.5.4. Manejo de los Rhizobios	22
3.4.5.1. Aislamiento	23
3.4.5.2. Identificación	24
4. MATERIALES Y METODOS	25
4.1. Fase de campo	25
4.2. Fase de laboratorio	27
4.2.1. Aislamiento de <u>Rhizobium leguminosa-</u> <u>rum</u> biovar <u>Phaseoli</u>	27
4.2.2. Diluciones en medio líquido Levadu- ra Manitol (LM)	30
4.3. Infección en Jarras de Leonard	31
4.3.1. Esterilización de la semilla	31
4.3.2. Preparación de la arena de río	33
4.3.3. Preparación del inoculante	35
4.3.4. Montaje y manejo de las plantas en las Jarras de Leonard	35
4.3.5. Siembra e inoculación de la semilla.	36

	Página
4.4. Evaluación en maceta invernadero	49
4.4.1. Metodología estadística	42
5. RESULTADOS Y DISCUSION	44
5.1. Aislamiento	44
5.2. Identificación de las cepas	45
5.2.1. Pruebas de nodulación en Jarras de Leonard	45
5.2.2. Características morfológicas macros cópicas	47
5.2.3. Características microscópicas	49
5.2.4. Prueba de Ketolactasa	50
5.3. Evaluación a nivel de maceta invernadero ..	51
6. CONCLUSIONES	63
7. RECOMENDACIONES	64
8. BIBLIOGRAFIA	65
9. ANEXOS	70

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cantidad de muestras recolectadas de nódulos radiculares en <u>Phaseolus vulgaris</u> y resultados del proceso de aislamiento. Fac. CC. AA., UES. 1993	45
2	Resultados de la prueba de nodulación en - Jarras de Leonard en base a las categorías propuestas por el CIAT. 1989. Fac. CC.AA., UES, 1993	47
3	Características morfológicas-macroscópicas de las cepas aisladas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv <u>phaseoli</u> . Fac. CC.AA., UES, 1993 .	48
4	Características microscópicas de las 9 cepas nativas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv <u>phaseoli</u> seleccionadas. Fac. CC. AA., UES, 1993	49
5	Respuesta de las nueve cepas seleccionadas de <u>Rhizobium</u> a la prueba de ketolactasa. - Fac. CC.AA., UES, 1993	50
6	Rendimiento en porcentaje de nitrógeno de - tres variedades de frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>) inoculadas. Fac. CC.AA., UES, 1994 ..	52
7	Análisis de varianza a partir del porcentaje de Nitrógeno contenido por las unidades experimentales. Fac. CC.AA., UES, 1995 ...	54

Cuadro

Página

8	Resultados de la separación de medias a través de la prueba de Duncan en tres variedades de frijol <u>Phaseolus vulgaris</u> . Fac. CC. AA., UES, 1995	55
9	Evaluación de las cepas aisladas en base a su rendimiento en porcentaje de Nitrógeno, marcados de mayor a menor. Fac. de CC. AA., UES. 1995	59
10	Rendimiento promedio en porcentaje de nitrógeno de tres variedades de frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>) inoculadas con 10 cepas de -- <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv <u>phaseoli</u> . Fac. CC.AA., UES, 1995	61
A-1	Hojas de información de recolección de nódulos	71
A-2	Preparación del Medio Levadura Manitol-Agar.	73
A-3	Preparación del medio de Sandman.....	74
A-4	Preparación de solución de calcio	75
A-5	Categorías utilizadas para la evaluación de la nodulación en Jarras de Leonard	75
A-6	Coloración de Gram	76
A-7	Medio Ketolactasa	77

Cuadro		Página
A- 8	Reactivo de Benedict	77
A- 9	Unidad experimental	78
A-10	Cepas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv <u>phaseo-</u> <u>li</u> seleccionadas en la prueba de nodulación en Jarras de Leonard para evaluar su efecti vidad a nivel de maceta invernadero y su -- respectiva reasignación de número de cepa y número de tratamiento. Fac. CC.AA., UES, - 1993	79
A-11	Distribución de los tratamientos para la -- evaluación en invernadero de diez cepas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> inoculadas en tres variedades de frijol común <u>Phaseolus vulga-</u> <u>ris</u> . Fac. CC.AA., UES, 1993	80
A-12	Esquema de la forma en que se hacen las di- luciones para aislar los Rhizobios	82

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo biogeoquímico del Nitrógeno	9
2	Ubicación geográfica y zona de muestreo en la cuenca del Lago de Ilopango. El Salvador	26
3	Plantas sanas de <u>Phaseolus vulgaris</u> seleccionadas para coleccionar nódulos radiculares. Cuenca Lago de Ilopango, 1992	28
4	Forma de extracción de las plantas de <u>Phaseolus vulgaris</u> para no dañar su sistema radicular. Cuenca Lago de Ilopango, 1992 ...	28
5	Cultivos puros de <u>Rhizobium</u> en medio de LMA más indicador Rojo Congo. Fac. CC.AA., UES, 1993	32
6	Cultivos puros de <u>Rhizobium</u> en medio de LMA más indicador Rojo Congo. Fac. CC.AA., UES, 1993	32
7	Proceso de esterilización de semillas de frijol <u>Phaseolus vulgaris</u> . Fac. CC.AA., UES, 1993	34
8	Semillas de frijol <u>Phaseolus vulgaris</u> en -- proceso de pregerminación. Fac. CC. AA., - UES, 1993	34

Figura		Página
9	Componentes de una Jarra de Leonard. Fac. CC.AA., UES, 1993	37
10	Montaje de la prueba de nodulación en Jarras de Leonard. Fac. CC.AA., UES, 1993 .	37
11	Ensayo Maceta-Invernadero. Fac. CC.AA., - ues, 1994	41
12	Contenido de Nitrógeno total para tres diferentes variedades de frijol común (<u>Phaseolus vulgaris</u>) inoculadas con cepas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> bv <u>phaseoli</u>	56
13	Contenido de Nitrógeno para 10 diferentes cepas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> inoculadas en tres variedades de frijol común -- (<u>Phaseolus vulgaris</u>)	58
14	Contenido de Nitrógeno total para diez diferentes cepas de <u>Rhizobium leguminosarum</u> inoculadas en tres variedades de frijol común (<u>Phaseolus vulgaris</u>)	62

1. INTRODUCCION

El nitrógeno está presente en los tejidos verdes de las plantas en concentraciones relativamente altas (entre el 1 y el 4%) y en algunas semillas en concentraciones aún mayores, por lo cual se le considera un macronutriente primario junto con el fósforo y el potasio. Debido a esto, en la mayoría de los cultivos se realizan altas fertilizaciones de nitrógeno para incrementar las producciones; en las leguminosas estas fertilizaciones pueden ser disminuidas en gran medida aprovechando la capacidad de ellas para fijar el nitrógeno atmosférico, dicha fijación ocurre por la asociación simbiótica que establece la planta con algunas bacterias de la familia Rhizobiaceae. El presente trabajo pretende aprovechar esta relación simbiótica que se establece entre planta-bacteria con el objetivo de aislar e identificar cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli a partir de nódulos radiculares de frijol común Phaseolus vulgaris, procedentes de las principales zonas frijoleras de la Cuenca del Lago de Ilopango, además de evaluar la eficiencia en la fijación de nitrógeno a nivel de maceta invernadero de las cepas aisladas; y como objetivo final, seleccionar la combinación leguminosa-rizobio con alta capacidad de fijación de nitrógeno, bajo las condiciones locales.

2. ANTECEDENTES

En El Salvador son pocas las investigaciones sobre la fijación biológica de nitrógeno atmosférico en frijol común -- (Phaseolus vulgaris), existiendo hasta hoy en día pocos trabajos sobre el tema.

ZEPEDA, en 1971 trabajando a nivel de invernadero, en la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, evaluó la especificidad de Rhizobium phaseoli. Para ello, recolectó los nódulos producidos por las variedades Jamapa, -- S-184-N y Porrillo 1, que fueron sembradas en el Campo Experimental de San Luis Talpa. Posteriormente aisló las cepas y las inoculó en arena de río (estéril), contenida en macetas, que fueron subirrigadas con solución nutritiva. Obteniendo como resultado que la cepa identificada como C4 fue la más eficiente (28).

PINEDA, en 1987 realizó una investigación a nivel de invernadero y de campo con el fin de determinar la eficiencia de cepas nativas de Rhizobium phaseoli en la fijación de nitrógeno en frijol, pudo determinar que eran cuatro cepas nativas y dos cepas CIAT las mejores. Usando estas cepas realizó otros trabajos en los cuales tuvo como resultado que los mejores rendimientos se obtenían con las cepas Ilobasco 10 y CIAT 632, y que la variedad CENTA-Izalco mostró una simbiosis altamente efectiva (19).

RIVAS FLORES, et al, en 1990 trabajando a nivel de laboratorio, en la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, aisló e identificó cepas nativas de Rhizobium phaseoli. Para ello recolectó los nódulos producidos por diversas variedades de frijol en las zonas de producción de -- Ahuachapán y Santa Ana; pero las cepas aisladas no se aportaron a la investigación ya que se perdieron, debido al cierre de la Universidad de El Salvador, en el mes de noviembre de -- 1989 (22).

QUINTANILLA, et al, en 1993 realizó una investigación durante la segunda época de siembra, en zonas frijoleras de El Salvador: San Andrés en el Departamento de La Libertad y Candelaria de la Frontera en el Departamento de Santa Ana. Los factores en estudio fueron cinco cepas de Rhizobium leguminosarum bv Phaseoli vrs. dos testigos relativos (no inoculados, con bajo y alto nivel de nitrógeno). Se utilizó el diseño estadístico de bloques al azar con arreglo factorial, con cinco repeticiones y cada tratamiento en un área de 4.0 m². Las variables analizadas fueron: Peso fresco y seco del follaje, número de vainas, contenido de nitrógeno y proteína durante la floración y llenado de vainas (R-6 y R-8), peso de 100 granos y rendimiento. El análisis de varianza demostró diferencias altamente significativas para San Andrés, en las variables: - Rendimiento de follaje fresco y seco en R-8; y diferencia significativa para la localidad de Candelaria de la Frontera, en las variables: Número de vainas no hubo diferencia estadísti-

ca. El mejor rendimiento de grano se obtuvo con los tratamientos: Sin inoculación con nivel alto de nitrógeno y la inoculación con cepa de Rhizobium phaseoli KIM-5 (20).

TEREZON, et al, en 1993 realizó un estudio en la segunda época de siembra del frijol en la localidad de Candelaria de la Frontera, Departamento de Santa Ana. El objetivo fue evaluar a nivel de finca tres cepas de Rhizobium phaseoli en dos variedades de frijol comerciales. Se utilizó el diseño experimental factorial en bloques completos al azar con cuatro repeticiones; los factores en estudio fueron las cepas promisorias: KIM 5, CIAT 613 y CR-477, y los tratamientos 40 y 80 kg de N/ha, como fuentes de nitrógeno. Las variedades CENTA Cuscatleco y Rojo de Seda en el segundo factor. Los resultados obtenidos muestran que al inicio del desarrollo vegetativo hubo diferencia significativa entre las variedades evaluadas tanto en cantidad como calidad de biomasa, siendo mejor la variedad Rojo de Seda. Para todas las variables evaluadas posteriormente se presentó no significancia entre tratamientos y variedades. La variable de rendimiento, aunque no mostró significancia, sus valores mostraron mayores rendimientos en las cepas KIM 5 con Rojo de Seda, obteniéndose 1030 kg/ha; y la Cepa KR-477 con CENTA Cuscatleco, con resultados de 924 kg/ha que los obtenidos con nitrógeno químico de 80 kg/ha con 918 kg/ha (25).

CALDERON, 1995 realizó un ensayo de campo durante la época postrera (septiembre de 1995), en el Cantón Veracruz, Zapo

titán, Departamento de La Libertad con el objeto de determinar genotipos de frijol que presentan una alta capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Utilizó un diseño estadístico de bloques completamente al azar con 3 repeticiones y 6 tratamientos correspondientes a 15 genotipos contenidos en el vivero, los cuales fueron inoculadas con mezclas de cepas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli y fertilizados con una dosis base de 50 kg/ha de nitrógeno y una variedad local como testigo, fertilizada con alto nitrógeno (100 kg/ha) no inoculada.

Las variables evaluadas fueron número de nódulos, peso seco de la parte aérea, contenido de nitrógeno en floración y rendimiento de grano en madurez fisiológica.

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas para la variable rendimiento, obteniéndose los mayores promedios para los genotipos DOR 474, DOR 481, Rojo de Seda y DOR 483, los cuales además superaron al testigo local en las otras variables evaluadas (4).

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Generalidades

La capacidad que tienen las leguminosas para fijar nitrógeno atmosférico se conoce desde 1888, aunque ya anteriormente se conocía que estas plantas tenían la capacidad de enriquecer el suelo.

Las leguminosas presentan en sus raíces una serie de nódulos que son estructuras bien organizadas, las cuales se forman una vez la planta ha sido infectada por alguna de las especies del género Rhizobium (10).

Las bacterias infectantes fijan el nitrógeno de la atmósfera y permiten que la planta pueda disponer de él en forma orgánica utilizable, de ahí que el aprovechamiento de ese nitrógeno sea mayor que el que pierde en forma de azúcares y otros nutrientes (1).

La fijación simbiótica como resultado de la asociación entre las plantas de la familia leguminosa y bacterias del género Rhizobium, se lleva a cabo en el interior de los nódulos radiculares, con la intervención de la enzima nitrogenasa presente en la bacteria (10).

3.2. Importancia de la fijación de nitrógeno

La cantidad de nitrógeno que las plantas necesitan para elaborar sus tejidos oscila entre 1 y 4% de su peso seco que es relativamente alta, comparada con la cantidad que necesita

de otros elementos, por lo que junto al potasio y fósforo se considera como macronutriente (10).

Generalmente los suelos minerales tienen cantidades totales de nitrógeno muy superiores a los requeridos por los cultivos, sin embargo casi todo este elemento se encuentra en forma orgánica y de la que anualmente sólo se mineraliza una pequeña fracción: del 1 al 3% del nitrógeno total; debido a esta liberación lenta del nitrógeno orgánico, éste frecuentemente se convierte en elemento limitante para la producción. Ya que todos los cultivos extraen cantidades variables de nitrógeno, por ejemplo: La alfalfa, 250 kg/ha/año; el maíz, 200 kg/ha/año; el trigo, 60 kg/ha/año; y a pesar que existe una gran cantidad de nitrógeno en la atmósfera, las plantas son incapaces de asimilarlo directamente del aire, con excepción de las plantas de la familia Leguminosae, en asociación con las bacterias de la familia Rhizobiaceae (3).

Es por ello que los fertilizantes nitrogenados se utilizan para corregir la deficiencia de nitrógeno y elevar los rendimientos de las cosechas; pero debido a los altos precios que han alcanzado los recursos energéticos utilizados para la elaboración de dichos fertilizantes ha surgido la necesidad de encontrar otra alternativa que resulte más económica y menos contaminante para el medio edáfico y ambiental y que aporte el nitrógeno que requieren los cultivos. Dicha alternativa es la fijación simbiótica de nitrógeno (10).

