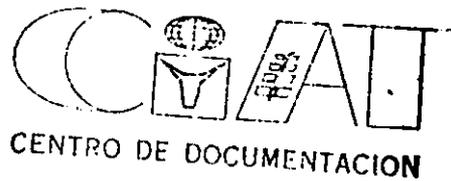


37655
Español



Simbiosis Leguminosa-Rizobio

Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico

Recopilado por:

Sección de Microbiología de Suelos,
Programa de Pastos Tropicales
Sección de Microbiología de Suelos,
Programa de Frijol



Proyecto especial CIAT-UNDP de evaluación,
selección y manejo de la simbiosis leguminosa-
rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno.



PED. EXTURK R.
Centro Internacional de Agricultura Tropical

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Apartado 6713
Cali, Colombia

Tiraje: 250 ejs. español; 150 ejs. inglés.

Impreso en Colombia

Primera edición: agosto 1987

Abril 1988

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales y Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (comps.). Cali, Colombia. (Varias paginaciones; 178 p.).

1. Leguminosas -- Inoculación. 2. Rizobios. 3. Nitrógeno. -- Fijación. 4. Microorganismos fijadores de nitrógeno. 5. Leguminosas forrajeras. 6. Frijol. I. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Contenido

Capítulo	Página
Reconocimientos	v
Introducción	1
1 La evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio	1-1
2 Recolección de nódulos para el aislamiento de rizobios	2-1
3 Aislamiento de los rizobios de los nódulos	3-1
4 Almacenamiento y reconstitución de cepas de rizobios	4-1
5 Caracterización de los rizobios	5-1
6 Pruebas de pureza para los cultivos de rizobios	6-1
7 Pruebas de inmunodifusión para diferenciar cepas	7-1
8 Características adicionales de las cepas de rizobios	8-1
9 Métodos de infección de plantas estériles en tubos, en bolsas de crecimiento, y en jarras Leonard	9-1
10 Recuento de rizobios en plantas estériles por el método del Número Más Probable (NMP)	10-1
11 Recuento de rizobios viables en cajas Petri	11-1

Capítulo	Página
12 Preparación de pequeñas cantidades de inoculantes a partir de cultivos puros de rizobios en medio LMA	12-1
13 Evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio en cilindros con suelo sin perturbar (Etapas 1 y 2)	13-1
14 Evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio en macetas (Etapas 1 y 2)	14-1
15 Evaluación de la simbiosis leguminosa forrajera-rizobio en el campo (Etapas 1 y 2)	15-1
16 Evaluación de la simbiosis frijol-rizobio en el campo (Etapas 1 y 2)	16-1
17 Métodos para evaluar la nodulación	17-1
18 Métodos para la determinación del nitrógeno	18-1
19 Instrucciones para los ensayos con tratamientos de inoculación (Etapa 2)	19-1
20 Efecto de los factores de manejo sobre la simbiosis (Etapa 3)	20-1
APENDICES	
A Construcción de una cámara estéril (según diseño de NIFTAL)	A-1
B Método de la reducción de acetileno	A-5
C Cepas recomendadas	A-11
Referencias	Rf.-1

Reconocimientos

La publicación del presente manual de métodos se realizó con el apoyo financiero del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), a través de la División de Proyectos Globales e interregionales (Proyecto GLO/004/84).

El manual fue elaborado por Judy Kipe-Nolt, jefe de la sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol, y Rosemary Sylvester-Bradley, jefe de la sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales, con la colaboración de las siguientes personas: David J. Harris, Fabiola Campuzano de Ramírez, Dacier Mosquera P., Gloria Isabel Ocampo, Pedro A. Zapata, Lucía Mejía de Mayor y Javier Mesa, vinculadas a las secciones de Microbiología de Suelos antes mencionadas. Muchas otras personas que leyeron la primera edición de este manual han contribuido con útiles sugerencias a esta nueva versión, para que sea más completa y comprensible. Carlos A. Valencia, de la Unidad de Comunicaciones e Información, organizó, revisó y editó en parte el manuscrito original.

Introducción

El propósito de este manual es describir los métodos disponibles para hacer estudios de la simbiosis leguminosa-rizobio (denominada en adelante la simbiosis) aplicados a la agricultura tropical y, dentro de ella, enfocados hacia las leguminosas forrajeras tropicales y el frijol común. Se ha puesto énfasis en los estudios aplicados, y no se pretende cubrir todos los métodos actualmente disponibles para el estudio de la rizobiología y la fijación de nitrógeno. Varios libros se han escrito sobre las diferentes metodologías, y aquellas personas que requieran información adicional pueden consultarlos (Bergersen, 1980; Vincent, 1975; IAEA, 1983; FAO, 1985; Somasegaran y Hoben, 1985). Consideramos que el presente manual complementa otras publicaciones disponibles, ya que enfatiza los aspectos agronómicos de la evaluación de la simbiosis.

Este Manual tiene, a su vez, un complemento en la unidad audiotutorial producida por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), titulada La Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, Selección y Manejo, en la cual se describen aspectos básicos de las características más importantes de la simbiosis y se introducen los conceptos necesarios para el uso de los diferentes métodos aquí recopilados en detalle. Los objetivos y etapas de investigación que se adopten en un programa de selección de leguminosas deben definirse en la colaboración estrecha entre el microbiólogo y las personas responsables de realizar la evaluación agronómica. El objetivo final de ésta será, en cualquier caso, seleccionar combinaciones leguminosa-rizobio con alta capacidad de fijación de nitrógeno, bajo las condiciones locales.

En el primer capítulo del manual se resumen algunos de los conceptos presentados en la unidad audiotutorial. Se describe también allí la relación entre las partes que componen el manual y las etapas de la evaluación. Se presentan, además, ejemplos en que las estrategias de selección se aplican a las leguminosas forrajeras y al frijol, los dos grupos de leguminosas que se evalúan actualmente en los programas internacionales del CIAT.

Los Capítulos 2 a 20 contienen la descripción de los métodos propiamente dicha, y además tres apéndices. En el primer apéndice se enseña la construcción de una cámara estéril sencilla y económica, diseñada por el proyecto NIFTAL, para hacer trabajos de laboratorio; en el segundo se describe el método de la reducción de acetileno, que se utiliza en casos especiales para hacer estimaciones relativas de la actividad de la nitrogenasa; el tercero consta de varios listados de cepas recomendadas para inocular las leguminosas forrajeras y el frijol en diferentes ecosistemas. Estos listados se actualizarán periódicamente; las personas que deseen adquirir las versiones más recientes deben ponerse en contacto con el CIAT.

Al manual se incorporarán nuevos apéndices o se añadirá información adicional a medida que esté disponible. Solicitamos, por ello, la colaboración de los investigadores y de quienes utilicen esta publicación, que se mantendrá actualizada gracias a la información útil recibida de ellos.

La evaluación agronómica de la simbiosis es un complemento de la evaluación del germoplasma de leguminosas respecto a otros atributos deseables --rendimiento, calidad nutricional, producción de semilla, resistencia a enfermedades y plagas, y otros-- porque se pretende seleccionar genotipos que presenten la mejor combinación de todos los atributos.

En este capítulo se presentan ejemplos del enfoque dado a este tipo de evaluación, considerado --como se explicó-- dentro de un programa general de selección de leguminosas.

1.1 Objetivo, tratamientos y parámetros de la evaluación agronómica de la simbiosis

El objetivo de la evaluación agronómica de la simbiosis es seleccionar germoplasma de leguminosas con un potencial máximo de fijación de nitrógeno, bajo las condiciones de la localidad en que se realiza la evaluación.

Para alcanzar este objetivo, no es necesario inocular siempre las leguminosas seleccionadas, ya que en algunos casos éstas pueden establecer una simbiosis efectiva con las cepas nativas del suelo. En los demás casos, es necesario seleccionar tanto las leguminosas como las cepas de rizobios para lograr una combinación efectiva de los dos simbioses.

Tratamientos apropiados se eligen para caracterizar las leguminosas según la efectividad de la simbiosis que establecen con las cepas de rizobios, bien sea nativas o inoculadas. Aquí se consideran tres tratamientos principales (Cuadro 1.1). Se eligen diferentes combinaciones de estos tratamientos para evaluar la efectividad de la simbiosis, dependiendo de la etapa de selección en que se encuentran las leguminosas.

Los parámetros que se evalúan son el rendimiento de nitrógeno y la nodulación. En el tratamiento fertilizado con nitrógeno sólo se evalúa el rendimiento, ya que la nodulación se inhibe por la presencia de altos niveles de nitrógeno mineral en el suelo.

Cuadro 1.1 Tratamientos empleados en la evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio, y parámetros evaluados con ellos.

No.	Tratamiento		Símbolo o código ^a	Parámetros que evalúa
	Nivel de disponibilidad de nitrógeno	Aplicación de inoculante		
1	<u>Bajo</u>	No	-N o -I	Rendimiento de N; nodulación
2	<u>Bajo</u>	Sí	+I o R ₁ , R ₂ , R ₃	Rendimiento de N; nodulación
3	<u>Alto</u>	No	+N	Rendimiento de N

a. Ver página 1-7.

La evaluación de los tratamientos en diferentes combinaciones de germoplasma-suelo permite caracterizar agronómicamente los siguientes aspectos de la simbiosis: 1) efectividad relativa de las cepas nativas; 2) rendimiento potencial de las leguminosas cuando no tienen limitaciones en el suministro de nitrógeno; 3) efecto de los inoculantes sobre el rendimiento; 4) necesidad del mejoramiento genético para aumentar la capacidad de fijación de nitrógeno; y 5) efecto de otros factores de manejo agronómico sobre la simbiosis.

1.2 Etapas de la evaluación de la simbiosis y su relación con este manual

Para comprender con claridad la relación entre los métodos descritos en este manual y las diferentes etapas de la evaluación de la simbiosis, considérese la Figura 1.1; en ella, el flujo de la investigación, que recorre las etapas de la evaluación, dependerá, en cualquier caso, de las necesidades y condiciones específicas de cada programa de selección.

Los métodos que se describen en los Capítulos 2 a 12 incluyen los procedimientos necesarios para el manejo de los rizobios en el laboratorio, tales como el aislamiento, la caracterización y la conservación de cepas de rizobios, la producción de inoculantes, y el control de calidad de los mismos; estos métodos corresponden a la Etapa 1_R del diagrama y pertenecen al campo de la microbiología.

En los Capítulos 13 a 18 se describen los métodos que se emplean para evaluar agrónomicamente la simbiosis sin usar inoculantes (ensayos para determinar la necesidad de inocular) incluyendo los métodos para establecer en el invernadero y en el campo tratamientos con baja y alta disponibilidad de nitrógeno mineral. Se describe además en ellos la forma de hacer evaluaciones de la nodulación y del rendimiento de nitrógeno, que corresponde a la Etapa 1_L. El Capítulo 19 contiene los métodos y precauciones necesarios para utilizar, y evaluar, los inoculantes en el invernadero y en el campo; estos métodos corresponden a la Etapa 2 del diagrama de flujo de la investigación (necesidad de seleccionar cepas, selección de cepas). Los procedimientos agrónómicos y los parámetros de evaluación que se utilizan en la Etapa 2 son los mismos de la Etapa 1_L.