3.3. Ciclo del nitrógeno

La fuente final del nitrógeno utilizado por las plantas tiene su origen en el gas inerte N_2 que constituye aproximadamente el 78% de la atmósfera terrestre; sin embargo, en esta forma elemental no es utilizable por las plantas superiores sino que debe sufrir una serie de procesos químicos, físicos y biológicos, en los cuales ocurren varias transformaciones simultáneas y en diversos sentidos en los que participan componentes orgánicos, inorgánicos y volátiles (26).

Los caminos principales por los que el nitrógeno es convertido a formas utilizables por las plantas superiores comprenden :

1.- Transformaciones del Nitrógeno Molecular por medio de las descargas eléctricas atmosféricas en óxidos de nitrógeno los cuales al reaccionar con el O_2 , originan NO_3 que precipita con la lluvia.

2.- La fijación biológica en la cual el nitrógeno atmosférico (que se encuentra en forma molecular N_2), se reduce a la forma amoniacal por la intervención de ciertos microorganismos del suelo, ya sean simbióticos o de vida libre.

3.- A la vez el NO_3 a través de la desnitrificación puede volatilizarse y volver a ser NH_3 ó N_2 ó por medio de inmovilización convertirse en nitrógeno orgánico que a la vez por medio de la nitrificación o mineralización puede volverse a convertir en NO_3 (26).

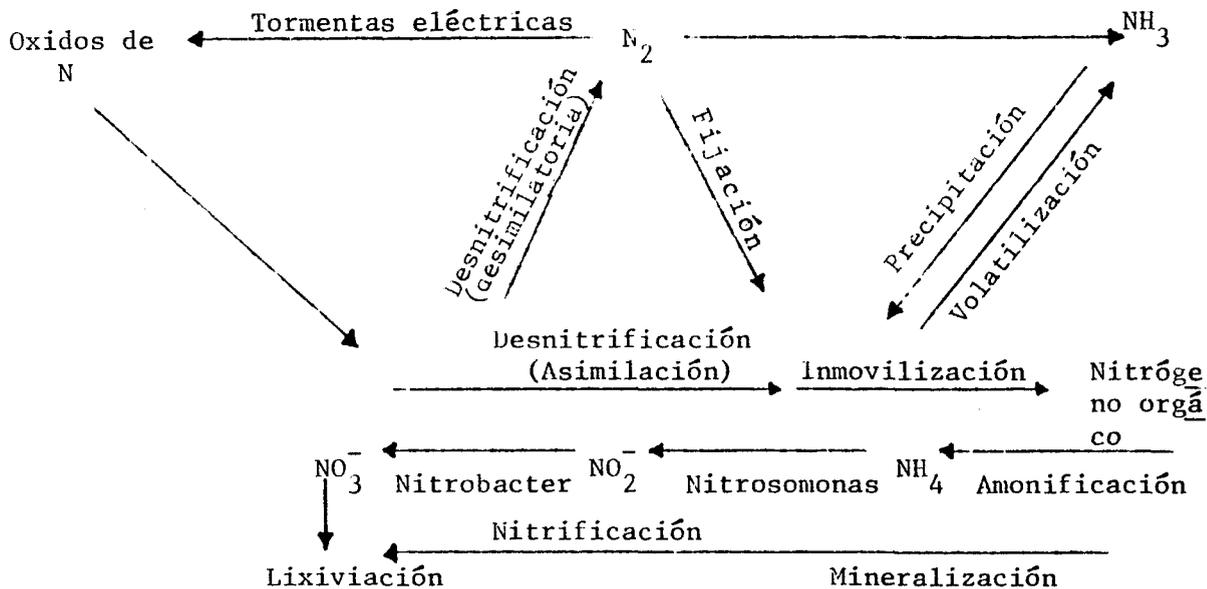


Figura L. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.*

* Tomado de CIAT-1987. Simbiosis leguminosa-Rhizobium, evaluación, selección y manejo.

3.4. Características de la familia Rhizobiaceae

Los rizobios son bacterias del suelo, caracterizadas por su habilidad para infectar a las leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico, en las raíces de dichas plantas, aunque en algunos casos los nódulos se forman en el tallo como en Sesbania y Aeschymene (10).

Las bacterias de la familia Rhizobiaceae son cultivadas a nivel de laboratorio en medio de Levadura-Manitol/Agar (LMA), en el cual el género Bradyrhizobium presenta un crecimiento lento y vuelve alcalino el medio; mientras que el género Rhizobium tiene una tasa de crecimiento rápido y produce acidez en el medio (10).

3.4.1. Características morfológicas y de crecimiento del género Rhizobium

Son bacilos Gram negativos, de tamaño mediano y forman nódulos en las raíces de las leguminosas, estableciendo una relación de simbiosis. Dentro del nódulo tienen formas bacteroide (bastones) de 0.5 a 0.9 por 1.2 a 3.0 μ . Además en medio de cultivo de LMA son bacilos móviles, aerobios que no forman esporas. La temperatura y pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 25-30 °C y 6-7, respectivamente (10). Mediante tinción de Gram, o en microscopio con contraste de fase, se pueden identificar aquellos cultivos con morfología diferente a la del Rhizobium (esporas, cocos, bacterias Gram positivas). Las características de las colonias cambian con el tiempo y las condiciones de incubación. Su textura puede ser cremosa o elástica. La apariencia puede ser gelatinosa, cerosa o acuosa. Las cepas de Rhizobium leguminosarum bv -- Phaseoli, forman colonias gelatinosas mientras las de Bradi-rhizobium sp. son de apariencia más variable.

Generalmente en sección vertical las colonias son redondeadas planas o redondeadas convexas (11).

3.4.2. Clasificación taxonómica

Reino	:	Procariota
División	:	Escotobacteriales
Clase	:	Schizomycetes
Orden	:	Eubacteriales

Familia : Rhizobiaceae
Género : Rhizobium
Especie : leguminosarum (6, 22, 23)

3.5. Simbiosis leguminosa-Rhizobium

Cuando una planta leguminosa fija el nitrógeno del aire su requerimiento de nitrógeno mineral es menor. El proceso se realiza por bacterias nitrificantes del género Rhizobium, siempre y cuando en el suelo exista una menor cantidad de nitrógeno que en el aire (17, 18).

No es la planta en sí la que puede fijar o aprovechar el nitrógeno gaseoso o atmosférico, sino las bacterias o rizobios de los nódulos radicales; pero, si son ineficientes, la planta tiene que satisfacer sus necesidades de nitrógeno recurriendo al que contiene el suelo (16).

Los rizobios infectan los pelos absorbentes de las raíces (pelos radicales) de las leguminosas; las bacterias toman alimento y energía de las plantas y éstas a su vez reciben el nitrógeno fijado por las bacterias. La bacteria existe en el suelo donde vive libremente.

Si en el terreno se ha sembrado anteriormente frijol, es seguro que existirá en cantidades suficientes, si no habrá que inocular la semilla al sembrarla (24).

Las bacterias toman nitrógeno (N) del aire circulante en el suelo y lo convierten en nitrógeno amoniacal (NH_4) para su propio uso y el de su hospedero.



La reacción anterior muestra como el N_2 molecular es convertido en NH_4 a través del proceso de fijación biológica - realizado por los rizobios. El NH_4 al ser oxidado es transformado en NO_2 y luego en NO_3 por medio del proceso de nitrificación.

Este proceso bioquímico hace que el nitrógeno atmosférico no aprovechable para el vegetal, se transforme en un compuesto fácilmente disponible. Luego el nitrógeno se traslada del sistema vascular de la planta hacia las hojas y frutos para su utilización (18, 19).

3.5.1. Proceso de infección de las leguminosas por Rhizobium

Esta bacteria se encuentra saprofíticamente en el suelo, pero sus poblaciones son usualmente encontradas en la rizósfera de las raíces libres en el suelo; cuando la bacteria llega a la raíz, toma contacto con los pelos radiculares y penetran a través de sus paredes (18, 22).

Posteriormente se forma un hilo o cordón de infección, luego, este hilo penetra las células de la raíz, multiplicándose las bacterias y formando nódulos.

La nodulación generalmente se verifica más o menos en el momento de brotar las primeras hojas verdaderas; un nódulo completamente formado puede ser de dos tipos, dependiendo de

las especies hospedantes; determinados o indeterminados. Los nódulos determinados tienen un meristemo de vida corta y son de forma esférica, en tanto que los nódulos indeterminados -- tienen un meristemo persistente, son de forma alargada y pueden ser ramificados (10, 21).

La actividad de fijación de nitrógeno depende de un suministro adecuado de carbohidratos por parte de la planta, de los cuales la bacteria obtiene la energía necesaria para la transformación de nitrógeno atmosférico a nitrógeno aprovechable y para la mantención del nódulo.

Durante la fase vegetativa la actividad de fijación de nitrógeno alcanza un nivel máximo y luego declina al iniciarse la competencia por carbohidratos para la producción de semillas.

Los cambios en la tasa de fotosíntesis son causados por varios factores como: luz, temperatura, y humedad; afectando directamente la fijación de nitrógeno realizadas en determinado momento.

El nitrógeno molecular que llena los espacios que quedan entre las partículas de suelo, es absorbido por las bacterias que se encuentran en los nódulos y por medio de una enzima especial llamada nitrogenasa, el nitrógeno es convertido en amoníaco, el cual se combina con los carbohidratos producidos -- por la fotosíntesis, para formar aminoácidos, que son trans-

portados hacia la parte aérea en forma de amidas (glutamina y asparagina) o Ureidos (alantonina y ácido alantónico) -- (10, 24).

3.5.2. Características de los nódulos

Los nódulos son evidentemente, el resultado de la irritación de la superficie de la raíz.

En general, los nódulos pueden desprenderse fácilmente al tirar de ellos suavemente, lo cual permite distinguirlos de las agallas causadas por nemátodos. El tiempo entre germinación de la semilla y la aparición de los nódulos visibles varía dependiendo de la cepa de Rhizobium, la leguminosa, el tamaño de la semilla, los niveles de nitrógeno en el suelo y otros factores ambientales (10, 27).

Los nódulos varían en su forma pudiendo ser: redondos, alargados o ramificados y en su tamaño. Algunas leguminosas forman nódulos muy pequeños (Stylosantes, Zornia, Desmodium) en tanto que otras forman nódulos grandes (Phaseolus, Centrosema, Pueraria). Sin embargo, dentro de la misma especie, el tamaño depende de la cepa de rizobio y de las condiciones ambientales (27). El color interno de los nódulos efectivos es rojo o rosado debido a la presencia de Leghemoglobina, que es una sustancia que se localiza fuera de las células bacterianas y cumple la función de suministrar oxígeno a estos organismos aeróbidos y a la vez mantienen el oxígeno libre en niveles bajos para proteger la enzima nitrogenasa. Si el co

lor interno de los nódulos es blanco o verde, generalmente son inefectivos; sin embargo, aunque la presencia de nódulos grandes, abundantes y de color rojo puede indicar alta fijación de nitrógeno; los nódulos rojos y abundantes pueden ser inefectivos (10).

Un nódulo efectivo puede mostrar, simultáneamente, zonas blancas, rojas y verdes, las cuales indican áreas de crecimiento del nódulo, áreas de fijación activa de nitrógeno y áreas de senescencia, respectivamente. Un nódulo muerto es de consistencia blanda y pierde su forma fácilmente (24, 9).

Las plantas deficientes en molibdeno tienden a formar nódulos de mayor tamaño y con aspecto externo normal, sin embargo, al hacerles un corte, se observan de color verde y aspecto senescente.

Ciertas especies de leguminosas, sólo forman nódulos con un rango limitado de cepas de rizobios, estas leguminosas se denominan específicas. Otras leguminosas forman nódulos con un rango amplio de rizobios, aislados de diferentes especies de leguminosas y se denominan promíscuas (16).

3.5.3. Factores que inciden en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Además de los factores propios de la simbiosis de la bacteria y su planta hospedera, existen una serie de factores, podemos mencionar :

3.5.3.1. Potencial de hidrógeno (pH)

Las especies leguminosas difieren mucho en su sensibilidad a la acidez del suelo pudiéndose desarrollar entre pH 3.5 y 8; las condiciones óptimas, sin embargo, se encuentran entre pH 5 y 6 (3). Al referirse a la acidez del suelo, se dice que muchos suelos tropicales virtualmente no tienen rizobios capaces de nodular en las raíces de Phaseolus vulgaris por lo cual la planta dependen exclusivamente de la inoculación para la formación de nódulos. En suelos ácidos, como los que predominan en las llanuras orientales de Colombia, el rizobio inoculado muere rápidamente. Para minimizar este efecto conviene utilizar inoculantes cuyo medio orgánico de conservación sea la turba y que las semillas sean recubiertas con cal. Estas prácticas que han probado ser efectivas para otras plantas leguminosas forrajeras como Trifolium subterraneum y Medicago sativa, también han sido satisfactorias en el caso de Phaseolus vulgaris. Sin embargo, hay evidencia de que algunas cepas de Rhizobium y variedades de Phaseolus vulgaris tienen tolerancia a estas condiciones ácidas (2).

3.5.3.2. Temperatura

La temperatura óptima para la simbiosis Leguminosa-Rhizobium es entre 18 y 22 °C, algunas especies toleran temperaturas extremas hasta de 40 °C (3).

Estudios hechos con Phaseolus vulgaris en 1973 en camas -

de cultivo con temperaturas controladas, muestran que hay un óptimo para la nodulación, en la mayoría de las variedades, está entre 28 y 32 grados Celsius (2).

Un ensayo hecho con Medicago sativa (L), mostró como la temperatura afectaba la fijación de nitrógeno y la distribución nodular. Se observó que las temperaturas sobre 30 °C - eliminaban la actividad nodular, esto debido a que la actividad de la planta en estudio es marcadamente sensitiva a temperaturas altas. Sólo la cubierta más alta del suelo a 5 cm calentó sobre 30 °C y esto contenía menos del 10% de todos los nódulos.

También se observó que la mayor parte de los nódulos estaban a profundidades de 10 a 30 cms. Los nódulos a profundidades mayores se mantuvieron a temperaturas óptimas entre 22 y 27 °C. Las limitaciones sobre nodulación profunda influyen probablemente a Medicago sativa, así como a otras legumbres. Relacionándolo a las profundidades del perfil del suelo (7).

3.5.3.3. Humedad

Las condiciones de humedad extrema del suelo, tanto de suelos secos como anegados permanentemente, tienen un efecto muy decisivo sobre la efectividad de la simbiosis y la cantidad de nitrógeno fijado (3).

En cultivos productivos de Vigna unguícola en California

en 1981 se llevó a cabo un estudio para ver los efectos de condiciones de buena irrigación y sequía en la nodulación y fijación de nitrógeno. Los investigadores usaron dos regímenes: 1) Bien irrigado; y 2) Régimen seco. Durante el período de crecimiento vegetativo temprano hubo una actividad nitrrogénica media total entre 0.25 y 0.22 Mol/planta/hora; en régimen bien irrigado y seco respectivamente. Se observó que la actividad nitrrogénica total alcanzó un máximo entre los estadios de floración y completa vainación con una actividad media de 22.5 y 18.8 moles/planta/hora, en 52 y 65 días para régimen bien irrigado y seco respectivamente. La reducción de la capacidad de fijación de nitrógeno es influenciada por la falta de agua en plantas de régimen seco. La diferencia de producción de cultivos de ambos regímenes es poca. Esto se debe a que Vigna unguiculata es una leguminosa tolerante a la sequía y por ello tiene la capacidad de resistir períodos extensos de sequía sin deteriorar su producción y así es explotada para reducir gastos de irrigación o cultivada en períodos de escasa lluvia.

3.5.3.4. Intensidad de luz solar

La influencia de este factor ha sido estudiada en Glicine max. El experimento se llevó a cabo en viveros, los cuales estaban contruidos con tela "Sarán" y regulados para cuatro niveles de radiación solar: 27, 45, 70 y 100% (este último -- sin tela sarán), usando también niveles de sombreamiento. --

Los resultados mostraron que la fijación simbiótica de nitrógeno aumentó en proporción directa con la intensidad de radiación solar y que ese aumento se debió a un mayor crecimiento individual de los nódulos y no a un aumento en el número de los nódulos. Este efecto se debe aparentemente a una mayor cantidad de carbohidratos disponibles en las plantas que reciben más iluminación. En las plantas con excesivo sombreado hay deficiencia de carbohidratos; aparentemente favorece la proliferación de los nódulos de Rhizobium, pero se vuelven poco eficientes en la fijación simbiótica de nitrógeno, - esto puede tener como consecuencia que la bacteria se vuelve parasitaria y causa grandes estragos en la planta. Se demostró que la fijación simbiótica de nitrógeno en Glicine max por acción de Rhizobium no tiene prácticamente efecto sobre el crecimiento de las plantas durante el primer mes después del plantío (9).

Se ha demostrado que el fotoperíodo controla el número de nódulos radiculares subterráneos fijadores de nitrógeno de -- las leguminosas. El fotoperíodo actúa a través de las hojas de las plantas. Puesto que la bacteria fijadora de nitrógeno en los nódulos necesita energía alimenticia manufacturada - por las hojas para realizar su labor, cuanto más luz y clorofila haya, tanto más alimento se le proporciona a la bacteria; así pues, la coordinación entre la planta y la bacteria se ve reforzada por el regulador fotoperiódico (8).

3.5.3.5. Aplicación de nitrógeno

La necesidad de una aplicación de nitrógeno para favorecer las fases iniciales de la simbiosis es muy discutida, especialmente en los relacionados al tipo de fuente nítrica o amoniacal (3).

Para analizar las respuestas de nodulación de nitrógeno aplicado, se ensayó con Glicine max. La mitad del sistema radical no recibió N₂ aplicado y a estos tratamientos se les identificó como tratamientos (-N) es decir que carecían de Nitrógeno y a la otra mitad si recibió Nitrógeno como fertilizante y se identificó a los tratamientos como recipientes (+N). El nitrógeno aplicado redujo el número y el peso de los nódulos en los recipientes identificados como (+N). Esto se interpreta como una inhibición no localizada del desarrollo nodular. Las respuestas a nitrógeno medido por aumento de peso de plantas en recipientes en vivero, no indica con seguridad las respuestas a nitrógeno en producción en el campo. La prueba concluyente debe venir de datos en producciones bien manejadas en el campo (5).

3.5.3.6. Influencia de fungicidas e insecticidas.

Hay suficiente evidencia de que en Phaseolus vulgaris -- los insecticidas, herbicidas y fungicidas aplicados al suelo no inhiben la nodulación; sin embargo, hay 2 casos en los -- cuales la aplicación de pesticidas afectaron la nodulación:

1) En la siembra de Phaseolus vulgaris y Glicine max que se hacen en Colombia una gran parte de la semilla es tratada -- previamente con insecticidas y fungicidas. Los pesticidas más comúnmente usados en este proceso son Malathión y Arasan y ambos limitan la supervivencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno; y 2) los insecticidas o fungicidas sistémicos, por ejemplo el Furadán, se pueden acumular en los tejidos vegetales hasta el punto de inhibir el desarrollo del nódulo - (2).

3.5.3.7. Nutrientes minerales o elementos menores.

Las deficiencias minerales del suelo afectan tanto el -- crecimiento de la leguminosa como a la formación de los nódulos, a la fijación de nitrógeno y a la capacidad de las plantas hospederas para utilizar el nitrógeno fijado (3). El Mg y el Ca no sólo son importantes en la neutralización de los suelos y en la producción de la planta, sino que influyen bastante sobre la fijación de nitrógeno (3, 12). El Fe es importante por formar parte de las proteínas que componen a la nitrogenasa. El (Co) cobalto se necesita en cantidades muy pequeñas para una fijación efectiva del nitrógeno, aunque las plantas hospederas crecen bien sin cobalto cuando hay nitrógeno disponible parece que el cobalto es necesario para el crecimiento de los microorganismos simbióticos (9).

Las leguminosas-Rhizobium necesitan cantidades elevadas de fósforo para su desarrollo y fijación óptima de nitrógeno, este elemento es importante en el proceso metabólico de síntesis protéica, en la nodulación y en el desarrollo de las raíces. Igualmente los niveles de disponibilidad de Boro y Molibdeno influyen en la nodulación y fijación de nitrógeno, ya que estos elementos como S, K y Oligo-elementos no tienen influencia tan específica sobre la fijación de nitrógeno, pero deben estar disponibles en cantidades adecuadas para permitir un buen desarrollo de las plantas y bacterias (3).

3.5.4. Manejo de los Rhizobios

Recolección y manejo de las cepas de Rhizobios.

El tener cepas con una buena capacidad de fijación de nitrógeno se debe en gran medida a la cantidad de germoplasma que se logre recolectar de diferentes suelos donde se siembre frijol.

Para la preservación de los nódulos recolectados en el campo es necesario colocarlos en frascos viales con rosca que contengan sílica gel como desecante utilizando algodón aislante entre el nódulo y la sílica gel.

La etapa más apropiada para recolectar los nódulos en frijol es durante la fase de crecimiento y, que es cuando el cultivo está en floración, o sea, entre los 25 y 30 días.

Si no se cuenta con cultivos establecidos que proporcionen nódulos puede utilizarse una muestra de suelo para el es

tablecimiento de plantas que sirvan de hospederas a los rizobios nativos de dicha muestra (1, 9).

3.5.4.1. Aislamiento

El aislamiento de los rizobios a partir de los nódulos - se inicia lavándolos con agua destilada estéril y luego, pasándola por alcohol al 95% ó hipoclorito de sodio al 3%.

Estos nódulos ya esterilizados se deben aplastar y estriarse sobre medio de cultivo levadura, manitol, agar (IMA); con un pH apropiado. Para purificarlo es necesario sembrar varias veces a partir de colonias individuales (11), estriando o rastrillando en la superficie del medio, hasta obtener colonias puras de bacterias (11).

Para asegurar la pureza del cultivo se realiza una serie de pruebas basadas en las características de crecimiento como : pH, incluyendo al medio de cultivo; azul de Bromotimol - como indicador en cual se torna de color amarillo si se produce acidez y de color azul si hay alcalinidad (11).

Una de las pruebas más utilizadas, es la adición de rojo congo al medio, el cual tiende a colorear de rojo intenso a - las bacterias diferentes a Rhizobium, ya que éste no lo absorbe y si lo hace es débilmente; aunque la intensidad del color de las bacterias no es una característica definitiva, pues la tonalidad varía de acuerdo a la concentración del indicador, edad del cultivo y exposición de las cajas petri a la luz -- (11).

3.5.4.2. Identificación

La identificación se realiza por medio de las pruebas: Coloración de Gram, prueba de ketolactasa y la habilidad para nodular una leguminosa, a través de las Jarras de Leonard, tubo de ensayo o bolsa de crecimiento (10, 11).

Coloración de Gram : Es una prueba para identificar las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las células Gram positivas toman un color violeta oscuro y las Gram negativas color rojo claro (10, 11).

Prueba de Ketolactasa : Agrobacterium es un género de -- bacterias que también pertenecen a la familia Rhizobiaceae; y tienen muchas características similares a las del Rhizobium -- como es crecimiento rápido.

Agrobacterium tumefaciens puede formar nódulos (tumores) en algunas leguminosas pero no tiene la capacidad de fijar N_2 .

La prueba de ketolactasa se emplea para diferenciar entre estos dos géneros. En esta prueba, la formación de un color amarillo después de diez minutos de haber aplicado el reactivo de Benedict (Anexo 8), indica la presencia de Agrobacterium.

Jarras de Leonard: Las Jarras de Leonard es uno de los -- dispositivos más usados por los Rizobiólogos para estudiar la capacidad de infección de las cepas de Rhizobium; este dispositivo permite hacer un buen control microbiológico y es útil para controlar la calidad de una cepa o para su identifica-- ción.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Fase de campo

La recolección de nódulos radiculares, conteniendo cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli, se realizó en las zonas frijoleras de la Cuenca del Lago de Ilopango, estableciéndose dos rutas de muestreo (ruta 1, sur; y Ruta 2, norte).

Ruta 1: Sur, comprende los Cantones de Asino y Joya Grande de Jurisdicción de Santiago Texacuangos, Departamento de San Salvador, donde la altura oscila entre los 460 a 900 msnm, y cuyos cultivos predominantes son los granos básicos y el café.

Ruta 2: Norte, comprende los cantones de Cujuapa, Jurisdicción de Cojutepeque y Cantón Las Delicias, Jurisdicción de Santa Cruz Michapa, Departamento de Cuscatlán (13), con similares altitudes a la Ruta 1, predominando el café, cereales y cítricos (Figura 2).

El trabajo se llevó a cabo mediante giras de campo realizadas durante el mes de octubre de 1992, a las áreas cultivadas con frijol y que se encontraban en fase de floración. Muestreando 15 sitios al azar entre los Cantones Asino y Joya Grande y 15 sitios entre los Cantones Cujuapa-Delicias. En cada sitio de muestreo se tomaron 3 muestras y se elaboró una hoja con la información necesaria acerca del cultivo, de acuerdo a las normas del CIAT (Anexo 1). Se seleccionaron -

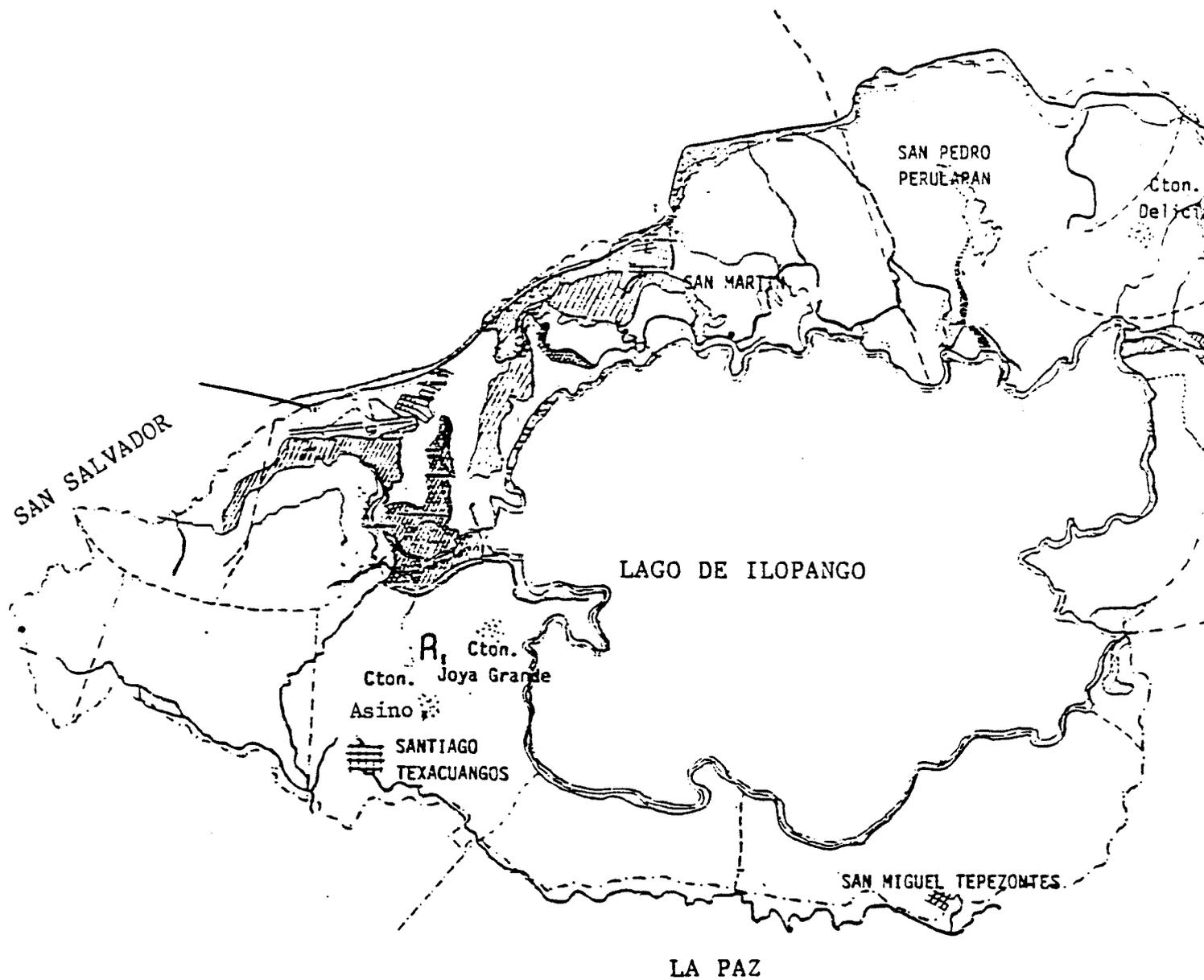


Fig. 2. Ubicación geográfica y zonas de muestreo de la Cuenca del Lago de Ilopango.

plantas sanas y vigorosas de frijol común Phaseolus vulgaris, variedad rojo de seda, principalmente y otras variedades de la zona las cuales eran sustraídas excavando a su alrededor con un palín, de tal manera que no se dañara el sistema radicular (Fig. 3 y 4). Una vez extraída la planta, se procedió a separar de las raíces todos aquellos nódulos con características de efectividad (grandes, compactos y de color rosado en su interior), guardándose en tubos individuales con tapón de rosca, todos los mejores nódulos correspondientes a una sola planta. Los tubos en su interior contenían 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 éstos no son utilizados. Cada tubo se identificó de acuerdo al lugar de colección, asignándoles un número tomado arbitrariamente, trasladándose, posteriormente al laboratorio donde cada tubo fue sellado con parafina y puesto en refrigeración por un período de 3 meses ya que la fase de laboratorio se inició en enero de 1993.