Por último, en el Capítulo 20, que corresponde a la Etapa 3, se describen algunos tratamientos adicionales que, una vez seleccionadas en la Etapa 1_L o en la Etapa 2 las combinaciones leguminosa-rizobio más promisorias, se pueden aplicar con el fin de

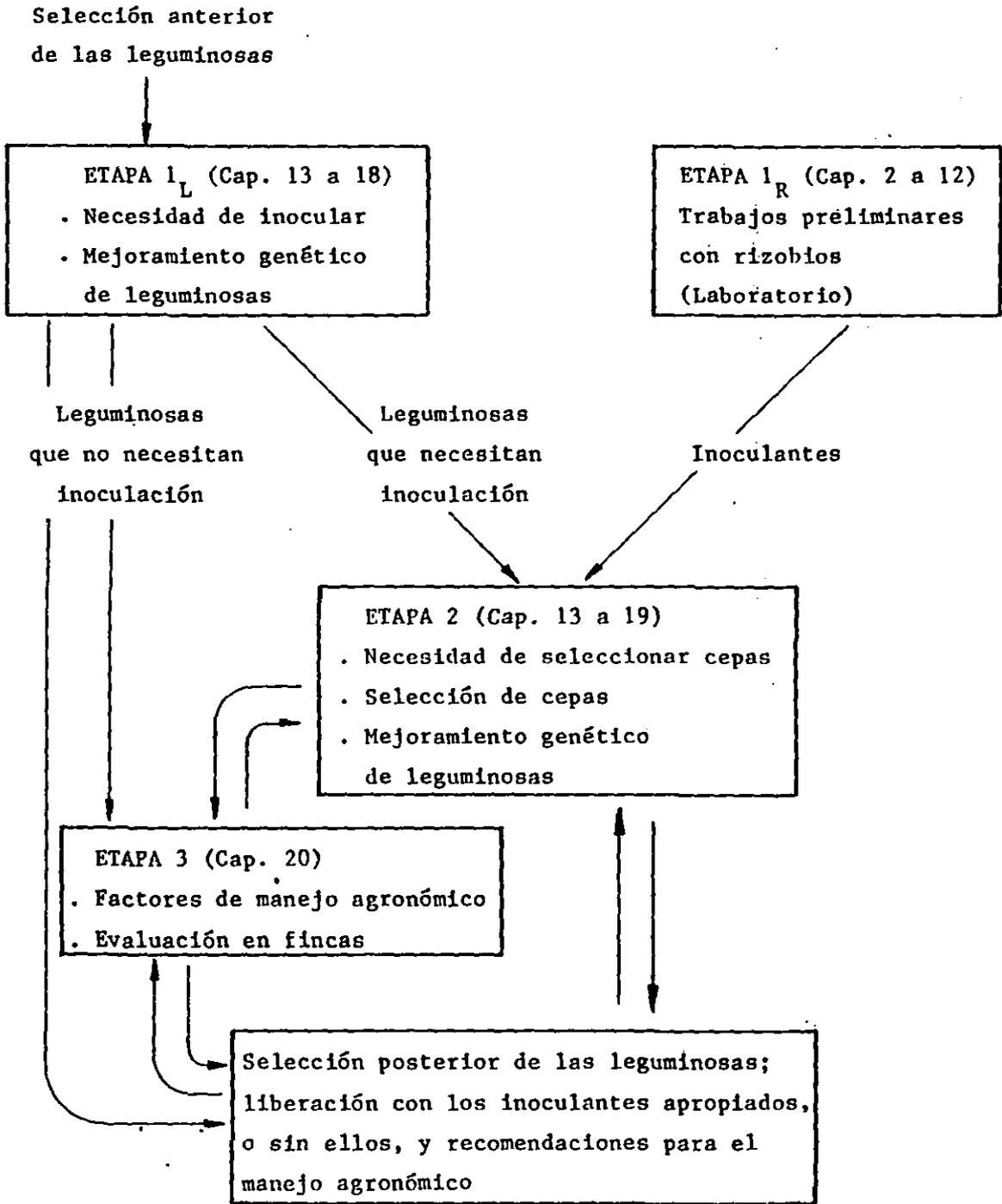


Figura 1.1. Diagrama de flujo del germoplasma a través de las etapas de investigación en que se caracteriza la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno.

evaluar la interacción entre los factores de manejo agronómico y las combinaciones seleccionadas. Estos ensayos se realizan paralelamente a las selecciones posteriores para estudiar los posibles problemas de adaptación de la tecnología a las condiciones de los agricultores.

Es importante precisar la terminología que se utiliza en el manual para describir los tratamientos recomendados en las diferentes etapas. En los ensayos que se hacen en la Etapa 1, para cada suelo se aplican dos tratamientos por leguminosa, ya que el objetivo es evaluar la efectividad de las cepas nativas de rizobios en un tratamiento donde la disponibilidad de nitrógeno mineral es baja comparándolo con otro donde esa disponibilidad es alta. En estos ensayos, los dos tratamientos se denominan 'sin nitrógeno' (-N) y 'con nitrógeno' o 'alto nitrógeno' (+N), respectivamente.

En los ensayos de la Etapa 2 y de la Etapa 3 se aplican estos mismos tratamientos y se añaden además tratamientos con inoculantes. En este caso, los tratamientos no inoculados, con baja y alta disponibilidad de nitrógeno mineral, se emplean como testigos y se denominan 'sin inocular' (-I) y 'con nitrógeno' (+N). Los tratamientos inoculados se denominan 'inoculado' (+I), si se utiliza solamente una cepa. Si se están comparando varias cepas de rizobios --por ejemplo, en los ensayos de selección de cepas-- se utiliza el número de la cepa, o los símbolos R_1 , R_2 , R_3 , etc., para identificar cada tratamiento. Lógicamente, estos tratamientos se establecen en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno mineral.

Para obtener información más detallada sobre las etapas de evaluación de la simbiosis y sus objetivos, el lector puede consultar la guía de estudio de la unidad audiotutorial del CIAT sobre este tema.

1.3 Ejemplos del empleo de las etapas de evaluación de la simbiosis en la selección de leguminosas forrajeras tropicales y de frijol común

La efectividad de la simbiosis leguminosa-rizobio es un componente importante del rendimiento de leguminosas. Así pues, es necesario integrar la selección de combinaciones leguminosa-rizobio más efectivas, bien sea con cepas inoculadas o nativas, en los programas de evaluación de leguminosas que utilizan el rendimiento como un parámetro de selección.

Los pasos del flujo del germoplasma en un programa general de selección de leguminosas pueden tener una relación diferente con las etapas de evaluación de la simbiosis ilustradas en la Figura 1.1.

No se debe utilizar el rendimiento como parámetro en la selección de leguminosas antes de hacer la Etapa 1_L. Idealmente, las primeras evaluaciones del rendimiento serían equivalentes a la Etapa 1_L. Sin embargo, en algunos casos no es posible seguir esta ruta por el alto número de entradas que se ensayan en las primeras evaluaciones del rendimiento. En estos casos, los ensayos para la evaluación de la simbiosis se realizan en forma paralela a los del rendimiento y de otros parámetros; se fertilizan los ensayos de rendimiento con N, o se inoculan con la mejor cepa disponible, aunque hay desventajas en utilizar un solo tratamiento cuando se está evaluando el rendimiento.

1.3.1 Selección de leguminosas forrajeras tropicales

En la RIEPT (Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales), coordinada por el CIAT, se emplea una metodología para evaluar las leguminosas forrajeras tropicales que tiene cuatro pasos en el flujo del germoplasma: ensayos regionales A, B, C y D (Cuadro 1.2).

Se recomienda no aplicar inoculantes en los ERA porque en estos ensayos se evalúan muchos materiales, de los cuales no se conocen

Cuadro 1.2 Secuencia de evaluación de las leguminosas forrajeras en la RIEPT.

Ensayo regional	Criterio de evaluación ^a	Materiales por sitio (no.)
ERA	Caracterización biológica	Más de 100
ERB	Rendimiento, rebrote y persistencia en monocultivo sin pastoreo	30 - 40
ERC	Persistencia y compatibilidad con gramíneas bajo pastoreo	5 - 10
ERD	Producción animal	Menos de 5

a. Para obtener información más detallada, consultar CIAT, 1982a.

todavía sus requerimientos de inoculación. Si algún material demuestra falta de vigor o clorosis, se le debe fertilizar con nitrógeno.

Se recomienda, en cambio, inocular los materiales que se evalúan en los ERB con las mejores cepas disponibles, y fertilizarlos con nitrógeno si se observa en ellos falta de vigor o clorosis. En tales ensayos no se debe enfatizar el rendimiento como parámetro de selección.

Los ERA y los ERB corresponden a las 'selecciones anteriores' del diagrama de flujo (Figura 1.1). Se recomienda montar ensayos del tipo Etapa 1_L, en los sitios donde sea posible hacerlo, con todos los materiales que se están evaluando en los ERB, para detectar una posible falta de adaptación de las cepas utilizadas a las condiciones locales.

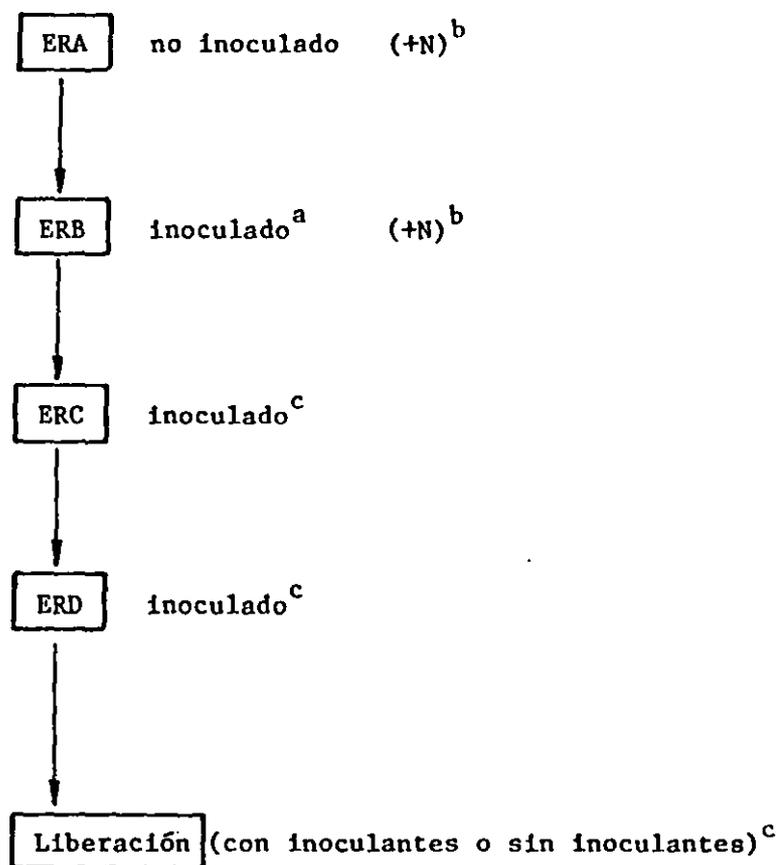
Con los materiales que se seleccionen en estas evaluaciones preliminares, se sugiere hacer ensayos del tipo Etapa 2 antes de montar los ERC y los ERD. De este modo, se pueden inocular las leguminosas en los ERC y los ERD con cepas adaptadas a las condiciones locales o, cuando no sea necesaria la inoculación, no se inocularían. Esta estrategia está ilustrada en las Figuras 1.2 y 1.3.

Sin embargo, hay sitios donde no es posible realizar ensayos paralelos para evaluar la simbiosis antes de establecer los ERC y los ERD. Se recomienda montar, en estos sitios, un ensayo del tipo 'necesidad de seleccionar cepas' paralelo a los ERD o, si es posible, anterior a éstos (Figura 1.4). En estos casos, se inoculan los materiales de los ERC y los ERD con las mejores cepas disponibles, cuya adaptabilidad a las condiciones locales sólo se determina cuando los mejores materiales están ya listos para su liberación y posible uso comercial. Esto implica el riesgo tanto de eliminar leguminosas por la falta de adaptación de los inoculantes usados, como de no tener las mejores cepas para las condiciones locales en el momento de hacer la liberación de la leguminosa. Es preferible hacer la liberación de la leguminosa juntamente con el respectivo inoculante, que liberar la leguminosa antes, y después tratar de introducir la tecnología de la inoculación.

1.3.2 Selección de líneas de frijol

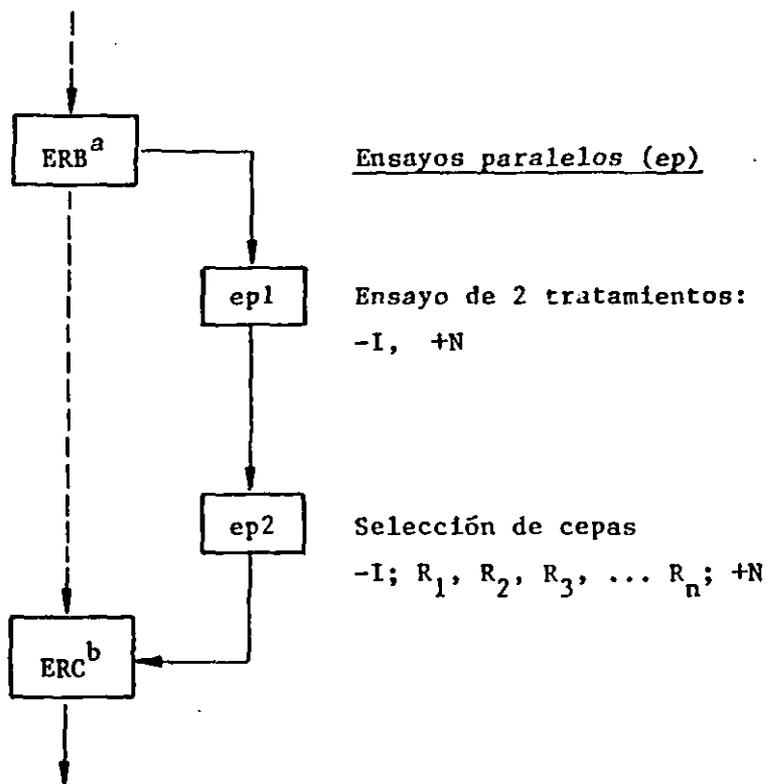
La metodología que se utiliza en el CIAT para evaluar líneas de frijol sigue el esquema que se describe enseguida.