4.2. Fase de laboratorio

4.2.1. Aislamiento de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli

Esta fase de la investigación se realizó en el Laboratorio del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, ubica-



Fig. 3. Plantas sanas de Phaseolus vulgaris seleccionadas para coleccionar nódulos radiculares. Cuenca del Lago de Ilopango. 1992.



Fig. 4. Forma de extracción de las plantas de Phaseolus vulgaris para no dañar su sistema radicular. Cuenca del Lago de Ilopango. 1992.

da a 13°43' latitud norte y 98°10' latitud este con una elevación de 700 msnm, precipitación promedio anual de 1794 mm, temperatura promedio de 22.9 °C, humedad relativa de 73% y un promedio de luz solar de 8.3 horas/día.

Con el objeto de comprobar que los organismos presentes en los nódulos recolectados pertenecían a Rhizobium leguminosarum bv Phaseoli y obtener cultivos puros de éstos, para posteriormente evaluar la capacidad de infección y efectividad, se realizó esta fase de la investigación ya que existen otros organismos como Agrobacterium capaces de causar nódulos radiculares.

Los nódulos preservados en refrigeración fueron lavados primeramente con agua estéril y luego sumergidos por espacio de dos horas, también en agua estéril con la finalidad de hidratarlos y que perdieran parte de las impurezas que los cubría.

La esterilización superficial se efectuó en 7 cajas Petri, sumergiendo los nódulos previamente hidratados en la primera caja, que contenía alcohol al 95% dejándolos por espacio de 1 minuto, luego se trasladaron a una segunda caja con hipoclorito de sodio al 3% por espacio de 3 minutos. Los nódulos se lavaron posteriormente 5 veces con agua estéril en igual número de cajas.

Para aislar los Rhizobios de los nódulos se procedió a partir por mitad los nódulos de mayor tamaño utilizando una hoja de afeitar estéril, el contenido de cada mitad del nódulo

lo se estrió con una asa bacteriológica en una caja petri con-
teniendo levadura-manitol Agar (LMA) más indicador rojo congo,
luego se rotularon las cajas con un número que correspondía -
al lugar de recolección de los nódulos, posteriormente las ca-
jas Petri fueron dejadas en incubación durante 72 horas a tem-
peratura ambiente, efectuando revisiones frecuentes para des-
cartar las que presentaban crecimientos de hongos y evitar la
contaminación de las restantes. Las colonias puras obtenidas
en el primer cultivo fueron sub-cultivadas aproximadamente 10
veces, haciendo dos repeticiones por cada cepa; siendo consi-
derada como una cepa el crecimiento que se obtuvo en cada ca-
ja Petri a partir de un solo nódulo perteneciente a una plan-
ta de Phaseolus vulgaris y que presentó las características
típicas de Rhizobium que son morfología plana o convexa, tex-
tura elástica o cremosa y apariencia gelatinosa.

4.2.2. Diluciones en medio líquido

- Levadura Manitol (LM)

Debido a la presencia de una coloración rojiza en el -
centro de todas las colonias de las cepas de Rhizobium aisla-
das se optó por efectuar las diluciones con el objeto de se-
parar las colonias del posible contaminante que representaba
la coloración rojiza. Se utilizó un medio líquido conteniend-
do levadura manitol más hexametofosfato de sodio al 1% que -
actuaría como dispersante.

A cada cepa aislada previamente se le efectuó una dilu-

ción preparando para cada una de ellas 6 tubos de ensayo con tapón de rosca con 9 ml de medio líquido de levadura manitol LM, cada una. Posteriormente se tomó con una asa bacteriológica una colonia con las mejores características morfológicas de textura y color depositándose en un primer tubo, agitándolo fuertemente por espacio de 5 minutos obteniendo así la primera dilución; de este tubo se tomó 1 ml con una pipeta estéril y se colocó en un segundo tubo agitándose nuevamente; este proceso se continuó hasta completar el tubo número seis del cual se tomó 1 ml con una pipeta estéril y se colocó una gota en una caja Petri conteniendo medio de cultivo levadura, manitol, agar (LMA) y con un rastrillo de vidrio estéril se dispersó la gota en toda el área (Anexo 12). Se efectuaron dos repeticiones para cada cepa, incubándose a temperatura ambiente durante 72 horas, obteniéndose así cultivos puros de Rhizobium libres de contaminante (Fig. 5 y 6).

4.3. Infección en Jarras de Leonard

Con el propósito de cuantificar la capacidad de infección y a la vez corroborar si las cepas aisladas correspondían a Rhizobium, a través de la capacidad de nodulación se realizó esta prueba.

4.3.1. Esterilización de la semilla

Se seleccionaron semillas de frijol Phaseolus vulgaris recién cosechadas y de buena calidad, las cuales fueron colo

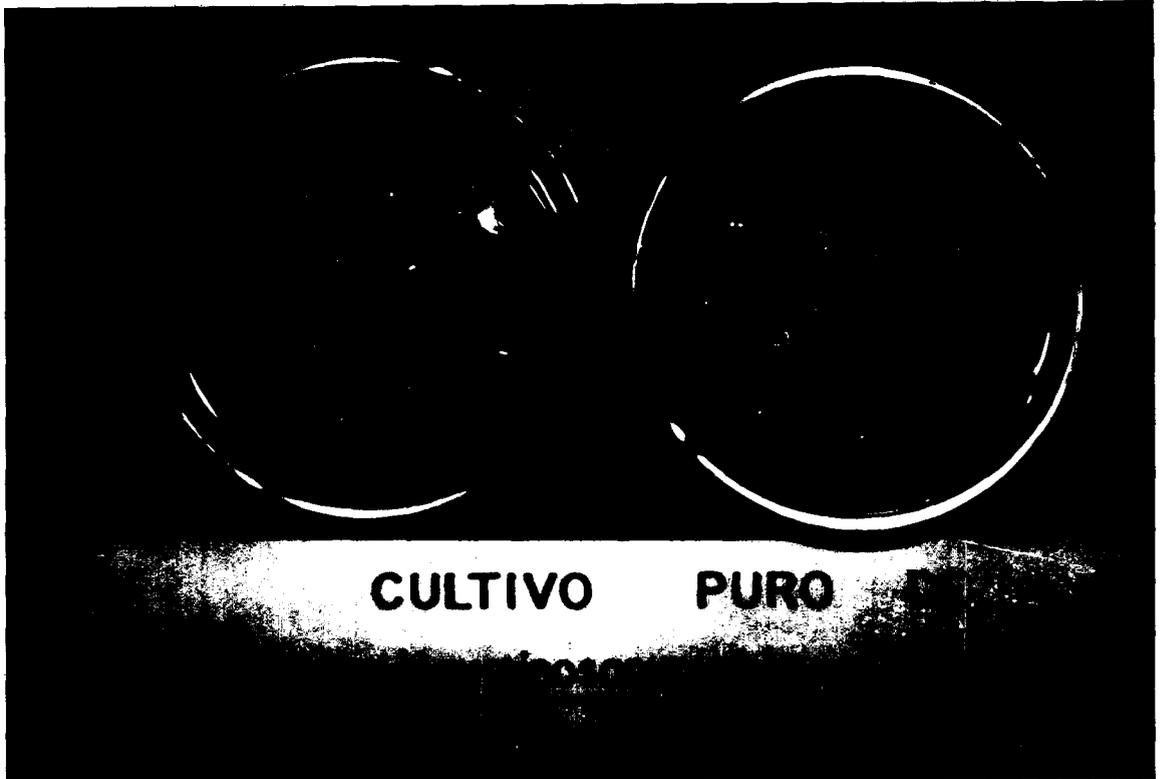


Fig. 5. Cultivos puros de Rhizobium en medio LMA más indicador Rojo Congo. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES, 1993.



Fig. 6. Cultivos puros de Rhizobium en medio LMA más indicador Rojo Congo. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES. 1993.

cadadas en un Erlenmeyer de 100 ml y cubiertas de alcohol al 95% agitándolas durante 3 minutos, vaciando luego el alcohol. Se llenó nuevamente el Erlenmeyer con hipoclorito de sodio al 3%, dejando las semillas en reposo durante 3 minutos; luego fueron lavadas 5 veces con agua estéril, al finalizar este proceso fueron dejadas con agua estéril durante dos horas para que las semillas la embebieran (Fig. 7). 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 48 horas hasta que germinaron (Fig. 8).

4.3.2. Preparación de la arena de río

La arena se pasó por un tamíz de 3 mm con el propósito de que no quedara muy gruesa. Se tomaron aproximadamente 150 libras de arena, suficientes para montar 100 jarras y se diluyó 1 litro de H_2SO_4 de 96% de concentración en 5 litros de agua con el fin de utilizarla para lavar la materia orgánica y purificar la arena.

La arena fue colocada en un recipiente de plástico agregándole el H_2SO_4 diluido, luego se completó con agua hasta un nivel que cubría totalmente la arena mezclándola bien y dejándola reaccionar durante 24 horas, posteriormente se introdujo una manguera hasta el fondo del recipiente y se dejó fluir el agua para que lavara la arena hasta que el agua salió cristalina.

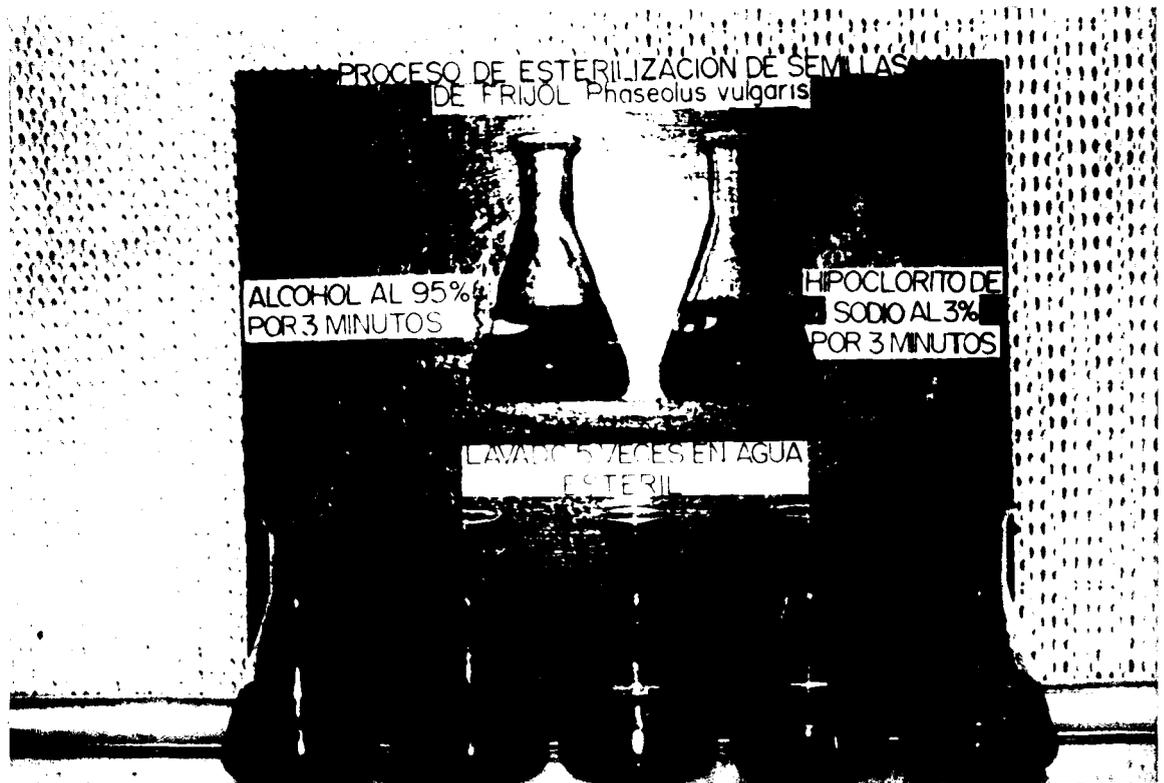


Fig. 7. Proceso de esterilización de semillas de frijol *Phaseolus vulgaris*. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES. 1993.

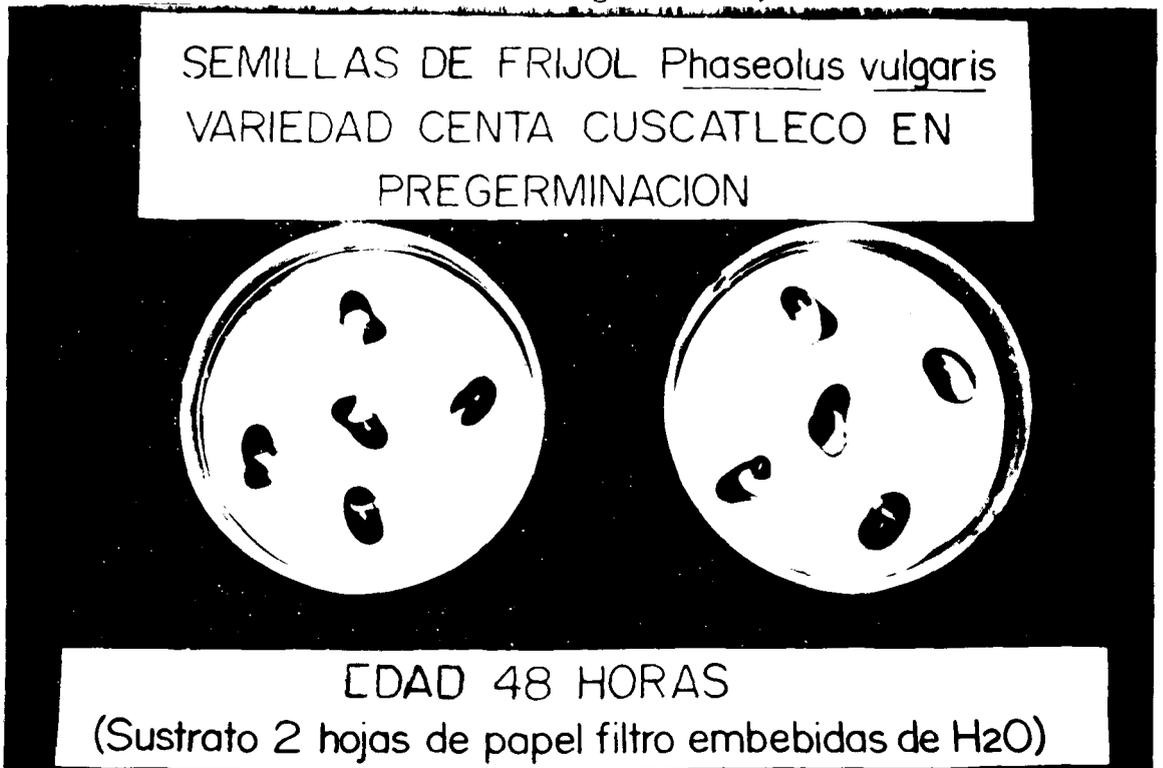


Fig. 8. Semillas de frijol *Phaseolus vulgaris* en proceso de pregerminación. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES. 1993.