Las accesiones seleccionadas en todos los programas de mejoramiento entran a los 'viveros del equipo de frijol' (VEF) donde se evalúan por su adaptación, su resistencia a las enfermedades y plagas, y por otros aspectos; las selecciones de los VEF entran luego a 'ensayos preliminares de rendimiento' (EP), en los cuales el rendimiento es el parámetro principal de selección. Por esta razón, en los EP se recomienda evaluar los



- a. Utilizando una cepa de rizobio recomendada y producida por el CIAT u otra institución.
- b. Fertilizar con nitrógeno si se observa clorosis o falta de vigor.
- c. Según resultados de los ensayos paralelos.

Figura 1.2. Estrategia recomendada para los ensayos de la RIEPT.

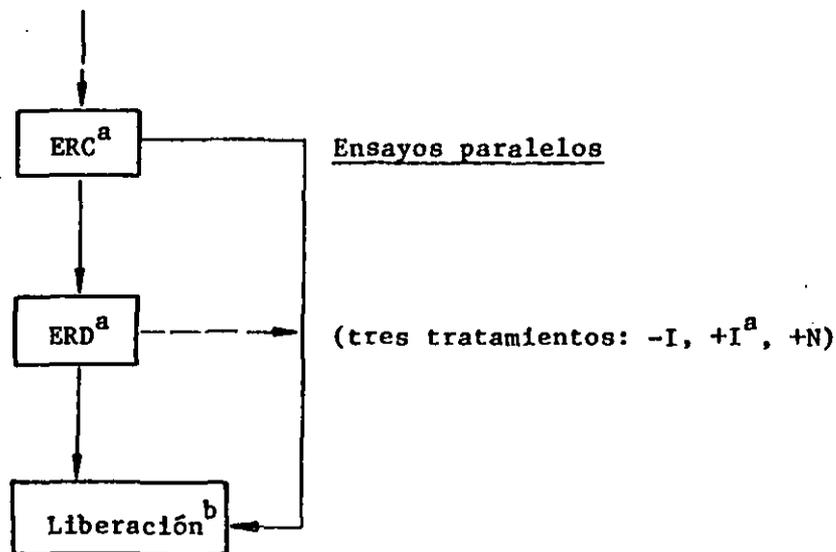


a. Inoculado; además, fertilizar con N si se observa clorosis o falta de vigor.

b. Con inoculantes o sin ellos, según los resultados de los ensayos paralelos.

I = inoculación, N = nitrógeno, R = cepa de rizobio.

Figura 1.3. Estrategia para ensayos paralelos a los ensayos de la RIEPT.



a. Inoculando con una cepa recomendada por otra institución.

b. Con inoculante o sin él, según los resultados de los ensayos paralelos.

Figura 1.4. Estrategia para ensayos paralelos a los ensayos de la RIEPT, donde no es posible seguir la estrategia recomendada en la Figura 1.3.

materiales aplicando dos tratamientos: baja disponibilidad de N sin inocular, y alto nitrógeno. Este tipo de ensayo correspondería a la Etapa 1_L.

No todos los programas de frijol pueden establecer los EP con dos tratamientos, en vez de esto se aplican, generalmente, niveles medios o altos de N. En este caso no se obtiene información sobre la fijación de nitrógeno, y se corre el riesgo de eliminar materiales con alta capacidad simbiótica y de seleccionar otros que requieran fertilización con nitrógeno.

Los materiales seleccionados en los EP se evalúan en los 'viveros internacionales de rendimiento y adaptación de frijol' (IBYAN, International Bean Yield and Adaptation Nurseries). Estos viveros serían el tiempo más apropiado para hacer los ensayos de 'necesidad de seleccionar cepas', que corresponden a la Etapa 2.

Cada país tiene su propio esquema para hacer la evaluación de las líneas de frijol; algunos siguen el esquema descrito (VEF-EP-IBYAN), mientras que otros lo adaptan para sus necesidades específicas. En el esquema seguido por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) de Guatemala, por ejemplo, hay una etapa temprana de ensayos a nivel de la finca. Las selecciones del programa de mejoramiento de ICTA (F₄ y F₅) y los materiales provenientes de otros países entran a 'ensayos preliminares de rendimiento' (EPR) en que se evalúan, aproximadamente, 50 materiales. Los EPR se realizan en estaciones experimentales y, cuando haya suficiente semilla, serían la ocasión ideal para aplicar los dos tratamientos (bajo N sin inocular y alto N) de la Etapa 1_L. En los EPR se seleccionan aproximadamente 15 materiales para las pruebas en fincas, que se realizan hasta en 20 sitios bajo la responsabilidad de un técnico. Estos ensayos se fertilizan con 40 kg/ha de N, aproximadamente. Sería ventajoso establecer en algunos sitios, por lo menos, ensayos sobre 'necesidad de seleccionar cepas', con niveles de nitrógeno definidos (Etapa 2).

De estos ensayos se seleccionan materiales que serán evaluados en parcelas grandes de verificación (parcelas de prueba), manejadas por el agricultor. Si se observaran aumentos en el rendimiento a causa de la inoculación hecha en la Etapa 2, se deberían inocular las parcelas de prueba con las cepas más efectivas.

2 RECOLECCION DE NODULOS PARA EL AISLAMIENTO DE RIZOBIOS

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en su forma (esféricos, alargados o ramificados) y en su tamaño (de 0.5 a 50 mm de diámetro), pero siempre se destacan fácilmente de las raíces. El color interno de un nódulo vivo y activo varía de rojo claro a rojo oscuro, su consistencia es firme, y al abrirlo, sus tejidos liberan una savia de color rojo. Los nódulos muertos tienen consistencia esponjosa y coloración interna oscura o negra. Los nódulos vivos que tienen una coloración interna verde o blanca son inactivos; los nódulos con coloración roja a rosada no siempre son activos, pero tienen mayor probabilidad de serlo.

La localización de los nódulos en el sistema radical depende de la especie hospedante y de las condiciones ambientales. En ciertas condiciones, los nódulos se hallan muy alejados de la corona; algunos se encuentran a considerable profundidad, mientras que otros se localizan, en su mayor parte, en las raíces laterales. Sin embargo, en la mayoría de las leguminosas de uso agronómico los nódulos se encuentran cerca de la raíz principal, y se les puede obtener fácilmente, cavando con cuidado alrededor de la planta con una pala, una navaja o un implemento similar. Nunca debe halarse la planta para extraerla del suelo porque es muy probable que así se rompa la frágil ligazón que une los nódulos a las raíces, y gran parte de aquéllos quedarían dentro del suelo.

Se deben seleccionar plantas vigorosas, con hojas verdes y sanas, para recolectar de ellas los nódulos de donde se aislarán luego los rizobios. Siempre se debe identificar la especie hospedante por su nombre científico; si no es posible hacerlo, se deben recolectar muestras de las hojas, las flores y las semillas para su posterior identificación. La fecha de recolección se debe sincronizar, en lo posible, con la época de crecimiento vegetativo de las plantas cuando haya adecuada disponibilidad de agua en el suelo; en ese período los nódulos son más abundantes y activos. Sin embargo, muchas veces conviene aprovechar una excursión de recolección de semillas, que se realizan generalmente durante las épocas secas, para recoger los

nódulos. De no encontrar nódulos en las raíces de las plantas durante la época seca, se puede recolectar una pequeña cantidad de suelo (5 g) alrededor de la raíz; con este suelo se inocula posteriormente una planta cultivada en arena con solución nutritiva estéril de modo que los rizobios, presentes en el suelo y provenientes del sitio de origen de la planta, inicien en ésta la formación de nódulos.

Para obtener una buena muestra de nódulos, se seleccionan de 10 a 20 nódulos vivos e intactos de la misma planta, y se colocan completos (o sea, adheridos a la raíz) en un frasco o tubo de vidrio que contenga un material desecante como cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) o gel de sílice seco, tal como se observa en la Figura 2.1. Siempre que sea posible, los nódulos contenidos en un solo frasco deben provenir de una misma planta; de no ser así, se debe anotar en la información que acompaña al frasco. Si la muestra de nódulos es muy grande, es preferible dividirla en varios frascos. Es necesario llevar los frascos o tubos al campo e introducir en ellos los nódulos tan pronto como sean recolectados, ya que el proceso de descomposición de éstos empieza inmediatamente después de la recolección.

Se recomienda dejar un trozo pequeño de raíz adherida al nódulo para facilitar su manejo durante el proceso de aislamiento de los rizobios. Colocados los nódulos dentro del frasco, éste se tapa para iniciar el proceso de desecamiento que, si es rápido, favorece la conservación de los nódulos. Si aparece agua de condensación en las paredes del frasco, los nódulos se pasan a otro frasco. Los rizobios se conservan viables dentro del frasco durante más tiempo si se refrigeran.

Una vez recolectados los nódulos, se pueden enviar a los laboratorios de Microbiología de Suelos del CIAT o a otro laboratorio que posea las condiciones necesarias para el aislamiento de las bacterias. Cuando se envían nódulos por correo desde otro país al CIAT, debe anexarse al paquete un certificado fitosanitario que se obtiene, solicitándolo previamente, por intermedio del CIAT. Se solicita además al remitente llenar el formulario que se adjunta al final de este Capítulo. Es muy importante reunir la mayor información posible sobre las muestras de nódulos recolectadas.

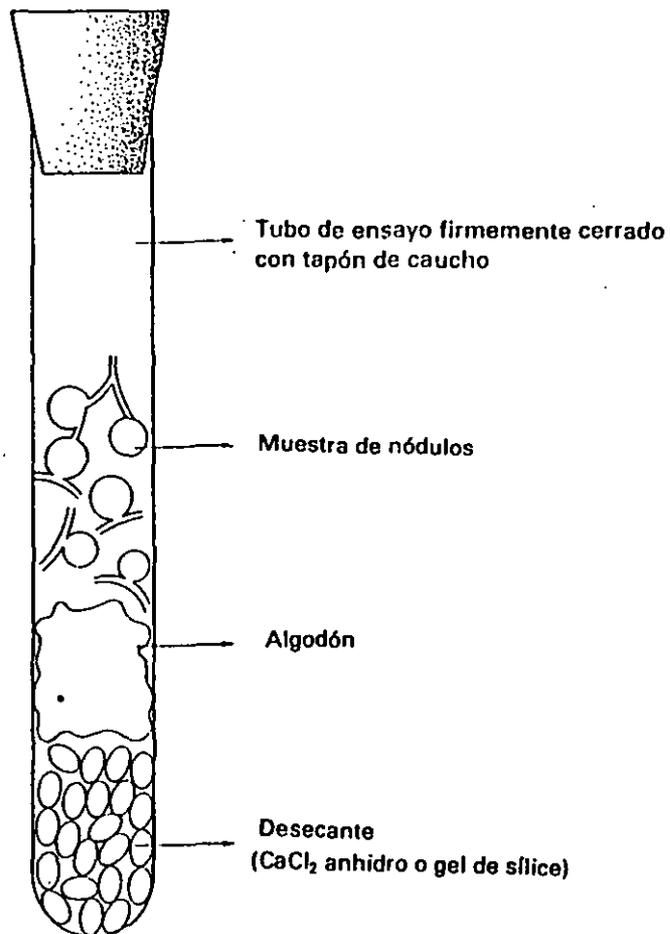


Figura 2.1. Tubo de ensayo que contiene un desecante para la preservación de nódulos.

Recolección de Nódulos
Hoja de Información

1. Datos Generales

- 1.1 Fecha de recolección: _____
1.2 Localización: País _____ Provincia o Depto. _____
Ciudad _____ Hacienda _____
1.3 Características climáticas:
Precipitación _____ mm Temperatura media _____ °C
Altitud _____ msnm Patrón de lluvias _____
1.4 Nombre del recolector: _____
1.5 Dirección del recolector _____
1.6 Nombre de la planta: N. científico _____
N. común _____

2. Sitio de Recolección

- 2.1 ___ Lote de ensayo: Ensayo de inoculación ___ Otro ensayo _____
2.2 ___ Lote cultivado: Monocultivo ___ Intercalado con _____
2.3 ___ Edad cultivo ___ Historial del lote _____
2.4 ___ Pradera: con leguminosas introducidas ___ Con leguminosas nativas _____
2.5 ___ Sabana nativa: Sabana bien drenada ___ Sabana mal drenada _____
Sabana abierta ___ Sabana con arbustos ___ Sabana con árboles _____
2.6 ___ Bosque: Bosque estacional ___ Bosque lluvioso ___
2.7 ___ Area inundada
2.8 ___ Al lado de la carretera
2.9 ___ Información adicional: _____

3. Propiedades del Suelo

- 3.1 pH: Estimado ___ Medido ___
3.2 Contenido de humedad: Estimado ___ % Medido ___ %
3.3 Textura: _____
3.4 Fertilidad natural: Alta ___ Media ___ Baja ___
3.5 Fertilizantes aplicados: _____ Dosis _____/ha
_____ Dosis _____/ha

4. Características de la planta y de la nodulación

- 4.1 Planta: Sin inocular ___ Inoculada ___ Cepa (código) _____
Más vigorosa que las plantas vecinas: Sí ___ No ___
Se dispone de semilla para los ensayos: Sí ___ No ___
4.2 Nódulos: Provenientes de la misma planta ___
Provenientes de dos o más plantas ___
Abundancia: Alta ___ Media ___ Baja ___
Características: Tamaño ___ Color interno _____
Forma ___ Distribución _____
4.3 Otras observaciones: _____

3 AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS DE LOS NODULOS

- 3.1 Cuando no se puede practicar el aislamiento de los rizobios inmediatamente después de la recolección de los nódulos, es mejor mantener éstos en tubos o frascos que contengan un desecante (Capítulo 2).
- 3.2 Si el proceso de aislamiento parte de nódulos secos, éstos se deben dejar sumergidos en agua estéril por una a dos horas, para que absorban agua y pierdan la suciedad que los cubre (Figura 3.1).
- 3.3 La esterilización superficial se puede hacer en cajas Petri, en láminas excavadas, o en tubos de vidrio con dos extremos abiertos, uno de los cuales se cubre con gasa (Figura 3.1). Para iniciar la esterilización, se sumergen los nódulos durante un minuto aproximadamente en alcohol al 95%, y luego se trasladan a una solución desinfectante que puede ser H_2O_2 (3 a 5%), de $HgCl_2$ al 0.1%¹ o de hipoclorito de Na al 3%, donde se dejan durante 3 a 4 minutos, agitando de vez en cuando; los nódulos muy pequeños se deben dejar menos tiempo en la solución, porque la esterilización puede matar los rizobios. Los nódulos se lavan luego cinco veces con agua estéril.
- 3.4 Se toman cajas Petri (previamente preparadas) que contengan el medio de cultivo levadura-manitol-agar (LMA)². El pH del medio y el indicador empleado dependen de la leguminosa y de las condiciones ambientales que se estudian. Si se trabaja con Bradyrhizobium sp. de leguminosas forrajeras tropicales, se recomienda usar el medio LMA de pH 5.5 (y púrpura de bromocresol como indicador) y el medio LMA de pH 6.8 (y azul de bromotimol). Los rizobios de crecimiento rápido que producen acidez se estrían en el medio LMA de pH 6.8 (y rojo Congo o azul de bromotimol como indicador).

-
1. La solución de $HgCl_2$ al 0.1% se prepara así: 1 g de $HgCl_2$, 5 ml de HCl concentrado, 1 litro de H_2O estéril.
 2. La preparación de este medio se explica al final del capítulo.

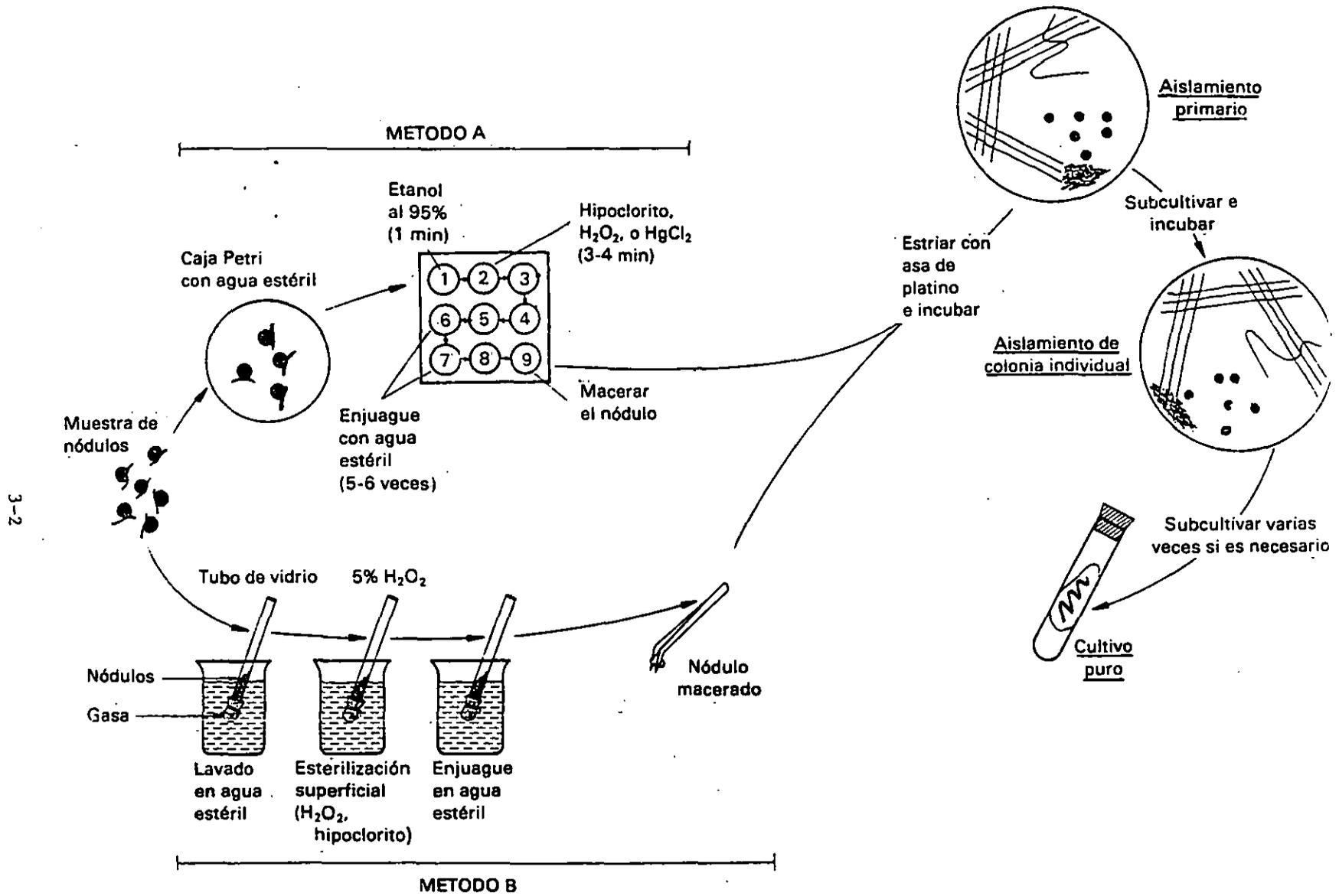


Figura 3.1. Proceso de aislamiento de los rizobios de los nódulos de una leguminosa (dos métodos).

3.5 Para aislar los rizobios de un nódulo ya esterilizado superficialmente, se deposita una gota de agua estéril en una caja Petri con medio LMA, se coloca el nódulo en la gota, y se macera. Como alternativa, se abre el nódulo con un bisturí estéril, y se transfiere el material del centro del nódulo a la caja Petri con un palillo esterilizado. Se estria luego el contenido del nódulo a través del medio de cultivo de dos cajas Petri con un asa de platino (Figura 3.2); se pueden utilizar también asas de aleación cromo-níquel que se venden en el comercio con los nombres de 'Nichrome' y 'Chromel', y son más económicas. Con el método de estriar las cajas Petri, deben resultar cinco colonias aisladas, por lo menos. Se supone que cada colonia aislada proviene de una sola bacteria. Una forma más segura de obtener colonias aisladas, es suspender el nódulo macerado en 100 ml de peptona al 0.1% con 0.01% Tween 40, y agitarlo bien. Se transfiere 0.1 ml de esta suspensión a una caja Petri con LMA, y se rastrilla (Figura 3.2).

3.6 Las cajas Petri se incuban a 28°C en posición invertida para evitar que el agua de condensación gotee sobre la superficie del medio. Las colonias de rizobios de crecimiento rápido se desarrollan en un período de 2 a 5 días, mientras que las de rizobios de crecimiento lento aparecen de 5 a 15 días después sembradas. Para lograr una buena caracterización de las colonias de crecimiento lento, se debe incubar durante 15 a 25 días. Es necesario examinar frecuentemente las cajas para descartar inmediatamente las que presenten crecimiento de hongos, evitando así el riesgo de que se contaminen las otras cajas.

3.7 Se seleccionan las colonias individuales que sean típicas de rizobios (ver Capítulo 5) y se subcultivan en cajas Petri con LMA para purificar la cepa. Los rizobios de crecimiento lento pueden demorar más en desarrollarse que otras bacterias contaminantes. Es posible que un nódulo contenga dos cepas de rizobios. Hay también cepas que forman más de un tipo de colonia y, por ello, puede ser necesario subcultivar varias colonias provenientes de un solo nódulo (ver 5.4).

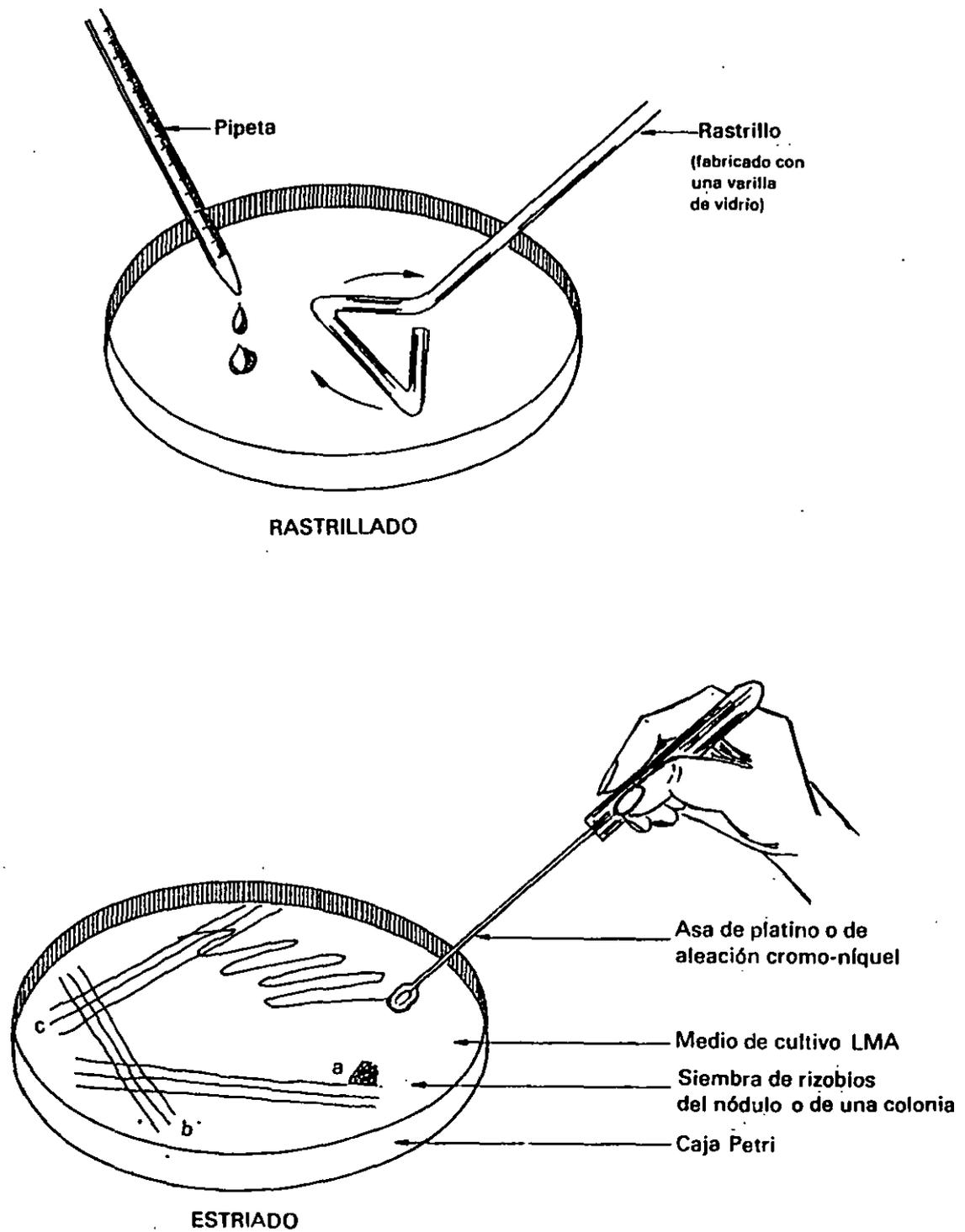


Figura 3.2. Rastrillado y estriado de un nódulo sobre el medio de cultivo LMA. Antes de estriar en a, b, c, y d se esteriliza el asa.

3.8 Después de subcultivar las colonias individuales 3 ó 4 veces, se observa casi siempre un crecimiento homogéneo, momento en que se considera que la cepa está purificada, es decir, libre de contaminantes. Sin embargo, para garantizar la pureza de una cepa, se debe usar el método de siembra por rastrillado, ya que así se obtiene un mayor número de colonias aisladas cuya apariencia puede observarse con más detalle. Se suspende una colonia individual en el medio de cultivo LM líquido, o en una solución de peptona al 0.1% que contenga un dispersante (Tween-40 0.1 ml/l, o Calgon³ al 1.0%), y perlas de vidrio o arena. Se agita bien esa suspensión, y se hacen diluciones de ella que se siembran por el método del rastrillado (Figura 3.2).