Cuando se comprobó que la arena estaba bien lavada se extendió para secarla al aire.

4.3.3. Preparación del inoculante

Para preparar el inoculante se seleccionó una caja Pe-
tri correspondiente a cada una de las 56 cepas aisladas, en
la cual existiera buen crecimiento de los Rizobios. Para ca-
da una de las cepas se preparó 20 ml de medio de cultivo lí-
quido Levadura Manitol (LM) esterilizado, depositándolo en -
un Erlenmeyer de 100 ml, luego se vertieron 2 ml de LM en la
caja con el propósito de despegar con el asa todas las colo-
nias de Rizobio que hubieran crecido, con la ayuda de una pi-
peta se devolvió el líquido al Erlenmeyer, tapando el frasco
con cuidado para evitar la contaminación.

Se colocaron los Erlenmeyer en un agitador durante 24 ho-
ras para homogenizar el caldo y acelerar el proceso de creci-
miento de las cepas a través de la aireación que le proporci-
ona el movimiento.

4.3.4. Montaje y manejo de las plantas en las Jarras de Leonard

La parte superior la constituyó una botella de vidrio -
de aproximadamente 750 ml de capacidad, a la que se le quitó
el fondo, tomando la forma de embudo, la parte inferior, de
igual manera, la constituyó también una botella con la dife-
rencia que a ésta se le cortó el cuello quedando en forma de

vaso.

A la parte en forma de vaso se le agregaron 600 ml de solución nutritiva de Sandman (Anexo 3). A la parte en forma de embudo se le colocó una mecha de algodón en el cuello y se le rellenoó con 500 gr de arena de río previamente lavada. Luego se incrustó el cuello del embudo conteniendo la mecha de algodón en la botella en forma de vaso que contenía la solución nutritiva por capilaridad hasta la parte superior de la jarra que contenía la arena (Fig. 9). Se tapó la parte superior de la botella con papel aluminio y, a la vez, la jarra fue envuelta, en su totalidad con papel oscuro asegurándolo con cinta adhesiva. Todas las jarras fueron esterilizadas en el autoclave durante 2 horas.

4.3.5. Siembra e inoculación de la semilla

Las Jarras de Leonard fueron colocadas sobre un banco, dentro del invernadero de la Facultad de Ciencias Agronómicas a un distanciamiento de 25 cm entre cada jarra (Fig. 10).

El día de la siembra se humedeció la arena de las jarras con 200 ml de solución de calcio (Anexo 4). Con la ayuda de paletas de madera estériles se removi6 la arena y se colocaron dos semillas germinadas en cada jarra, posteriormente se agregó 1 ml de inoculante de la cepa correspondiente que tenía una concentración de 10^7 células/ml cubriéndose luego las semillas con la arena. Las Jarras fueron cerradas con la tapa de una caja Petri y, a la vez, identificadas con el número



Fig. 9. Componentes de una Jarra de Leonard. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES. 1993.



Fig. 10. Montaje de la prueba de nodulación en Jarras de Leonard. Facultad de Ciencias Agronómicas, UES. 1993.

de cepa con que fueron inoculadas. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de 2 cm, se retiró la tapa de la caja Petri que cubría cada jarra y se cubrieron parcialmente con papel aluminio. Durante 5 semanas se le dió mantenimiento al ensayo revisando periódicamente el nivel de la solución nutritiva, el riego se efectuó agregando solución de Sandman (diluida 1:4) al frasco inferior de la jarra.

Al término de 5 semanas, cuando el cultivo estaba en floración, lo cual coincide con el desarrollo y actividad de los nódulos se procedió a extraer las plantas de las Jarras de Leonard, para evaluar la nodulación, utilizándose el método del número de nódulos por planta sugerido por CIAT (1987).

Se establecieron 5 categorías de nodulación (Anexo 5).

Posteriormente al ensayo en Jarras de Leonard se seleccionaron 9 cepas las cuales presentaron nodulación muy abundante en el rango de más de 100 nódulos, las cepas restantes presentaron menor nodulación por lo que no se consideraron para la evaluación. La identificación de estas nuevas cepas se efectuó en base a las características macroscópicas (Cuadro 3), y a sus características microscópicas a través de la tinción de Gram (Anexo 6), donde las bacteria de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli, adquieren una tonalidad rosada por ser bacterias Gram negativas.

Además se les practicó la prueba bioquímica de siembra en medio ketolactasa (Anexo 7), que permite diferenciar Rhizobium de Agrobacterium; para lo cual se estriaron las cepas en medio

de ketolactasa, después de observado el crecimiento de las cepas, el medio se cubrió con 15 ml de reactivo de Benedict (Anexo 8), observándose el resultado 10 minutos después. (Cuadro 5).

4.4. Evaluación en maceta invernadero

Se estableció el ensayo en maceta-invernadero, para evaluar las cepas de Rhizobium que sobresalieron en la prueba de las Jarras de Leonard. El ensayo se montó en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (Figura 11). El número de cepas evaluadas fue de 10, 9 provenientes de la prueba de nodulación en Jarras de Leonard y la cepa CIAT-613, inoculando con cada una de estas cepas tres variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris) las cuales fueron: Centa Cuzcatleco, Centa Jíboa y Rojo de seda, por ser variedades de uso generalizado en las zonas frijoleras de la Cuenca del Lago de Ilopango, principalmente en los Cantones Asino, Joya Grande, Cujuapa y Las Delicias, lugares de donde se obtuvieron los nódulos de los que se aislaron las cepas de Rhizobium.

Para la realización del ensayo se emplearon macetas de plástico con capacidad para 2 kg de suelo. El suelo se obtuvo en las zonas en estudio, tamizándolo con una malla de 1.0 cm de diámetro, luego fue esterilizado en un horno de 180 °C durante 2 horas; posteriormente cada maceta fue llenada con este suelo y tapada para evitar contaminantes. La distribu-

ción de las macetas se realizó de acuerdo al diseño estadístico empleado (Anexo 11).

Se hizo, además, una reasignación de números a las 9 cepas seleccionadas (Anexo 10), con la finalidad de facilitar el manejo de los datos, asignándoles un número correlativo del 1 al 9 y el número 10 a la cepa CIAT-613; dicho número fue de acuerdo a la cantidad de nódulos presentados por cada cepa, correspondiéndole el número 1 a la cepa con mayor nodulación.

Se pusieron a germinar las semillas de las 3 variedades de frijol en cajas petri, también se preparó 20 ml de inoculante por cada una de las 10 cepas a evaluar.

Una vez distribuidas las macetas en el invernadero se procedió a la siembra e inoculación de las semillas de frijol en cada maceta. Se colocaron tres semillas por maceta y fueron inoculadas cada una con 0.5 ml de inoculante conteniendo 10^7 cel/ml para lo cual se utilizaron pipetas estériles. Se mantuvo un buen control de la humedad, tratando que todas las plantas tuvieran el mismo nivel hídrico, para lo cual se hicieron riegos cada dos días, distribuyendo uniformemente sobre las macetas, 300 ml de agua. Cuando las plántulas desarrollaron dos hojas verdaderas, se procedió a efectuar un raleo, dejando únicamente dos plantas por unidad experimental (maceta); eliminando la de menor desarrollo. Para la prevención de plagas, principalmente mosca blanca (Bemisia tabaci), se colocaron cajas Petri conteniendo extracto de ajo a un --

distanciamiento de 0.75 m, siendo en total 8 cajas Petri.

La cosecha de las plantas de frijol se realizó cuando éstas llenaron vainas, lo cual ocurrió a los 65 días después de la siembra, se obtuvo la planta en su totalidad, raíces y parte aérea, colocándose en bolsas de papel y sometiéndose a una temperatura de 70 °C en una estufa hasta que su peso fue constante, se les efectuó el análisis de nitrógeno por el método de microkheldahl realizado en los Laboratorios de la Unidad de Química de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de El Salvador.



Fig. 11. Ensayo Maceta-Invernadero. Facultad de Ciencias Agronómicas. UES, 1994.

4.4.1. Metodología estadística

El diseño utilizado para este ensayo fue el completamente al azar y el análisis o arreglo combinatorio aplicado el de experimentos factoriales considerándose éste un arreglo bifactorial, siendo el factor 1, la variedad de frijol - Phaseolus vulgaris en tres niveles de estudio, es decir, 3 variedades y el factor 2 la cepa de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli en diez niveles de estudio o sea diez cepas, resumiéndose de la siguiente manera :

No.	Factores	Niveles
1	Variedad de frijol	Cuzcatleco (V_1), Rojo de Seda (V_2), Centa Jiboa (V_3).
2	Cepa de <u>Rhizobium</u>	$C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$.

Para examinar los resultados del ensayo se empleó el modelo estadístico lineal :

$$Y_{ijk} = U + T_i + B_j + (TB)_{ij} + E_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a = 3$$

$$j = 1, 2, \dots, b = 10$$

$$k = 1, 2, \dots, n = 3$$

Donde abn = Total de observaciones del experimento

U = Media del experimento sobre el cual giran las observaciones, es decir el factor común.

- T_i = Es el efecto del i -ésimo nivel del factor a
- B_j = Es el efecto del j -ésimo nivel del factor b
- $(TB)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción entre T_i y B_j
- E_{ij} = Errores aleatorios con media cero sin correlación entre sí. Habiéndose aplicado a este ensayo también la prueba de Duncan con el objeto de evaluar cual variedad se comporta mejor (14).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Aislamiento

De 90 muestras obtenidas de nódulos radiculares de frijol común (Phaseolus vulgaris), recolectados en las zonas -- frijoleras de la Cuenca del Lago de Ilopango, específicamente en las áreas que corresponden a los Departamentos de Cuscatlán y San Salvador, donde la variedad predominante es el frijol Rojo de Seda, se logró aislar 56 cepas nativas de Rhizobium phaseoli correspondientes al 62% del total de muestras, perdiéndose durante el proceso de aislamiento debido a contaminantes y factores adversos, 34 muestras que representaron el 38%. (Cuadro 1), lo que demuestra que la población nativa de estos microorganismos en nuestros suelos es abundante. Ya en 1971, ZEPEDA logró aislar cepas nativas de nódulos recolectados en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias -- Agronómicas de la Universidad de El Salvador, ubicado en el Departamento de La Paz. De igual manera, PINEDA en 1987 realizó una investigación con el fin de determinar la eficiencia de cepas nativas de Rhizobium phaseoli que logró aislar de nódulos radiculares de frijol (Phaseolus vulgaris) recolectados en dos diferentes zonas frijoleras de El Salvador: Ahuachapán y Santa Ana en la zona occidental; Cabañas y Cuscatlán en la zona central, RIVAS FLORES et al., 1990, aisló e identificó cepas nativas de Rhizobium phaseoli para ello recolectó -- los nódulos producidos por diversas variedades de frijol en --

las zonas de producción de Ahuachapán y Santa Ana. Esto demuestra la presencia de Rhizobium en los suelos de El Salvador y la importancia de lograr aislar cepas nativas adaptadas a nuestras propias condiciones ambientales y de suelo con el objeto de aprovechar esta relación simbiótica entre cepa y planta, lo cual redundaría en una alternativa promisoriosa y sostenida en la explotación de dicho cultivo.

Cuadro 1. Cantidad de muestras recolectadas de nódulos radiculares en Phaseolus vulgaris, y resultado del proceso de aislamiento. Fac. CC.AA. UES, 1993.

PROCEDENCIA	No. DE MUES TRAS RECO- LECTADAS	No. DE MUES TRAS AISLA- DAS	No. DE -- MUESTRAS PERDIDAS/ CONTAMINA- CION
- RUTA 1			
Cantones Asino - Joya	45	21	24
Grande	45	21	24
- RUTA 2			
Cantones Cujuapa- Delicias	45	35	10
T O T A L	90	56	34
PORCENTAJE	100%	62%	38%

5.2. Identificación de las cepas

5.2.1. Prueba de nodulación en Jarras de Leonard

Al ser evaluadas las 56 cepas en Jarras de Leonard, y clasificarlas en los diferentes rangos de nodulación que propone

CIAT-1987, se obtuvieron los siguientes resultados (Cuadro 2); el 10.7% que corresponde a 6 cepas no presentaron nodulación, posiblemente no se trataba de Rhizobium phaseoli, ya que se les brindó todas las condiciones necesarias y controladas en las Jarras de Leonard que permiten que el Rhizobium phaseoli inoculados forme nódulos. 17 cepas que representan el 30.35% del total de cepas aisladas, presentaron entre 1 y 10 nódulos. 13 cepas que reflejan el 23.21%, mostraron nodulación en un rango de 10 a 50 nódulos por planta; mientras que en el rango de 50-100 nódulos se ubicaron 10 cepas que corresponden al 17.85%. De igual manera, 10 cepas presentaron una nodulación superior a 100 nódulos por planta, que equivale al mismo porcentaje de la categoría anterior, por lo que fueron estas cepas las seleccionadas para efectuar la evaluación a nivel de maceta invernadero a excepción de la cepa 38, la cual presentó nódulos con características de ineficiencia, color interno blanco o verde y consistencia blanda, no así las restantes nueve cepas, que aparte de presentar abundante nodulación, las características de éstos indicaban eficiencia, reflejada en la presencia dentro del interior del nódulo de zonas blancas, rojas y verdes que indican áreas de crecimiento del nódulo - según KIPE NOLT et al, 1987.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, -- 1987, en su manual de métodos de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-Rizobio, recomienda la evaluación de la infectividad de las cepas de Rhizobium a través

de las Jarras de Leonard.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de nodulación en Jarras de Leonard, en base a las categorías propuestas por el CIAT, 1987. Fac. CC. AA. UES, 1993.

	MAS de 100 NODULOS	50-100 NODULOS	10-50 NODULOS	1-10 NO DULOS	0 NODULOS
N	1	5	3	2	23
U	15	9	4	8	28
M	19	26	6	12	29
E	14	32	7	21	52
R	17	35	10	24	53
O	25	41	11	27	54
	34	43	16	30	
D	38	47	16	31	
E	39	55	18	33	
	40	56	20	36	
C			22	37	
E			42	45	
P			44	46	
A				48	
				49	
				50	
				51	
TOTAL DE CEPAS	10	10	13	17	6
%	17,85	17,85	23,21	30,35	10,71

5.2.2. Características morfológicas macroscópicas

Luego de haber efectuado el análisis morfológico macroscópico, se obtuvieron los resultados descritos en el Cuadro 3,

en el cual se observa que la mayoría de las colonias presentó una morfología redondeada convexa a diferencias de las cepas 39 y 19 cuya forma era redondeada plana. En cuanto a -- textura, la cual podría ser elástica o cremosa, solamente una cepa mostró textura elástica (cepa 40), siendo las restantes 9 cepas de textura cremosa. En lo que respecta a apariencia todas las cepas presentaron una apariencia gelatinosa, lo que concuerda con lo afirmado por KIPE NOLT et al, 1987; las cepas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli, forman colonias gelatinosas, mientras las de Bradyrhizobium son de apariencia más variable.