Con una colonia entera de Bradyrhizobium sp. de 7 días de crecimiento o de Rhizobium sp. de 3 días de crecimiento se suelen hacer diluciones de 10^3 a 10^6 . De la dilución se transfiere 0.1 ml a la caja Petri. Se deben observar las colonias detalladamente cada día durante su desarrollo inicial para determinar si son diferentes. Si la cepa contiene dos tipos de colonia, se suspenden ambos separadamente y se determina la proporción en que cada uno aparece en las cajas. Se repite este procedimiento varias veces, y si los dos tipos de colonia persisten, se puede deducir que se debe a dimorfismo que es una característica constante de algunas cepas de Bradyrhizobium.

3.9 Cuando se trabaja con una cepa difícil de purificar, los contaminantes se pueden eliminar con este método: se inocula una planta estéril [Siratro (Macroptilium atropurpureum) u otra leguminosa] y luego se aíslan los rizobios de los nódulos formados en ella.

3. Hexametáfosfato de sodio.

3.10 Medio levadura manitol-agar (LMA)

3.10.1 Componentes

Manitol	10.0 g
Agua de levadura ¹	100.0 ml
ó Extracto de levadura ²	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂	0.15 g
Agar (Difco-Bacto): ³	
en medio neutro	15.0 g
en medio ácido	20.0 g
Solución indicadora de pH ⁴	5.0 ml
ó solución de rojo Congo ⁵	10.0 ml
Agua destilada, agregar hasta	1000.0 ml

3.10.2 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 0.8-1.0 ml de NaOH 0.5 N estéril, o se acidifica

1. Para preparar el agua de levadura, disolver 600 g de levadura (Fleischmann) en 5400 ml de agua y hervir durante una hora en el autoclave, sin presión. Dejar enfriar y centrifugar; a falta de una centrifuga, dejar precipitar durante 2 a 4 días en el refrigerador. Envasar volúmenes de 100 ml del sobrenadante y guardarlos sin esterilizar en el congelador.
2. Es preferible utilizar agua de levadura en aquellos lugares donde el extracto de levadura esté expuesto a la humedad, porque ésta causa deterioro en su composición.
3. Para medio líquido, no se agrega el agar.
4. Azul de bromotimol 0.5% en 0.016 N NaOH, para pH 6.8 (ABT).
Púrpura de bromocresol 0.5% en 0.016 N NaOH, para pH 5.5 (PBC).
Verde de bromocresol 0.3% en 0.016 N NaOH, para pH 4.5 (VBC).
5. Solución acuosa de rojo Congo: 1 g por 400 ml de H₂O.

hasta el pH 5.5 con aproximadamente 1.7 ml de HCl 1.0 N estéril. Se acidifica después de esterilizar porque la acidez, combinada con la alta temperatura del autoclave, ocasionan la degradación del agar; por esta razón se utiliza una concentración mayor de agar para el medio ácido.

3.10.3 Cuando se preparan cantidades grandes del medio, es conveniente usar soluciones de reserva (stock) de algunos de los reactivos, preparadas con anterioridad:

Solución stock	Reactivos	Concentración g/l	ml/l de medio
A	K_2HPO_4	50	10
B	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10	
	NaCl	20	10
C	$CaCl_2$	15	10
D	$FeCl_3 \cdot 6H_2O^a$	10	1

a. Se deben agregar 5 gotas de HCl 1N para mantener el hierro en solución.

Para preparar 1 litro del medio, mezclar los volúmenes indicados de las soluciones stock con el manitol, el agua de levadura, y el agua destilada, tal como está indicado en 3.10.1.

3.10.4 El uso de fungicidas en el LMA es útil para los primeros aislamientos de nódulos y para los recuentos, cuando las muestras pueden contener hongos. Sin embargo, si la muestra contiene muchos hongos, el fungicida no basta para inhibirlos. La nistatina, el actidione y el PCNB (Brassicol) deben agregarse después de la esterilización, porque se alteran en el autoclave; es aconsejable disolverlos en agua estéril y agregarlos inmediatamente después de disueltos, o esterilizarlos por filtración. Cuando el medio se ha enfriado hasta 50 °C, se

agregan los fungicidas recomendados. Se puede agregar la solución de verde brillante al medio antes de la esterilización. Este fungicida no permite usar otro indicador.

Dosis de fungicida por litro de medio LMA

- | | | |
|----|--|----------|
| 1. | Nistatina
(Comercialmente lleva el nombre de Micostatin ^R .) | 0.05 g/l |
| 2. | Actidione | 0.1 g/l |
| 3. | PCNB (Brassicol) | 0.1 g/l |
| 4. | Solución (1 g/100 ml) de verde brillante | 1.0 ml/l |

3.10.5 Distribución del medio en cajas Petri o en tubos

El medio LMA se deja enfriar hasta 50 °C antes de distribuirlo en las cajas Petri estériles, para evitar que se produzca demasiada agua de condensación. El agar se solidifica a 44 °C. La distribución se debe hacer por lo menos un día antes de que se usen las cajas, para permitir que éstas se sequen parcialmente. Una caja Petri de vidrio contiene de 30 a 40 ml del medio; una caja Petri desechable contiene 25 ml. Se deben tomar precauciones para evitar cualquier contaminación durante la distribución del medio.

Cuando el medio se distribuye en tubos de ensayo, se vierte en ellos antes de esterilizarlo; también se pueden esterilizar los tubos vacíos y se distribuye el medio estéril utilizando una jeringa especial esterilizable. Cuando se distribuye medio ácido en los tubos antes de esterilizarlo, se debe hervir primero, y después acidificarlo; así se evita que el agar se descomponga.

4 ALMACENAMIENTO Y RECONSTITUCION DE CEPAS DE RIZOBIOS

Las cepas de rizobios deben almacenarse de una manera que se prevenga su contaminación, su mutación o su muerte. En este capítulo se presentan tres métodos de almacenamiento: refrigeración en tubos, desecación en fragmentos de porcelana, y liofilización. En este orden, el primero es el más sencillo y el último el más sofisticado; asimismo, el tiempo en que los rizobios conservan la estabilidad y la viabilidad se incrementa del primer método hasta el tercero.

4.1 Almacenamiento en tubos de ensayo con medio LMA inclinado

Para almacenar rizobios a corto plazo o para mantener colecciones de trabajo se recomienda sembrar los cultivos puros en tubos de ensayo de tapa roscada que contengan medio LMA inclinado; de esta manera pueden conservarse bajo refrigeración durante 2 ó 3 meses. Para evitar el desecamiento del agar, la tapa del tubo debe mantenerse bien cerrada; además, se puede agregar aceite mineral esterilizado sobre la superficie del agar para que no se seque.

4.2 Conservación de rizobios en fragmentos de porcelana

Donde no hay instalaciones para realizar la liofilización, una buena alternativa para almacenar los rizobios durante largo tiempo es desecarlos en trozos de porcelana.¹ Estos cultivos, conservados preferiblemente a una temperatura de 4 °C, pueden durar hasta tres años. Se procede del modo siguiente:

- 4.2.1 Verter de 3 a 5 g de gel de sílice en el fondo de un tubo de 15 ml que tenga tapa roscada o tapón de caucho, y colocar sobre el gel una capa de 1 a 2 cm de lana de vidrio. Agregar luego de 8 a 10 trozos de porcelana (los aisladores eléctricos pueden servir para este propósito).

1. Norris y Date, 1976.

- 4.2.2 Los tubos con el gel de sílice y la lana de vidrio se tapan con papel aluminio y se esterilizan en un horno a 160 °C durante 2 horas; las tapas y los tapones se esterilizan en el autoclave, porque el caucho no tolera la temperatura del horno.
- 4.2.3 Se preparan y esterilizan en el autoclave otros tubos que contengan 0.1 g de maltosa, tapados con algodón. Se agrega 1 ml de solución del cultivo a estos tubos que se agitan suavemente para disolver la maltosa. Se colocan asépticamente los trozos de porcelana, y se agita para permitir la absorción homogénea de los rizobios; se invierten luego los tubos para que el algodón absorba el exceso de líquido. Luego se transfieren asépticamente los trozos de porcelana al tubo que contiene gel de sílice y se tapa bien el tubo. El cultivo perderá viabilidad si el color del gel de sílice cambia de azul a rosado.
- 4.2.4 Para reconstituir los cultivos así preservados, se extrae un trozo de porcelana con un asa recta, y se deposita en un medio líquido o se estría sobre LMA en una caja Petri.

4.3 Liofilización

El método más usado para almacenar rizobios durante períodos prolongados es la liofilización. Los rizobios se suspenden en una solución de peptona-sucrosa (peptona al 10% y sucrosa al 20%; esterilizar las soluciones separadamente y luego mezclarlas) y se liofilizan en ampollas estériles rotuladas. Estas ampollas se cierran al vacío y pueden conservarse así indefinidamente. Para reconstituir los cultivos liofilizados se usa el método siguiente:

- 4.3.1 Romper la ampolla con la ayuda de una lima, en la mitad de la zona ocupada por el tapón de algodón.
- 4.3.2 Agregar a la ampolla 3 gotas de peptona al 0.1%, u otro caldo estéril, con una pipeta Pasteur, tratando de bañar las paredes del tubo con la solución para recuperar todas las células de rizobios que están en la ampolla.

- 4.3.3 Se extrae la suspensión de la ampolla con la pipeta Pasteur, y colocar una gota de ella en cada una de dos cajas Petri que contengan medio LMA. Si se trata de cepas de leguminosas forrajeras tropicales, se utiliza medio LMA de pH 6.8 en una caja y medio LMA de pH 5.5 en la otra. Para cepas de crecimiento rápido, como los rizobios de frijol, se usa medio LMA de pH 6.8, en una caja con ABT y en la otra con rojo Congo.
- 4.3.4 Estriar las gotas de la suspensión con una asa de platino o de aleación de níquel - cromo ('Nichrome' o 'Chromel').
- 4.3.5 Incubar a 28 °C. Transcurridos 10 días debe haber un buen crecimiento de Bradyrhizobium, aunque hay cepas que tardan 15 días o más en crecer. El desarrollo de las colonias de rizobios de crecimiento rápido se observa después de 3 a 5 días.

5

CARACTERIZACION DE LOS RIZOBIOS

- 5.1 Los rizobios no absorben generalmente el rojo Congo cuando las cajas se incuban en la oscuridad. En la mayoría de los rizobios las colonias permanecen blancas, u ocasionalmente rosadas; sin embargo, esta reacción depende de la concentración correcta del rojo Congo y de la edad del cultivo. Muchos organismos contaminantes absorben el tinte rojo, propiedad que permite diferenciarlos de los rizobios.
- 5.2 El medio LMA de pH 6.8 con ABT es de coloración verde. Los rizobios de crecimiento lento producen alcalinidad y cambian esa coloración del medio a azul, mientras que los rizobios de crecimiento rápido producen acidez y cambian dicha coloración a amarillo. El medio LMA de pH 5.5 con PBC es de color habano; las cepas que producen alcalinidad cambian ese color a morado, y las que producen acidez lo cambian a amarillo.
- 5.3 Las características de las colonias cambian con el tiempo y las condiciones de incubación. Su textura puede ser cremosa o elástica. Se determina la textura de una colonia tocándola con una asa. La apariencia de las colonias puede ser gelatinosa, seca o acuosa. Las cepas de Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli forman colonias gelatinosas, mientras las de Bradyrhizobium sp. son de apariencia más variable. Generalmente, en sección vertical, las colonias son planas o redondeadas. Algunas pocas son cónicas o parecen un huevo frito.
- 5.4 Dos ejemplos de descripción de colonias se presentan a continuación:
- 5.4.1 Descripción del crecimiento de Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli.
- Estos rizobios son de crecimiento rápido. En medio LMA de pH 6.8, con ABT e incubando a 28 °C, hay poca variación en la apariencia de las colonias de las cepas de este grupo; siempre producen goma. Algunas producen menos goma, y son más opacas (menos translúcidas).

Diámetro de las colonias a las: 48h ___ 60h ___ 72h ___ 84h ___

Cantidad de goma: abundante ___ escasa ___

Textura: elástica ___ cremosa ___

Forma: plana ___ redondeada ___

Cambio de pH: mucha acidez ___ poca acidez ___ no cambia ___

Apariencia: brillante (translúcida) ___ opaca (menos translúcida) ___

Debido en parte a la variabilidad en la producción de poli-beta-hidroxi-butirato, puede ser más fácil distinguir entre cepas cuando las colonias están viejas, como ocurre, por ejemplo, después de 16 días de incubación a 20 °C.