Cuadro 3. Características morfológicas macroscópicas de las cepas aisladas de Rhizobium leguminosarum bv Phaseoli. Fac. CC.AA. UES, 1993.

NUMERO DE CEPA	FORMA		TEXTURA		APARIENCIA		
	REDONDEA DA PLANA	REDONDEA DA CONVE XA	ELASTI CA	CREMO- SA	SECA	GELATI NOSA	ACUOSA
1		*		*		*	
39	*			*		*	
14		*		*		*	
15		*		*		*	
17		*		*		*	
19	*			*		*	
25		*		*		*	
34		*		*		*	
40		*	*				

5.2.3. Características microscópicas

Los resultados obtenidos en base a la prueba de tinción de Gram y el análisis microscópico efectuado a las 9 cepas - seleccionadas (Cuadro 4), confirmó las características microscópicas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli descritas por KIPE NOLT et al, 1987, en el Manual de métodos de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-Rhizobio, en el cual afirma que los rizobios son microorganismos de morfología bacilar Gram negativas y móviles.

Cuadro 4. Características microscópicas de las 9 cepas nativas de Rhizobium leguminosarum bv Phaseoli seleccionadas. Fac. CC.AA. UES, 1993.

NUMERO DE CEPA	MORFOLOGIA			TINCION DE GRAM	
	ESPORAS	BACILOS	COCOS	GRAM POSI TIVAS	GRAM NEGATI VAS
14		*			*
25		*			*
34		*			*
39		*			*
17		*			*
40		*			*
15		*			*
19		*			*
1		*			*

Gram positivos : Adquieren coloración violeta

Gram negativos : Adquieren coloración rojo claro.

5.2.4. Prueba de ketolactasa

Al realizar esta prueba a las 9 cepas seleccionadas no se observó un color amarillo después de haberles aplicado el -- reactivo de Benedict, descartando así la presencia de Agrobacterium (Cuadro 5), que según CIAT-1987, es un género de bacterias que también pertenecen a la familia Rhizobiaceae y tiene muchas características similares a las de los Rizobios de crecimiento rápido como Rhizobium.

Cuadro 5. Respuesta de las 9 cepas seleccionadas de Rhizobium a la prueba de ketolactasa. Fac. CC.AA. UES, 1993.

NUMERO DE CEPA	KETOLACTASA
1	-*
39	-
14	-
15	-
17	-
19	-
25	-
34	-
40	-

* El signo (-) indica que no existió viraje a color amarillo al aplicar el reactivo de Benedict.

Agrobacterium tumefaciens puede formar nódulos (tumores), en algunas leguminosas pero no tienen la capacidad de fijar -

N₂. Con la prueba de ketolactasa se confirmó que las cepas seleccionadas efectivamente pertenecen al género Rhizobio.

PINEDA, 1987 y RIVAS FLORES, et al, 1990, en trabajos realizados utilizaron las mismas pruebas para identificar - Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli a excepción de la - prueba de nodulación en Jarras de Leonard, y dichas pruebas arrojaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

5.3. Evaluación a nivel de maceta invernadero

De las 99 unidades experimentales, en estudio de las - tres variedades de frijol inoculadas con diez cepas de Rhizobium leguminosarum a nivel de maceta invernadero, solamente - a 90 se les hizo el análisis del contenido de nitrógeno por - medio del sistema de Kjeldahl. Debido a que 9 unidades se - perdieron por causa de factores externos difíciles de controlar.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de estos análisis y se puede observar que el porcentaje de nitrógeno oscila entre el 1.960 y 3.270%, tal como lo afirma CIAT en su manual de métodos de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-Rhizobium en 1987, y dice que el porcentaje de nitrógeno en las plantas es del 1 al 4%.

Cuadro 6. Rendimiento en porcentaje de nitrógeno de tres variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) inoculadas con 10 cepas de Rhizobium. Fac. CC.AA., UES, 1994.

VARIEDAD	TRATAMIENTOS	REPETICIONES		
		1	2	3
ROJO DE SEDA	T ₁	2.414	2.520	2.414
	T ₂	2.804	2.123	2.739
	T ₃	2.641	2.516	2.609
	T ₄	2.328	2.556	2.913
	T ₅	2.449	2.457	2.368
	T ₆	2.488	2.350	2.536
	T ₇	2.680	2.460	2.769
	T ₈	2.808	2.321	2.156
	T ₉	2.686	2.673	2.545
	T ₁₀	2.124	2.553	2.156
	*TES	-----	-----	1.910
CENTA GUZCATLECO	T ₁	2.257	2.329	2.182
	T ₂	2.620	2.404	2.500
	T ₃	2.262	2.043	2.670
	T ₄	2.489	-----	2.560
	T ₅	2.422	2.427	2.510
	T ₆	1.960	2.212	2.348
	T ₇	2.518	2.672	2.593
	T ₈	2.536	2.196	2.382
	T ₉	2.468	2.620	2.083
	T ₁₀	3.227	2.616	2.505
	*TES	-----	2.119	-----

* El valor de los testigos no se tomó en cuenta debido a que la mayoría se perdió y el dato obtenido no se considera representativo.

Continuación Cuadro 6.

VARIEDAD	TRATAMIENTOS	REPETICIONES		
		1	2	3
CENTA JIBOA	T ₁	2.297	2.560	2.449
	T ₂	2.500	2.561	2.592
	T ₃	2.880	2.339	3.270
	T ₄	3.094	3.024	2.792
	T ₅	2.656	2.918	2.729
	T ₆	2.644	3.219	3.187
	T ₇	2.860	-----	-----
	T ₈	2.665	2.760	2.636
	T ₉	2.556	2.476	2.680
	T ₁₀	2.297	2.641	2.209
	*TES	-----	-----	1.958

El cuadro de análisis de varianza a partir del contenido de nitrógeno (Cuadro 7), demuestra que existe diferencia altamente significativa en un nivel α de 0.01 y 0.05% entre las fuentes de variación: Tratamientos, variedad e interacción - variedad cepo. Haciendo notar que entre las cepas de Rhizobium no hubo diferencias significativas considerando que el nivel de efectividad de las cepas evaluadas en este caso fueron similar y que todas las cepas tienen la misma capacidad para fijar nitrógeno, toda vez que sean inoculados en la variedad de frijol específica.

Cuadro 7. Análisis de varianza a partir del porcentaje de nitrógeno
 las unidades experimentales. Fac. CC.AA. UES, 1995.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F. CALCULADA
Tratamiento	29	3.69853157	0.12753557	2.9
Variedad	2	1.11518672	0.55759336	12.79
Cepa	9	0.60540066	0.06726674	1.54
Interacción	18	1.90235906	0.10568661	2.42
V x C				
ERROR EXPERIMENTAL	57	2.48541383		
	86			

Coefficiente de variabilidad (CV) = 8.225

ns = No significativa

** = Altamente significativa

En la prueba de Duncan (Cuadro 8), se observa que la variedad de frijol que interactuó y se comportó superior fue la Centa Jiboa; en cambio, las variedades Rojo de Seda y Centa Cuzcatleco, presentaron un rendimiento menor pero similar entre ellos, es decir que las cepas de Rhizobium actuaron con estas dos variedades de una manera muy semejante tal como también lo muestra la Figura 12. Esto lo confirma PAULINI et al, 1969; RENIE y KEMP, 1983; ROSAS y BLISS, 1986, - citados por TEREZON et al, los cuales en sus estudios a nivel de campo concluyeron, que la variedad de frijol (Phaseolus vulgaris), ejerce una influencia determinante sobre la eficiencia de las cepas que se ve reflejado en el porcentaje de nitrógeno que la planta posee.

OCAMPO en 1979 aseguró que las cepas de Rhizobium sólo forman nódulos y fijan más nitrógeno con ciertas especies de leguminosas.

Cuadro 8. Resultados de la separación de medias a través de la Prueba de Duncan en tres variedades de frijol - (Phaseolus vulgaris). Fac. CC.AA. UES, 1995.

% DE NITROGENO (\bar{X})	N	VARIEDAD	GRUPO DE DUNCAN
2.696	28	JIBOA	A
2.432	29	CENTA CUZCATLECO	B
2.506	30	ROJO DE SEDA	B

A = Diferente a las demás variedades.

B = Variedades similares.

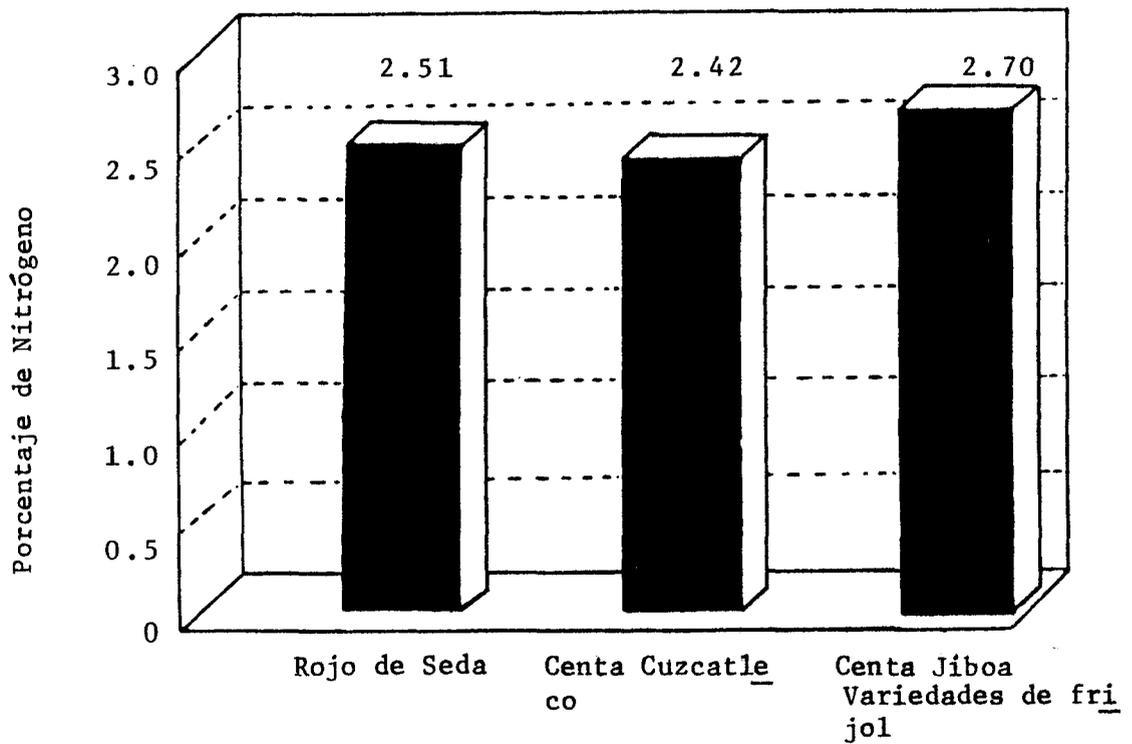


Fig. 12. Contenido de nitrógeno para tres diferentes variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris) inoculadas con cepas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli.

Habiendo confirmado también Bernard en 1976, quien dijo - que además de los factores propios de la simbiosis planta hosp_{ed}era-bacteria de Rhizobium, existen otros factores que influyen en la fijación de nitrógeno tales como pH, temperatura, grado de humedad, luz solar, y la cantidad de nitrógeno presente en el suelo al grado que algunas variedades de frijol - fijan más nitrógeno que otros. En estudios realizados por -- PINEDA en 1987 y CALDERON en 1993 en El Salvador, concluyeron que al estudiar la simbiosis leguminosa-Rhizobio en variedades de frijol, que las cepas interactuaban mejor con las variedades Centa Izalco y Rojo de Seda; destacándose en este trabajo que la variedad Rojo de Seda tuvo un comportamiento intermedio tal como lo muestra la Figura 13.

Al hacer una evaluación del rendimiento en porcentaje de nitrógeno de las interacciones variedad de frijol-cepa de Rhizobium se determinó que la mejor interacción la formaron la - variedad Centa Jiboa con la cepa No. 6, presentando un rendimiento de 3.02% y la de menor valor, la interacción de la variedad Centa Cuzcatleco con la misma cepa No. 6 en un valor de 2.17% donde realmente queda comprobado que la efectividad de las cepas responde a determinada variedad de frijol en que ha sido inoculada y evaluada (Cuadro 9).

Otro aspecto que es importante considerar es el efecto - que presentó la cepa CIAT 613, con respecto a la interacción con frijol Centa Cuzcatleco, obteniendo un porcentaje de nitrógeno de 2.78 que fue mayor que el presentado con las va-

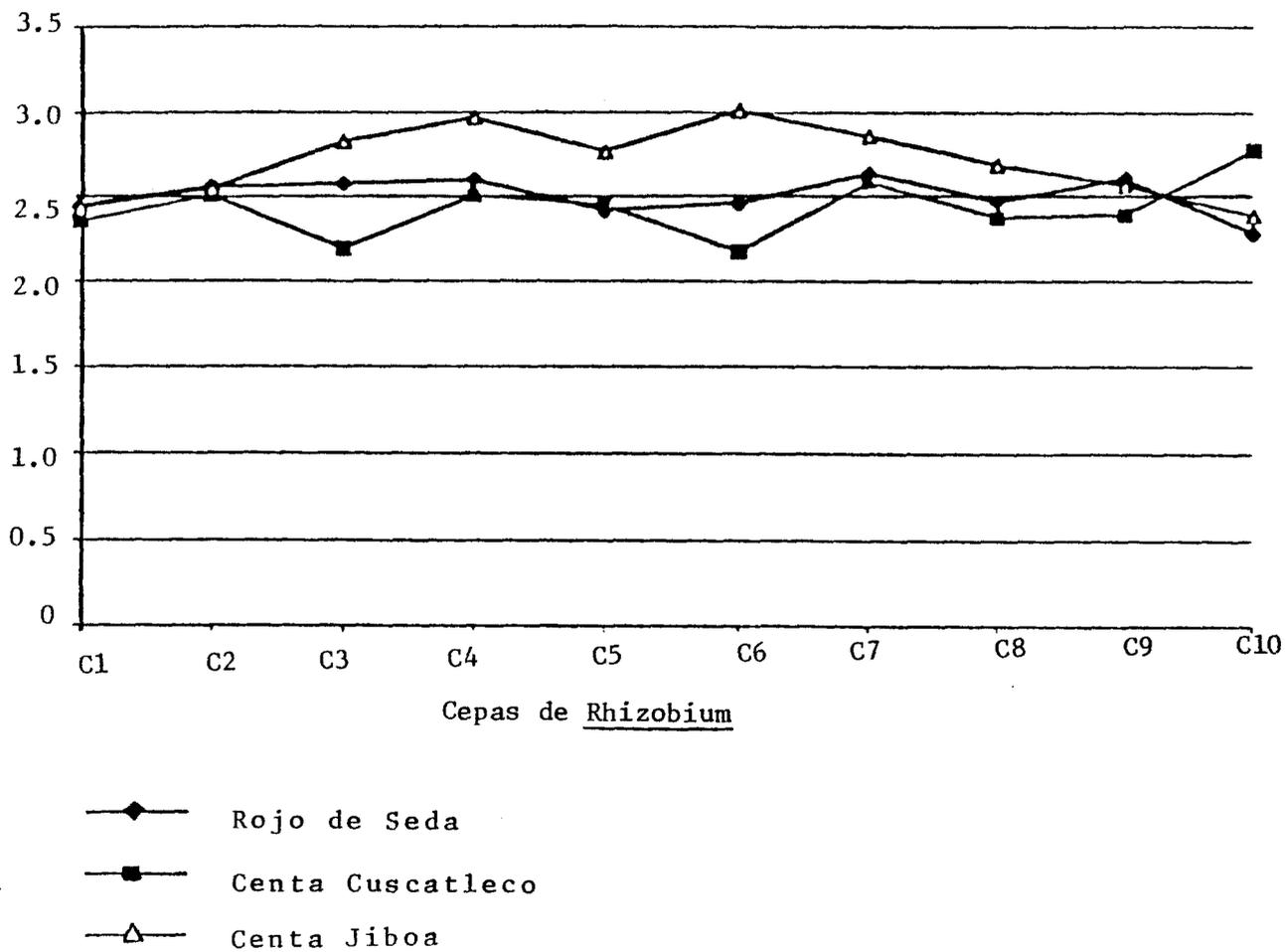


Fig. 13. Contenido de nitrógeno para 10 diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* inoculadas en tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

Cuadro 9. Evaluación de las cepas aisladas en base a su rendimiento en porcentaje de nitrógeno, marcados de mayor a menor. Fac. CC.AA., UES. 1995 .