5.4.2 Descripción del crecimiento de *Bradyrhizobium* spp.

Las cepas de *Bradyrhizobium* spp. forman colonias secas, acuosas o gelatinosas. Las acuosas y gelatinosas son translúcidas, mientras que las secas son opacas. En sección vertical las gelatinosas son elevadas y redondeadas. Las secas son planas, u ocasionalmente cónicas. Las acuosas inicialmente son elevadas y después se aplanan, y se extienden sobre la superficie del agar. La apariencia de las colonias puede cambiar con el pH inicial del medio. Se han desarrollado las siguientes categorías para facilitar la descripción de las cepas.

.1 Categorías de crecimiento de copas de rizobio en LMA de pH inicial 5.5 y 6.8, incubando de 10 a 20 días a 28 °C.

Categoría	pH inicial 5.5	pH inicial 6.8
V	Crecimiento muy lento; colonias pequeñas o medianas (0.5-5.0 mm), secas ^a o gelatinosas, de textura elástica o cremosa	Poco o ningún crecimiento en este pH
W	Colonias pequeñas o medianas (0.5-5.0 mm), secas, elásticas o cremosas en ambos niveles de pH	
X	Colonias gelatinosas de tamaño mediano (3 a 5 mm de diámetro), y textura cremosa o elástica, en ambos niveles de pH inicial	
Y	Colonias acuosas ^a , que producen goma líquida en ambos niveles de pH aunque muchas veces se produce más goma en pH 5.5 que en 6.8	
Z	Colonias acuosas, que producen goma líquida	Colonias pequeñas, secas y cremosas

a. Sinclair e Eaglesham (1984) describen colonias secas y acuosas. Las colonias secas mantienen su forma convexa y redonda aun cuando crecen juntas: . Cuando las acuosas se unen, pierden su forma individual: .

.2 Se evalúa el cambio de pH en el medio según las siguientes categorías:

N = no cambia

A = produce acidez

C = produce alcalinidad

CA = inicialmente produce alcalinidad, después acidez

NA = inicialmente no cambia, después produce acidez

NC = inicialmente no cambia, después produce alcalinidad

.3 El tiempo de crecimiento y la apariencia de las colonias se clasifican en cinco grupos: -, (+), +, ++, +++

5.5 Es frecuente observar dos tipos de colonias en algunos cultivos de rizobios (dimorfismo). En estos casos, los cultivos se deben resembrar varias veces, mediante rastrillado de colonias individuales, para eliminar la posibilidad de que este fenómeno sea causado por contaminación (ver 3.8). El dimorfismo de las colonias no afecta necesariamente la capacidad de los rizobios para fijar nitrógeno. Los cultivos con colonias de dos tipos se pueden usar para la inoculación, si ya se sabe que se trata de una característica del cultivo y no de la presencia de contaminantes o mutantes estables.

5.6 Después de caracterizar las colonias se debe comprobar que la cepa aislada es un rizobio, inoculando plantas estériles (Capítulo 9) para verificar su capacidad de formar nódulos.

5.7 Agrobacterium es un género de bacterias que también pertenece a la familia Rhizobiaceae, y tiene muchas características similares a las de los rizobios de crecimiento rápido (Rhizobium). Agrobacterium tumefaciens puede formar nódulos (tumores) en algunas leguminosas pero no tiene la capacidad de fijar N_2 . La prueba de la ketolactasa se emplea para diferenciar entre estos dos géneros; para hacerla, se procede de la siguiente manera:

- Estriar la cepa en medio LMA en que el manitol haya sido reemplazado por lactosa (en igual concentración, 10 g/l).
- Después de que se observe crecimiento, el medio se cubre con 10 a 15 ml del reactivo de Benedict:

Reactivo de Benedict

Solución A

Citrato de sodio 17.3 g
Carbonato de sodio 10.0 g
Agua destilada 60 ml

Solución B

Sulfato de cobre (CuSO_4) 1.73 g
Agua destilada 10 ml

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.

- La formación de un color amarillo después de 10 minutos indica la presencia de Agrobacterium.



6 PRUEBAS DE PUREZA PARA LOS CULTIVOS DE RIZOBIOS

Los cultivos de rizobios se contaminan muy fácilmente. Por ello, en todas las etapas de manejo de los rizobios, especialmente en la producción de inoculantes, se deben utilizar las pruebas de pureza descritas en este capítulo.

6.1 Características de las colonias

La prueba de pureza que más se aplica a los rizobios es el reconocimiento de colonias típicas de cada cepa. Cada cepa tiene características diferentes, y por experiencia se aprende a reconocerlas visualmente. Es necesario dejar crecer las cepas de Bradyrhizobium mínimo por 10 días, para que se desarrollen adecuadamente y permitan la caracterización de sus colonias y de aquéllas de los contaminantes.

6.2 Examen microscópico

Los rizobios son bacilos móviles Gram negativos (aunque pueden ser Gram variables) que no producen esporas. Mediante tinción de Gram, o en un microscopio con contraste de fase, se pueden identificar aquellos cultivos con morfología diferente a la de los rizobios (esporas, cocos, bacterias Gram positivas).

6.2.1 Coloración de Gram¹

.1 Reactivos

A. Solución cristal violeta

cristal violeta	10 g
oxalato de amonio	4 g
etanol	100 ml
agua destilada	400 ml

1. Vincent, J. M. 1975.

B. Solución de yodo	
yodo	1 kg
yoduro de potasio	2 g
etanol	25 ml
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

.2 Procedimiento

- Extender bien una pequeña porción de un cultivo de rizobios sobre un portaobjetos y dejarla secar al aire;
- pasar el frotis seco, una sola vez, sobre la llama de un mechero Bunsen;
- teñir con la solución (A) durante un minuto;
- enjuagar suavemente con agua;
- cubrir el frotis con la solución yodada (B) y dejar durante un minuto;
- decolorar cubriendo con alcohol (C) durante 1 a 5 minutos;
- lavar con agua;
- teñir con el colorante de contraste (D) de 1 a 5 minutos;
- lavar con agua y dejar secar;

- examinar directamente por inmersión en aceite: las células Gram positivas toman un color violeta oscuro; las Gram negativas son de color rojo claro.

6.3 pH

Un pH final menor de 5.5 o mayor de 8 del medio LM líquido indica la presencia de organismos contaminantes.

6.4 Cultivo en medio peptona-glucosa

Los rizobios no se desarrollan bien en el medio peptona-glucosa. Por tanto, un crecimiento notorio en este medio, acompañado de un cambio en el pH, probablemente es efecto de la presencia de un contaminante. Los contaminantes no crecen bien a veces en el medio de cultivo levadura-manitol; por ello puede pensarse equivocadamente que el cultivo está puro cuando se usa solamente medio LMA. El medio peptona-glucosa se prepara de la siguiente manera:

Glucosa	5 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Púrpura de bromocresol (1.0% en etanol)	10 ml
Agua destilada, agregar hasta	1000 ml
pH final	6.7

6.5 Cultivo en LMA

Con el caldo usado para producir inoculantes se siembran cajas Petri que contengan LMA y se examinan las colonias. Aunque se elabora el inoculante inmediatamente y no se puede esperar al crecimiento de las colonias, este procedimiento permite asegurar la pureza del inoculante antes de usarlo.

6.6 Purificación de cepas contaminadas

Para purificar una cepa contaminada, se siguen los procedimientos indicados en el Capítulo 3. Cuando se contamina un caldo para hacer inoculantes, se desecha.

6.7 Serología

Se puede emplear la serología para confirmar la presencia de una cepa en un cultivo, aunque esta prueba no garantiza la ausencia de contaminantes (ver Capítulo 7).

Una manera de diferenciar las cepas de rizobios es mediante la serología, y hay diferentes métodos serológicos que difieren en su especificidad. El método de inmunodifusión es poco específico, ya que permite distinguir grupos de cepas, pero no detecta la variabilidad que pueda existir dentro de los grupos; sin embargo, si las cepas pertenecen a serogrupos diferentes, este método es el más sencillo, requiere poco equipo, e identifica con seguridad las cepas que difieren entre sí.

En los trabajos de selección de cepas es útil tener la certeza de que las cepas escogidas para los ensayos de campo son diferentes. Los antisueros de cepas identificadas en el invernadero como efectivas, pero serológicamente desconocidas, pueden prepararse en los laboratorios de NIFTAL o del CIAT; más adelante, una prueba de inmunodifusión facilitará la escogencia de cepas para cada leguminosa que sean serológicamente diferentes, con el fin de compararlas luego bajo condiciones de campo.

7.1 Preparación de los antígenos

Se parte de un cultivo de rizobios en una caja Petri; se suspende en 10 ml de solución salina (0.85% de NaCl), se lava 2 veces (centrifugando) en solución salina, haciendo la suspensión final en 1 hasta 5 ml de solución salina, según a cantidad de crecimiento de cada cepa. Colocar los tubos al baño maría durante 30 minutos a 100 °C para destruir los antígenos de flagelos y cápsulas.

7.2 Preparación de las placas

Preparar agar al 1.2% (12 g/l) con solución salina al 0.85%; una vez derretido el agar, dejarlo enfriar y añadir azida sódica al 0.065% para prevenir el crecimiento de contaminantes. La azida de sodio se descompone con el calor. Distribuir ese medio en cajas Petri plásticas (12.5 ml/caja) hasta una profundidad de 4 mm y dejar solidificar. Formar luego pequeñas cavidades en el medio con una distribución hexagonal (Figura 7.1), dejando una cavidad en el

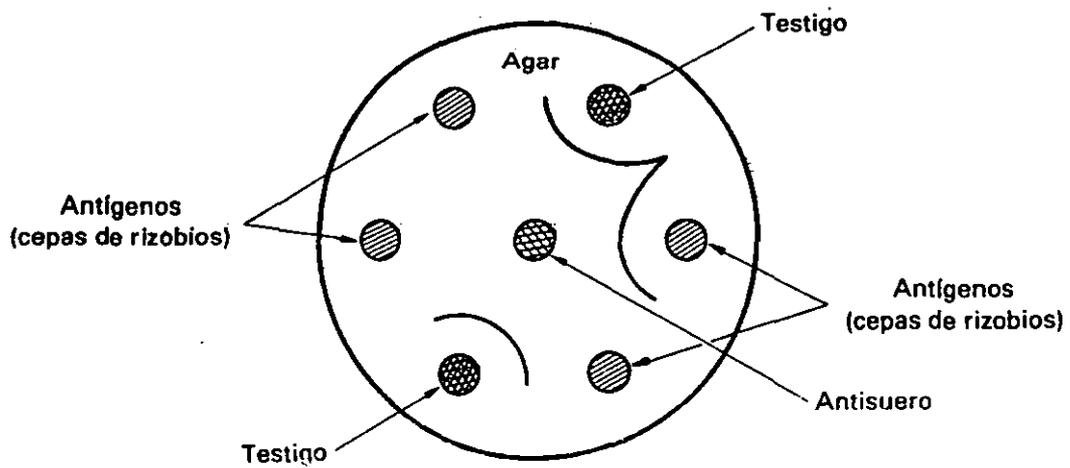


Figura 7.1. Pruebas de inmunodifusión para diferenciar cepas de rizobios.

centro; para hacer estas cavidades se puede usar el equipo de Gelman o un sacabocados de 2 a 5 mm de diámetro.

Llenar la cavidad central con antisuero y las cavidades del hexágono con los cultivos que se probarán (antígenos). Dos de estas cavidades deben contener antígenos que correspondan al antisuero que se está utilizando; estas dos cavidades testigo deben estar en lados opuestos del hexágono.

7.3 Incubación e interpretación de los resultados

Las cepas serológicamente iguales a la cepa usada para preparar el antisuero forman zonas de precipitación continuas con las zonas formadas por los testigos. El tiempo necesario para la formación de estas bandas depende del tamaño de las cavidades, de la humedad y temperatura del aire, y también de la reacción específica entre anticuerpo y antígeno; sin embargo, si se deja pasar mucho tiempo, las bandas pueden perder su nitidez. Por esta razón, se recomienda hacer lecturas diarias para definir los tiempos apropiados según las condiciones ambientales de la localidad.

En ciertos casos puede ser útil evaluar algunas características adicionales para diferenciar las cepas o identificar aquéllas que tienen cualidades deseables. Algunos métodos que pueden usarse para este fin se describen a continuación.

8.1 Crecimiento a varios niveles de pH (4.5, 5.0, 6.8 y 9.0).

El ajuste del medio LMA a diferentes valores de pH ha sido ya discutido (ver Capítulo 3). El medio de Keyser, un medio definido, ha sido modificado y se usa rutinariamente en el CIAT para evaluar la tolerancia de las cepas de frijol a diferentes niveles de pH. Las cepas se siembran por estrías, o mejor, por diluciones y rastrillado en medios de diferentes niveles de pH, y luego se evalúa su crecimiento asignándoles categorías cualitativas (-, +, ++, +++) con diferentes tiempos de incubación. Para obtener datos cuantitativos, contar el número de células viables por colonia formada mediante recuentos hechos en cajas Petri (Capítulo 3).