NUMERO	MEDIA	CEPA	VARIEDAD
1	3.02	6	C. Jiboa
2	2.97	4	C. Jiboa
3	2.86	7	C. Jiboa
4	2.83	3	C. Jiboa
5	2.78	10	C. Cuzcatleco
6	2.77	5	C. Jiboa
7	2.69	8	C. Jiboa
8	2.63	7	Rojo de Seda
9	2.61	9	Rojo de Seda
10	2.60	4	Rojo de Seda
11	2.59	7	C. Cuzcatleco
12	2.58	3	Rojo de Seda
13	2.51	9	C. Jiboa
14	2.56	2	Rojo de Seda
15	2.52	4	C. Cuzcatleco
16	2.51	2	C. Cuzcatleco
17	2.49	2	C. Jiboa
18	2.47	8	Rojo de Seda
19	2.46	6	Rojo de Seda
20	2.45	5	C. Cuzcatleco
21	2.44	1	Rojo de Seda
22	2.43	1	C. Jiboa
23	2.42	5	Rojo de Seda
24	2.39	9	C. Cuzcatleco
25	2.38	10	C. Jiboa
26	2.37	8	C. Cuzcatleco
27	2.36	1	C. Cuzcatleco
28	2.28	10	Rojo de Seda
29	2.19	3	C. Cuzcatleco
30	2.17	6	C. Cuzcatleco

X = C. Jiboa = 2.70
X = C. Cuzcatleco = 2.43
X = Rojo de Seda = 2.50

riedades de frijol Rojo de Seda en un 2.28% y Centa Jiboa en un 2.38%, considerando que este resultado se debe a que el frijol Centa Cuzcatleco al igual que la cepa CIAT 613, son variedades que se han importado; con el objetivo de mejorar los rendimientos de grano en el país. También la cepa CIAT 613 está recomendada para climas fríos tal como lo reporta CIAT en su manual de métodos para evaluar la simbiosis leguminosa-Rhizobio, 1987. Aunque QUINTANILLA, et al, en 1993 la evaluaron en el campo obteniendo un resultado promedio en cuanto a porcentaje de nitrógeno de 2.62 que es un resultado similar en un 94% al obtenido en este ensayo. Además, las cepas que mejor interactúan con las tres variedades de frijol fueron las cepas 3, 4, 6, y 7, habiendo tenido los promedios en contenido de nitrógeno más altas tal como se observa en el Cuadro 10 y la Figura 14.

Cuadro 10. Rendimiento promedio en porcentaje de nitrógeno de tres variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) inoculadas con diez cepas de Rhizobium guminosarum bv Phaseoli). Fac. CC.AA., UES. 1995.

VARIEDAD	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
CENTA CUZCATLECO	2.26	2.51	2.32	2.51	2.45	2.17	2.59	2.37	2.39
ROJO DE SEDA	2.45	2.56	2.58	2.60	2.42	2.46	2.64	2.47	2.61
CENTA JIBOA	2.41	2.55	2.83	2.97	2.77	3.01	2.86	2.69	2.57
PROMEDIO	2.41	2.54	2.58	2.69	2.54	2.55	2.69	2.51	2.52

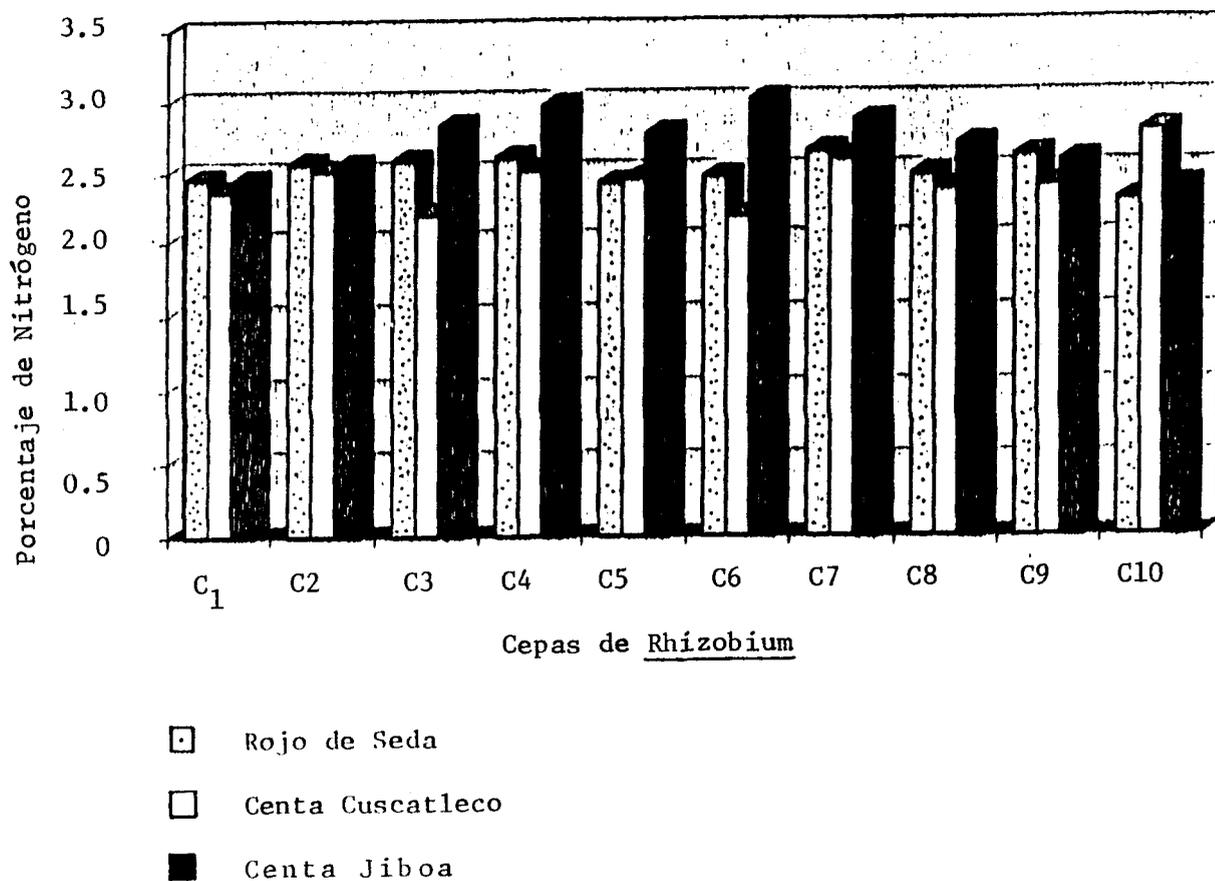


Fig. 14. Contenido de nitrógeno para 10 diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* inoculadas en tres variedades de frijol común - (*Phaseolus vulgaris*).

6. CONCLUSIONES

- Los suelos de la Cuenca del Lago de Ilopango en El Salvador, son ricos en cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli, condición que puede ser aprovechada para implementar el desarrollo de la Rhizobiología en el país.

- Al aislar e identificar cepas nativas de Rhizobium y evaluarlas bajo condiciones propias tales como: clima, suelo y variedades de frijol, se puede llegar a obtener interacciones variedad-cepa que resulten eficientes en la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

- En el presente ensayo, la variedad de frijol Centa Jiboa fue la mejor, ya que en seis de los tratamientos presentó un mayor porcentaje de nitrógeno con respecto a las otras dos variedades de frijol que fueron: Rojo de Seda y Centa Cuzcatleco.

7. RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo sería recomendable efectuar una evaluación a nivel de campo con algunas de las cepas utilizadas en esta investigación y haciendo uso de estas variedades de frijol, ya que estas tres cepas quedan en el banco de Rhizobiología del Departamento de Agronomía de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras.

- Involucrar y apoyar a más personas en la búsqueda de cepas de Rhizobium con mejores características de eficiencia que conlleven al desarrollo y aplicación de esta ciencia en nuestro país, ya que a nivel latinoamericano es uno de los pocos lugares donde no se practica la inoculación de Rhizobium.

- Efectuar este estudio en otros cultivos, ya sean éstos leguminosas para forraje o de consumo humano, tales como soya, alverja u otros cultivos de importancia agrícola como lo son los abonos verdes.

8. BIBLIOGRAFIA

1. AGRIOS, G.N. 1988. Fitopatología. Trad. por Manuel Guzmán Ortiz. Madrid, España. P. 547-548.
2. BEJERSEN, F.J. 1973. Factores Controlling nitrogen fixation by Rhizobia. Cambella, Australia. CSIRO. P. 153-161.
3. BERNARD, B. 1978. La simbiosis bacterias-leguminosas. Colombia, Asociación Vida Sana para el Fomento de la Cultura y el Desarrollo Biológico. 16 P.
4. CALDERON, V.R. 1995. Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno y rendimiento de grano en el vivero ECAR-95 grano rojo. In. XLII Reunión Anual PCCMCA. San Salvador, El Salvador. P. 48.
5. CARPENTER, P.L. 1969. Microbiología. Trad. por José Rafael Blengio. Cali, (Col.). P. 1-7.
6. CASTAÑO ZAPATA, I, L DEL RIO. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica, 3 ed. El Zamorano, Honduras: Zamorano Academia. P.S.
7. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1979. Una nueva corta para el futuro del frijol. Hojas de Frijol para América Latina. Cali (Col.). P. 71-74.
8. _____. 1980. Informe anual de programación de frijol. Cali (Col.). P. 71-74.

9. _____. 1980. Informe anual de frijol. Cali (Col.).
P. 71-78.
10. _____. 1987. Simbiosis leguminosa-Rhizobium, evalua
ción, selección y manejo; guía de estudio para ser -
usada como complemento de la unidad audiovisual sobre
el mismo tema. Contenido científico; Rosemary, Sil-
vester-Bradley; Judith A. Kipe Nolt; David J. Harris.
Producción Carlos A. Valencia. Cali (Col.). CIAT.
P. 8-10.
11. _____. 1987. Simbiosis leguminosa-Rizobio. Manual
de métodos de evaluación, selección y manejo. Pro-
yecto CIAT-UNDO de evaluación, selección y manejo de
simbiosis leguminosa-Rizobio para aumentar la fija-
ción de nitrógeno. Sección de Microbiología de Sue-
los del Programa de Pastos Tropicales y Sección de
Microbiología de Suelos del Programa de Frijol --
(Comps.). Cali, Colombia. 178 P.
12. DAVIS, B.D. 1977. Tratado de microbiología. Barcelona,
España. Limusa. P. 52-57.
13. DIMAS VELASQUEZ, H.R.; FLORES CHORRO, J.A.; MENJIVAR RO-
SA, R.A. 1994. Reconocimiento de dípteros Dolicho-
podidos presentes en la Cuenca del Lago de Ilopango y
estudio de su comportamiento sobre mosca blanca (Be-
misia tabaci). Tesis, Universidad de El Salvador.
P. 32-34.

14. MEJIA MEJIA, M.A.; NUILA DE MEJIA, J.A. 1990. Manual de diseños experimentales, con aplicación a la agricultura y ganadería. San Salvador, El Salvador. Mimeo. P. 37-45, 87, 187-204.
15. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 1990. Centro de Recursos Naturales. Servicio de Ordenación de Cuenca Hidrográficas. Subcuenca del Lago de Ilopango. San Salvador, El Salvador. s.n.
16. OCAMPO, G.I. 1979. Influencia del método de la inoculación sobre supervivencia de R. phaseoli en contacto con Brasicol. Cali (Col.) P. 15.
17. PANAMEÑO PERDOMO, I. DEL C. 1987. Aislamiento de una cepa nativa de Rhizobium japonicum en soya (Glycine max) a nivel de invernadero y su efecto en la fijación de nitrógeno. Tesis Ing. Agr. San Salvador El Salvador, Universidad de El Salvador. P. 6-7.
18. PARSON, D.B. 1982. Manual para educación agropecuaria frijol y chícharo. Area de Producción Vegetal. México. Trillas. P. 24.
19. PINEDA, P. 1987. Identificación y evaluación de cepas nativas de Rhizobium phaseoli. In. Reunión de Fitopatología APS y Reunión de Fijación Biológica de Nitrógeno. FBN. (27, 1. 1987, Guatemala, Gua.). - Memoria. Universidad de San Carlos, Instituto de -- Ciencias y Tecnología Agrícola. P. 34.

20. QUINTANILLA, R.; TEREZON, J.; ZAVALA, F. 1993. Evaluación y selección de cepas introducidas de Rhizobium phaseoli) sobre el rendimiento del frijol (Phaseolus vulgaris). In. Informe de resultados de investigación de 1993. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. San Andrés, La Libertad, El Salvador. P. 30-33.
21. REPUBLICA FEDERAL DE ALEMANIA. 1978. Valoración de los diferentes sistemas de fijación de nitrógeno. BASF Reportes Agrícolas. 2/83. P. 15-17.
22. RIVAS FLORES, A.W.; BARRIENTOS RIVAS, C.A.; HERNANDEZ - MONTENEGRO, C.A.; SAZ VARGAS, N.E. 1990. Recolección, aislamiento e identificación de cepas nativas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli. Tesis Ing. Agr. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. P. 26.
23. SALLE, A.J. 1965. Bacteriología. Trad. por Ignacio Rodrigo García. 2 ed. Barcelona, España. Gustavo Gili. P. 698-700.
24. SCOOT, W.O.; ALDRICH, S.R. 1975. Producción moderna de la soya. Trad. por Andrés O. Boltaro, México. Hemisferio Sur. P. 82.

25. TEREZON, J.; QUINTANILLA, R.; ZAVALA, F. 1993. Incremento de la productividad de frijol (Phaseolus vulgaris) a nivel de finca mediante la inoculación con Rhizobium leguminosarum bv Phaseoli. In. Informe de resultados de investigación de 1993. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. San Andrés, La Libertad, El Salvador. P. 24-36.
26. TISDALE, S.L. 1965. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. México, Unión Tipográfica. P. 138-143.
27. TAPIA BARQUERO, H.; CAMACHO HENRIQUEZ, A. 1988. Manejo integrado de la producción de frijol en labranza cero. Managua, Nicaragua. GTZ. P. 50-52.
28. ZEPEDA, G. 1971. Especificidad del Rhizobium phaseoli en tres variedades de frijol. In. Reunión Anual - del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. (17, 1971, Guatemala, Gua.). Memoria. PCCMCA. P. 23-28.

9. A N E X O S

A-1. Hojas de información de recolección de nódulos*

1. Datos generales

- 1.1. Fecha de recolección : 9 de octubre de 1993
- 1.2. Localización : País : El Salvador. Provincia o -
Depto. Cuscatlán. Ciudad : Cojutepeque. Hacienda :
Cantón Cujuapa.
- 1.3. Características climáticas :
Precipitación 1830 mm. Temperatura media: 21.7 °C
Altitud : 720 msnm. Patrón de lluvia : Regular
- 1.4. Nombre del recolector : Tesis Rhizobium
- 1.5. Dirección del recolector : Facultad de Ciencias --
Agronómicas, Universidad de El Salvador.
- 1.6. Nombre de la planta: N. científico : Phaseolus vul-
garis. N. Común : Frijol común Sangre de Toro.

2. Sitio de recolección :

- 2.1. Lote de ensayo: Ensayo de inoculación
Otro ensayo
- 2.2. Lote cultivado : Monocultivo Intercambio
con
- 2.3. Edad cultivo : 40 días Historial del lote : Ex-
clusivo para frijol.
- 2.4. Pradera : Con leguminosas introducidas
Con leguminosas nativas
- 2.5. Sabana nativa: Sabana bien drenada Saba-
na mal drenada Sabana abierta Sabana -
con arbustos Sabana con árboles
- 2.6. Bosque : Bosque estacional Bosque llu-
vioso
- 2.7. Area inundada
- 2.8. Al lado de la carretera
- 2.9. Información adicional : Terreno muy accidenta-
do con pendiente aproximada de 75%.

Continuación A-1.

3. Propiedades del suelo.

- 3.1. pH estimado : _____ Medido 5.9
3.2. Contenido de humedad : Estimado 65 % Medido _____
3.3. Textura : Franco Arenoso
3.4. Fertilidad natural : Alta _____ Media X Baja _____
3.5. Fertilizantes aplicados : 16-20-0 Dosis 1.5 qq/ha
Bayfolán Dosis : 1 litro/ha.

4. Características de la planta y de la nodulación.

- 4.1 Planta : Sin inocular X Inoculada _____ Ceba (Código) _____
Más vigorosas que las plantas vecinas: Sí X No _____
Si dispone de semillas para los ensayos : SI _____
NO _____
- 4.2. Nódulos: Provenientes de la misma planta : X
Provenientes de dos o más plantas : X
Abundancia: Alta X Media _____ Baja _____
Características : Tamaño 5 mm, color interno : Ro-
sado. Forma redondos. Distribución : raíz princi-
pal y secundaria.
- 4.3. Otras observaciones : _____

* : Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y -
manejo de la simbiosis leguminosa Rhizobio. CIAT, 1987.

A-2. Preparación del medio Levadura Manitol-Agar (LMA)*

Manitol	10.0	gr
Extracto de levadura	0.5	gr
K_2HPO_4	0.5	gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	gr
NaCl	0.2	gr
$FeCl \cdot 6H_2O$	0.01	gr
Agar en medio neutro	15.0	gr
Rojo Congo	10.0	ml
Agua destilada aforada	1000.0	ml

Preparación : Se hierve 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 a 1 ml. de NaOH 0.5N estéril.

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa Rizobio. CIAT, 1987.

A-3. Preparación del medio de Sadman*

1. Soluciones de reserva ('stock):

A. Solución de hierro	: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	gr
	Acido cítrico	5.0	gr
	Agua destilada	1000.0	ml

B. Solución de micronutrientes

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.157	gr
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.44	gr
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.076	gr
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02	gr
H_3BO_3	1000.00	ml

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

KCl	0.149	gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.493	gr
K_2HPO_4	0.348	gr
Solución de hierro	0.5	ml
Solución de micronutrientes	0.5	ml

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa Rhizobio. CIAT, 1987.

A-4. Preparación de la solución de calcio*

KNO ₃	0.2	gr
CaSO ₄	2.5	gr
Agua destilada	1000	ml

A cada Jarra de Leonard se agregan 200 ml de esta solución a la arena antes de sembrar.

A-5. Categorías utilizadas para la evaluación de la nodulación en Jarras de Leonard*

100	Muy abundante
50-100	Abundante
10- 50	Mediana
1- 10	Poca
0	No hay

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa Rhizobio. CIAT, 1987.

A-6. Coloración de Gram*

Reactivos :

A. Solución Cristal Violeta

Cristal Violeta	10 gr
Oxalato de amonio	4 gr
Etanol	100 ml
Agua destilada	400 ml

B. Solución de yodo

Yodo	1 gr
Yoduro de potasio	2 gr
Etanol	25 gr
Agua destilada	100 ml

C. Alcohol (yodado)

Solución de yodo (B)	5 ml
Etanol	95 ml

D. Colorante de contraste

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

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa Rhizobio. CIAT, 1987.

A-7. Medio de ketolactasa*

COMPONENTES	VOLUMEN
Agar	15.0 gr
Lactosa	10.0 gr
Extracto de levadura	0.5 gr
Solución A	10.0 ml
Solución B	10.0 ml
Solución C	10.0 ml
Solución D	1.0 ml
Solución Rojo Congo	10.0 ml
Agua destilada	960.0 ml

A-8. Reactivo de Benedict*

COMPONENTES	CANTIDAD
<u>SOLUCION "A"</u>	
Citrato de sodio	7.3 gr
Carbonato de sodio	10.0 gr
Agua destilada	60.0 ml
<u>SOLUCION "B"</u>	
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	1.73 gr
Agua destilada	10.0 gr

Estas dos soluciones se guardan separadamente y se mezclan al momento de usarlas. El volumen de la mezcla se completa a 100 ml con agua destilada.

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa Rhizobio. CIAT, 1987.

A-9. Unidad experimental*

J = Variedad Jiboa

C = Variedad CENTA Cuzcatleco

S = Variedad Rojo de Seda

TES = Testigo

T #

J C S

R# 1-2-3

No. de Cepa
o tratamien-
to

No. de cepa
o tratamiento

Variedad de
frijol

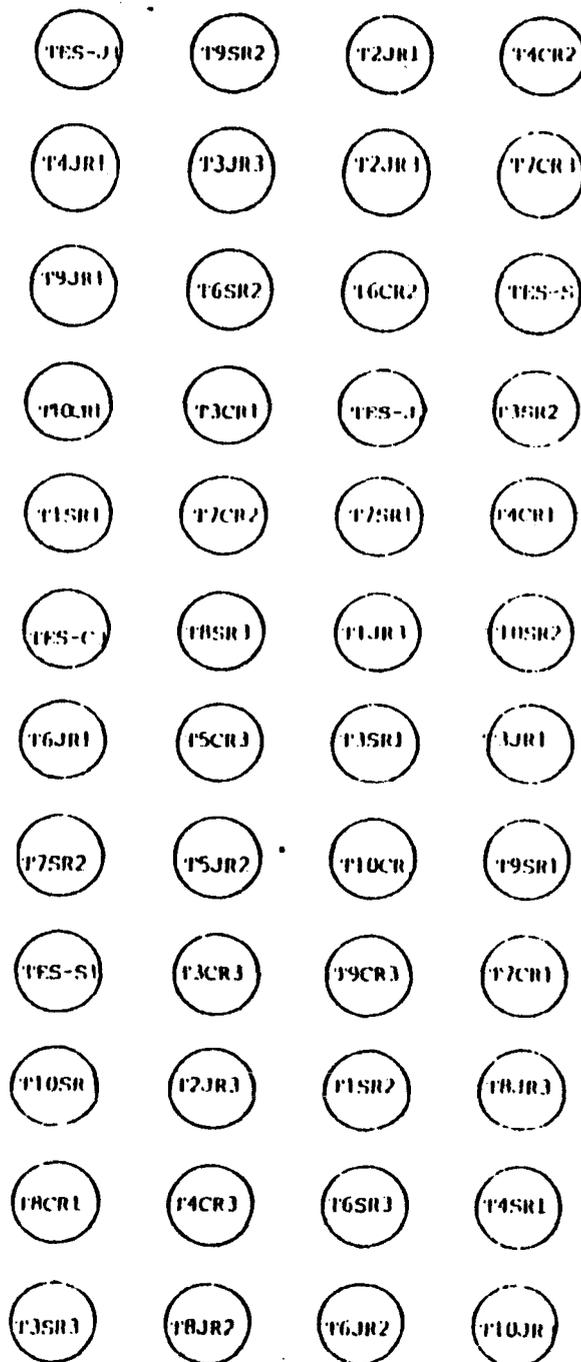
No. de Repetición

* Tomado del manual de diseños experimentales con aplicación a la agricultura y ganadería. MEJIA MEJIA, 1990.

A-10. Cepas de Rhizobium leguminosarum biovar Phaseoli, seleccionadas en la prueba de nodulación en Jarras de Leonard para evaluar su efectividad a nivel de maceta invernadero y su respectiva reasignación de números de cepa y número de tratamiento. Fac. CC.AA. UES, - 1993.

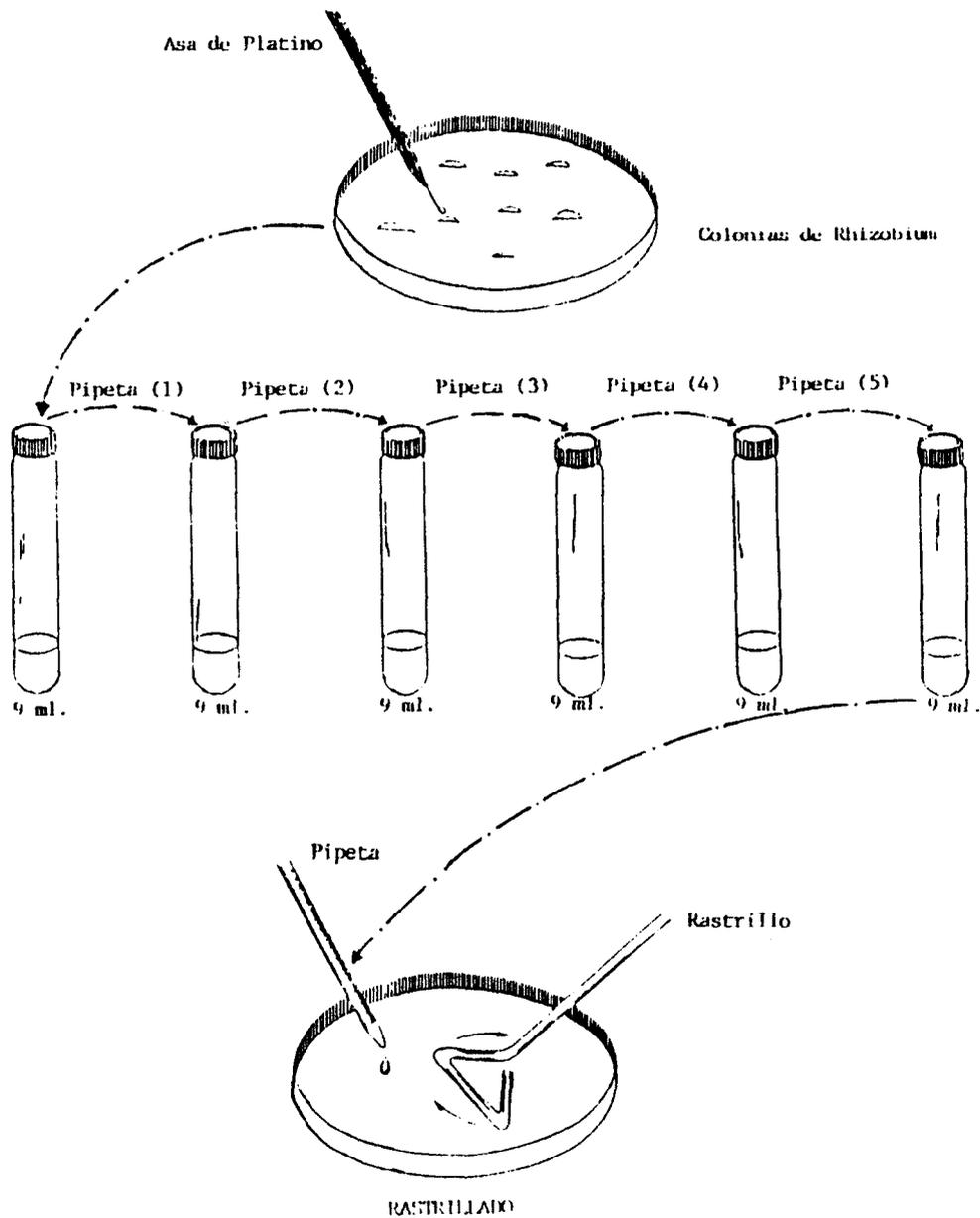
CEPA	No. ASIGNADO	TRATAMIENTO
14	1	1
25	2	2
34	3	3
39	4	4
17	5	5
40	6	6
15	7	7
19	8	8
1	9	9
CIAT 613	10	10

Anexo 11. Distribución de los tratamientos para evaluación en invernadero de diez cepas de Rhizobium leguminosarum inoculadas con tres variedades de frijol común Phaseolus vulgaris, en el invernadero de la Fac. CC.AA., UES. 1993.



Continuación Anexo 11.

F43R2	F7JR1	F9CR1	F5SR1
F10JR1	FES-B	F8SR1	FES-C2
FES-C1	F2CR1	F5CR2	F5JR1
F6CR1	F7SRJ	FES-J	F7JR1
F0JR1	F9JR2	F2CR2	F4JR2
F10JR2	F9SR1	F1SR2	F4CR2
F1JR1	F1CR1	F5SR1	F6JR1
F2SR1	F8CR2	F2JR2	F5JR1
F3JR2	F5CR1	F4SR1	F10CR2
F5SR2	F4JR1	F1JR2	F1CR1
F1CR2	F6CR1	F8CR1	F2SR2
F8SR2	F9CR2	F10SR1	F9JR1
F7JR2	F6SR1		F2CR1



A-12 Esquema de la forma en que se hacen las diluciones para aislar los Rhizobios.*

* Tomado del manual de métodos, evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa rizobio. CIAT, 1987.