8.1.1 Modificación CIAT del medio de Keyser¹

Soluciones de reserva (stock):

1) Micronutrientos:

MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.504 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.227 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.034 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.008 g
Agua destilada, agregar hasta	1000 ml

1. Keyser, 1978; Keyser y Munns, 1979.

2) Vitaminas:

Tiamina-HCl	0.400	g
d-Acido pantoténico (Ca)	0.400	g
Biotina	0.0001	g
Agua destilada, agregar hasta	100	ml

3) Fosfato:

KH_2PO_4	1.36	g
Agua destilada, agregar hasta	1000	ml

Preparación del medio:

Glicerol	5	ml
K_2SO_4	0.131	g
Glutamato de sodio	0.220	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.074	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007	g
Fe-EDTA	0.035	g
Solución de micronutrientes	0.5	ml
Solución de vitaminas	1.0	ml
Solución de fosfato	1.0	ml
Agua destilada, agregar hasta	1000	ml

Agregar agar al 2%, si se desea. Esterilizar y ajustar el pH al nivel deseado, con HCl o NaOH estériles.

8.2 Tolerancia a niveles elevados de Mn

La concentración de Mn en el medio Keyser de pH 6.0 se eleva, hasta obtener 50 uM de Mn, agregando 8.45 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por litro del medio.

8.3 Tolerancia a niveles elevados de Al

Agregar $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al medio Keyser de pH 4.6 (después de la esterilización) para obtener 2 y 4 ppm de Al en la solución (17.9 mg/l y 35.8 mg/l, respectivamente).

8.4 Tolerancia a niveles elevados de NaCl

Agregar 1 ó 2% de NaCl al medio LMA.

8.5 Temperatura

Sembrar en el medio LMA, por el método del rastrillado, diluciones de las cepas e incubar a diferentes temperaturas (ej.: 10, 15, 28 y 36 °C), observando periódicamente el crecimiento.

8.6 Desnitrificación

Muchos rizobios de crecimiento lento crecen en medios anaeróbicos que contienen nitratos, pues son capaces de desnitrificar. En los rizobios de crecimiento rápido no ha sido demostrada la desnitrificación, con excepción de Rhizobium meliloti. El siguiente método fue utilizado por Zablotwicz et al (1978) para identificar rizobios que desnitrifican activamente, aunque no es un método suficientemente sensible para detectar actividades bajas.

Para evaluar la desnitrificación, se utilizan tubos de cultivo (16 x 150 mm) con 10 ml de medio LM líquido que lleven un tubo de Durham (5 x 40 mm) invertido en el medio (Figura 8.1).

A la mitad de los tubos se agrega KNO_3 estéril para obtener una concentración de 1 mg/ml. Cada cepa se inocula en tubos con KNO_3 y sin él. Los tubos se cierran bien y se incuban de 3 a 4 semanas a 28 °C. Se examina el crecimiento bacteriano, la producción de gas y, si es posible, las concentraciones de nitratos y nitritos.

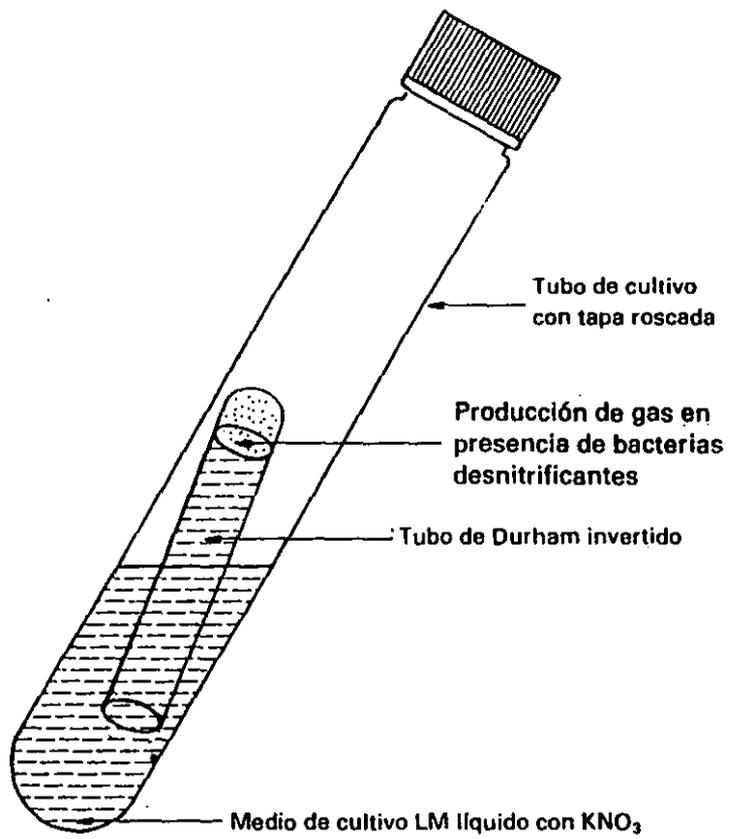


Figura 8.1 Dispositivo para evaluar la desnitrificación.

8.6.1 Determinación de nitratos¹

- En frascos Erlenmeyer de 50 ml se colocan alícuotas de 0.2 ml de las muestras que se evaluarán. También se preparan frascos con alícuotas de concentraciones conocidas de NO_3^- , en el rango de 5 a 300 $\mu\text{g NO}_3^-/\text{ml}$.
- Se agrega 0.8 ml de una solución de ácido salicílico al 5% (p/v) en ácido sulfúrico concentrado.
- Después de 20 minutos a temperatura ambiente se agregan lentamente 19 ml de NaOH 2N para elevar el pH hasta 12.
- Las muestras se enfrían a la temperatura ambiente y se mide la absorción a 410 nm. El cero (testigo) consiste en una muestra de H_2SO_4 sin ácido salicílico, y NaOH.
- Se prepara una curva estándar con las concentraciones conocidas de NO_3^- , que se emplea para determinar las concentraciones de NO_3^- en las muestras.

1. Cataldo et al., 1975.

9 MÉTODOS DE INFECCIÓN DE PLANTAS ESTERILES EN TUBOS, EN BOLSAS DE CRECIMIENTO, Y EN JARRAS LEONARD

Para hacer recuentos y para los estudios de infección de plantas con cultivos puros de rizobios, es necesario hacer crecer las plantas en un sistema estéril.

Para las leguminosas de semilla grande, como el frijol y la soya, se recomienda utilizar jarras de Leonard o bolsas de crecimiento al realizar las pruebas de autenticación y los recuentos; las leguminosas de semilla pequeña se pueden cultivar en tubos de ensayo. En los tubos de ensayo y en las bolsas de crecimiento solo se evalúa la nodulación, no el rendimiento. Las jarras de Leonard permiten un mayor desarrollo de las plantas y por ello se pueden utilizar para evaluar el rendimiento, aunque es necesario tomar precauciones para optimizar las condiciones de desarrollo. Para autenticar cepas y para recuentos se deben incluir de tres a cinco repeticiones, y algunos testigos sin inocular.

La autenticación de una cepa aislada y purificada se debe hacer, idealmente, en la misma especie de planta de donde fue originalmente aislada; sin embargo, puede ser conveniente reemplazar la especie original por otra leguminosa. El *Siratro* nodula con más del 90% de las cepas de rizobios de crecimiento lento y se usa ampliamente para autenticar la mayoría de los rizobios de crecimiento lento de las leguminosas forrajeras tropicales; no puede usarse, sin embargo, para algunas cepas de soya, de garbanzo y de otras leguminosas.

9.1 Esterilización y escarificación de la semilla

- 9.1.1 La semilla debe ser recién cosechada y de buena calidad. Para tener una fuente de semillas de buena calidad, es mejor cultivar algunas plantas y cosechar su semilla. La semilla vieja se contamina fácilmente y no facilita la buena nodulación de las plantas.
- 9.1.2 Poner las semillas en un tubo o en un frasco adecuado, recordando que las semillas embeberán agua y crecerán.

- 9.1.3 Cubrir las semillas con etanol al 95%, agitando el tubo durante 3 minutos. Vaciar luego el etanol.
- 9.1.4 Llenar de nuevo el tubo con bicloruro de mercurio acidificado (preparación: 1 g de HgCl_2 , 5 ml de HCl concentrado, y agua destilada hasta completar 500 ml). Se puede sustituir hipoclorito de sodio al 3% o peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% por el bicloruro de mercurio, que es altamente tóxico. Dejar en esa solución durante 3 minutos.
- 9.1.5 Lavar 5 veces con agua estéril, y dejar con agua durante una o dos horas para que las semillas la embeban.
- 9.1.6 Puede ser necesario escarificar las semillas que tienen testa dura, como las de Siratro, haciendo un corte pequeño en la testa de cada semilla con un bisturí esterilizado.
- 9.1.7 Trasladar asépticamente las semillas a una caja Petri que contenga uno de los siguientes sustratos: dos láminas de papel filtro esterilizado, papa-dextrosa-agar (PDA), o agar en agua al 0.75%.
- 9.1.8 Dejar las semillas de 24 a 48 horas hasta que germinen. Si la especie es de semilla pequeña (menos de 3 mm), se pueden invertir las cajas Petri para evitar la curvatura de las radículas.

9.2 Medios usados en tubos, jarras de Leonard, y bolsas de crecimiento

El medio de Norris y Date (1976) se utiliza para las leguminosas forrajeras, que generalmente se siembran en tubos. El medio Sandman se emplea para frijol y otras leguminosas de semilla grande, que se siembran generalmente en bolsas de crecimiento o en jarras de Leonard. Sin embargo, en ocasiones es necesario sembrar leguminosas forrajeras en jarras de Leonard; se utiliza entonces el medio de Norris y Date en las jarras. Si aparecen síntomas de toxicidades o

deficiencias nutricionales, puede ser necesario sustituir o modificar el medio. El medio de Jensen es una alternativa.

9.2.1 Medio de Norris y Date (1976)

.1 Preparación y uso de soluciones de reserva ('stock'):

Solución	Reactivos	Concentración (g/l)	Solución stock (ml) por litro de medio
A	KCl	29.8	2.5
B	K_2HPO_4	69.6 ^a	2.5
C	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	98.6	2.5
D			0.5
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.078	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22	
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.03	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.01	
	H_3BO_3	1.43	
E	Citrato férrico	1.795	1.0

a. Para Stylosanthes spp., la cantidad de K_2HPO_4 en la solución 'stock' se reduce a 4.35 g/l.

.2 Agregar 0.344 g de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ por litro del medio; este sulfato no se disuelve, y se debe agitar bien el medio al distribuirlo.¹

.3 Completar a 1000 ml con agua destilada.

1. Para Stylosanthes spp., la cantidad de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ se reduce a 0.068 g/l del medio.

- .4 Ajustar el pH a 6.8 ó 4.5 (con NaOH o HCl estéril) después de esterilizar el medio en autoclave, si se considera necesario. El pH del medio sin ajustar es aproximadamente 6.5 después de la esterilización.

9.2.2 Medio de Sandman

.1 Soluciones de reserva ('stock'):

A. Solución de hierro

FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0 g
Acido cítrico	5.0 g
Agua destilada, agregar hasta	1000 ml

B. Solución de micronutrientos

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

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

KCl	0.149 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.493 g
K ₂ HPO ₄	0.348 g
Solución de hierro	0.5 ml
Solución de micronutrientos	0.5 ml

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

.4 Solución de calcio:

KNO_3	0.2	g
CaSO_4	2.5	g
Agua destilada, agregar hasta	1000	ml

Para una jarra de Leonard se agregan 200 ml de esta solución a la arena antes de sembrar. Para bolsas de crecimiento se agrega esta solución al medio directamente (200 ml por cada 750 ml de medio).

9.2.3 Medio de Jensen

.1 Solución de reserva ('stock')

H_3BO_3	0.31	g
Na_2MoO_4	0.01	g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	g
KCl	0.041	g
CaCl_2	0.001	g
Agua destilada, agregar hasta	250	ml

.2 Preparación de un litro del medio

CaHPO_4	1.0	g
K_2HPO_4	0.2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
NaCl	0.2	g
FeCl_3	0.1	g
Solución 'stock'	5	ml
Agua destilada, agregar hasta	1000	ml

9.3 Montaje y manejo de plantas en tubos de ensayo

- 9.3.1 Se necesitan tubos de ensayo (2 x 15 cm o 2.5 x 15 cm) con tapas de espuma, soportes de madera o icopor para los tubos, y un sitio con iluminación adecuada y temperatura controlada, ya que la nodulación de *Siratro* es muy sensible a las condiciones ambientales.
- 9.3.2 Agregar 10 g de agar por litro del medio de Norris y Date neutro (pH 6.8), o agregar 20 g de agar por litro del mismo medio ácido (pH 4.5). Cuando se prepara medio ácido, se esteriliza éste en el autoclave con los 20 g de agar y se acidifica después, pero antes de distribuirlo en los tubos; éstos se deben esterilizar por separado. El medio neutro, en cambio, se puede distribuir en los tubos antes de esterilizarlos.
- 9.3.3 Dejar solidificar el medio manteniendo el tubo en posición vertical o inclinada.
- 9.3.4 Trasplantar una semilla estéril y pregerminada (ver 9.1) en cada tubo y dejar que continúe su desarrollo durante 5 a 7 días; inocular luego con 1 ml de suspensión del cultivo de rizobios que se pretende evaluar, preparado según las instrucciones dadas en el punto 12.1. Una vez que hayan crecido las plantas, se permite que su parte aérea salga por un lado del tapón (Figura 9.1).
- 9.3.5 Cubrir la parte inferior del tubo con papel oscuro para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces.
- 9.3.6 Dejar crecer la plántula durante 4 semanas en una cámara iluminada (puede ser luz del sol suplementada con lámparas fluorescentes e incandescentes), a una temperatura de 25 a 30 °C. Si en ese tiempo ocurre deshidratación del medio, se debe regar éste con medio de Norris y Date sin agar, diluido en la proporción 1:4.

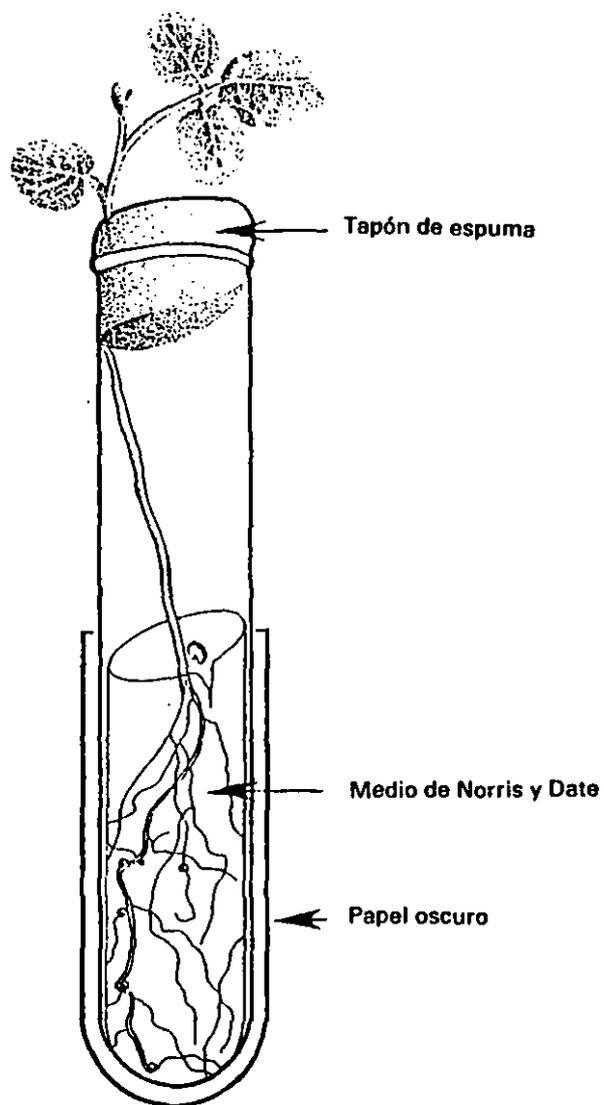


Figura 9.1. Evaluación de la nodulación de leguminosas de semilla pequeña en tubos de ensayo.

9.3.7 Se deben incluir en la prueba dos testigos sin inocular, uno sin nitrógeno y el otro con 0.75 g de KNO_3 por litro del medio, o con otra fuente de N.

9.3.8 Evaluar la presencia de nódulos.

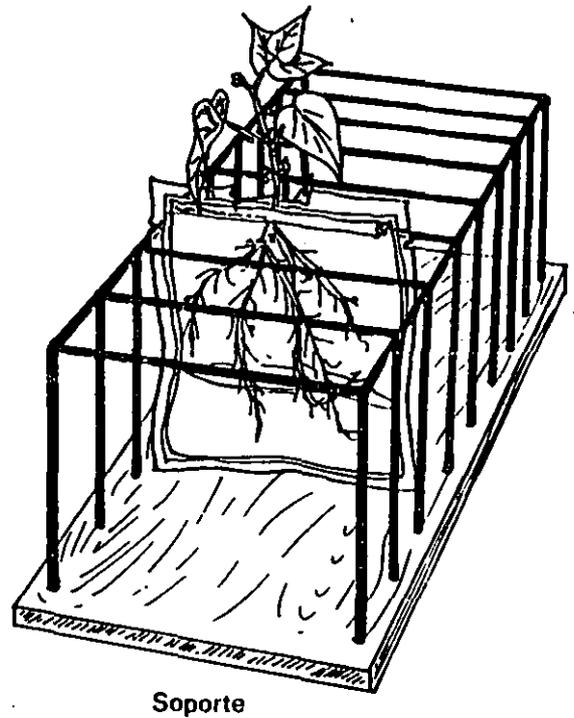
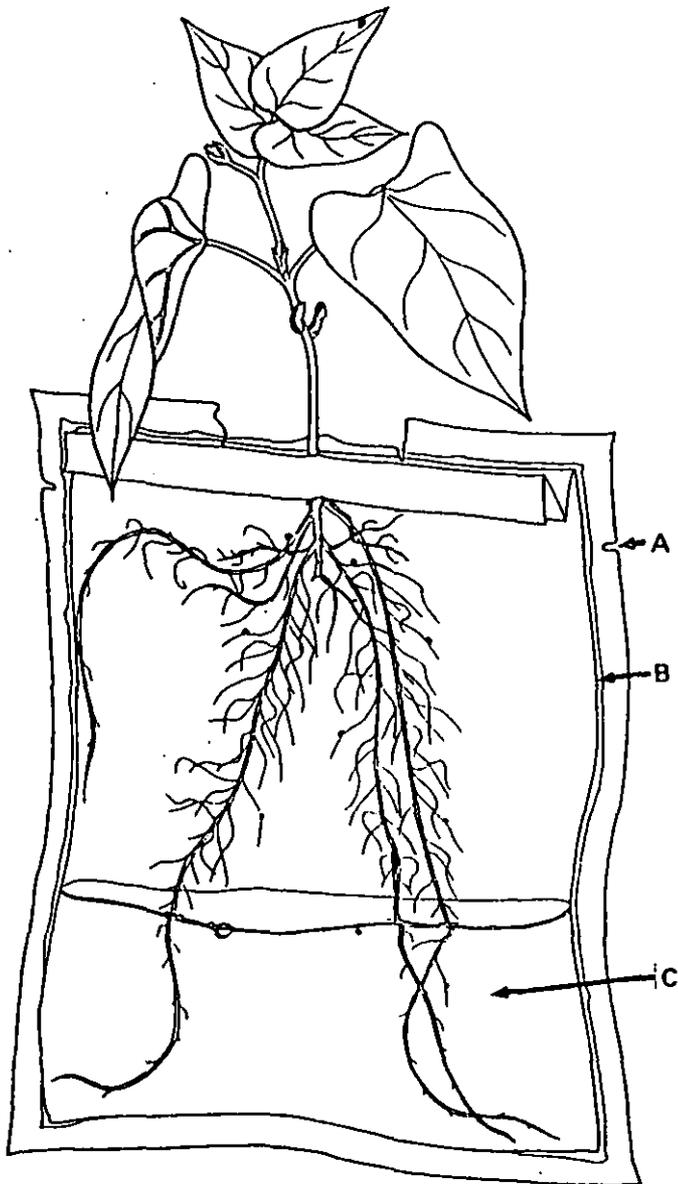
9.4 Montaje y manejo de plantas en bolsas de crecimiento

Las bolsas de crecimiento (16 x 18 cm) son de polipropileno u otro plástico esterilizable; cada bolsa contiene una hoja de papel absorbente, doblada en la parte superior formando un canal en donde se coloca la semilla pregerminada (Figura 9.2). Las bolsas de crecimiento se deben manejar en un cuarto con temperatura controlada por su susceptibilidad a la contaminación, y porque la nodulación es muy susceptible al calor. Requieren un soporte especial hecho de madera y arcos metálicos (Figura 9.2).

9.4.1 Se pueden comprar bolsas de crecimiento estériles con mecha de papel, y se les agregan asépticamente 75 ml de solución nutritiva de Sandman. La alternativa es comprar bolsas plásticas esterilizables, cortar el papel absorbente e insertarlo en ellas; luego se cierran al calor con un sellador eléctrico y se esterilizan en el autoclave. Después se hace una abertura en las bolsas para colocar la semilla e inyectar la solución nutritiva.

Se pueden esterilizar las bolsas y su solución nutritiva en el soporte que las sostiene, aunque el metal al calentarse puede deformar un poco el plástico.

9.4.2 Colocar las semillas esterilizadas y pregerminadas en el canal de la hoja de papel absorbente, introduciendo la raíz, con pinzas delgadas esterilizadas, en el orificio previamente abierto en el canal.



- A. Bolsa de polipropileno
- B. Hoja de papel absorbente
- C. Solución nutritiva de Sandman

Figura 9.2. Bolsa de crecimiento para evaluar la nodulación de leguminosas de semilla grande, como el frijol, y su respectivo soporte.

- 9.4.3 Incubar en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 20 a 30 °C, durante una semana. Descartar las bolsas en que las plantas muestren poco crecimiento. Inocularlas con 1 ml de suspensión del cultivo de rizobios (ver 12.1).
- 9.4.4 Observar periódicamente las plantas y agregar a las bolsas solución nutritiva (diluída 1:4), si es necesario. La aparición de nódulos puede ser evidente después de 2 semanas de inoculadas las semillas, pero se debe esperar 3 semanas para hacer la evaluación final.
- 9.4.5 Incluir dos testigos no inoculados, uno tratado con N (0.57 g de NH_4NO_3 por litro del medio) y uno sin nitrógeno.

9.5 Montaje y manejo de plantas en las jarras de Leonard

La jarra de Leonard es uno de los dispositivos más usados por los rizobiólogos para estudiar la efectividad de las cepas de rizobios. Fue diseñado por L. T. Leonard (1943). Este dispositivo permite hacer un buen control microbiológico, y es útil para controlar la calidad de una cepa o para su autenticación; en ella se demuestra, por ejemplo, si una cepa recomendada ha perdido su capacidad como buena fijadora de nitrógeno. Los resultados obtenidos en el CIAT indican que las jarras de Leonard no son tan adecuadas para la selección de cepas como las macetas o los cilindros con suelo sin esterilizar. Esto se debe a la dificultad de simular en las jarras las condiciones naturales para el desarrollo de los simbioses. Por ejemplo, la competencia entre los rizobios inoculados y los rizobios nativos no ocurre, a pesar de ser éste uno de los aspectos más importantes en la selección de cepas. Además, es difícil mantener en condiciones de acidez la solución nutritiva. Por eso se recomienda que, si hubiera dificultad para montar las instalaciones necesarias para todos los trabajos con rizobios, se considere el uso de macetas o cilindros con suelo antes que el de jarras de Leonard.

9.5.1 Dispositivo

La parte superior de una jarra de Leonard consta de una botella de vidrio (de licor o cerveza) de aproximadamente 600 ml de capacidad, a la que se ha quitado el fondo. Esta operación se hace con una resistencia eléctrica que caliente la parte de la botella por donde ésta se debe partir, e introduciendo luego la botella en agua fría, si es necesario.

La parte inferior de la jarra es un frasco de vidrio de boca ancha con capacidad de 1000 ml, cuyo tamaño permite que la botella invertida encaje en él (Figura 9.3).

En el cuello de la botella invertida se coloca una mecha que permita el ascenso de la solución nutritiva por capilaridad (medio de Norris y Date o de Sandman) hasta la parte superior de la jarra. En el CIAT se han obtenido buenos resultados utilizando una mecha de algodón.

9.5.2 Arena y solución nutritiva

Colocada la mecha, se agregan a la botella invertida de 400 a 500 g de arena de cuarzo o de arena de río lavada.

La calidad de la arena afecta el crecimiento de las plantas. Hay arena que contiene mucho calcio o hierro, elementos que inhiben el crecimiento de las leguminosas.

La arena no debe ser muy fina ni muy gruesa para que suministre suficiente agua por capilaridad, pero evitándose el encharcamiento. Es pues necesario probar los posibles soportes en un ensayo preliminar; en el CIAT se utiliza arena de cuarzo molido.

Se toman 50 kg de la arena elegida, suficientes para montar aproximadamente 100 jarras. Se preparan 2 litros de HCl o de H_2SO_4 diluidos en 5 litros de agua, o se toman 2 litros de ácido muriático.

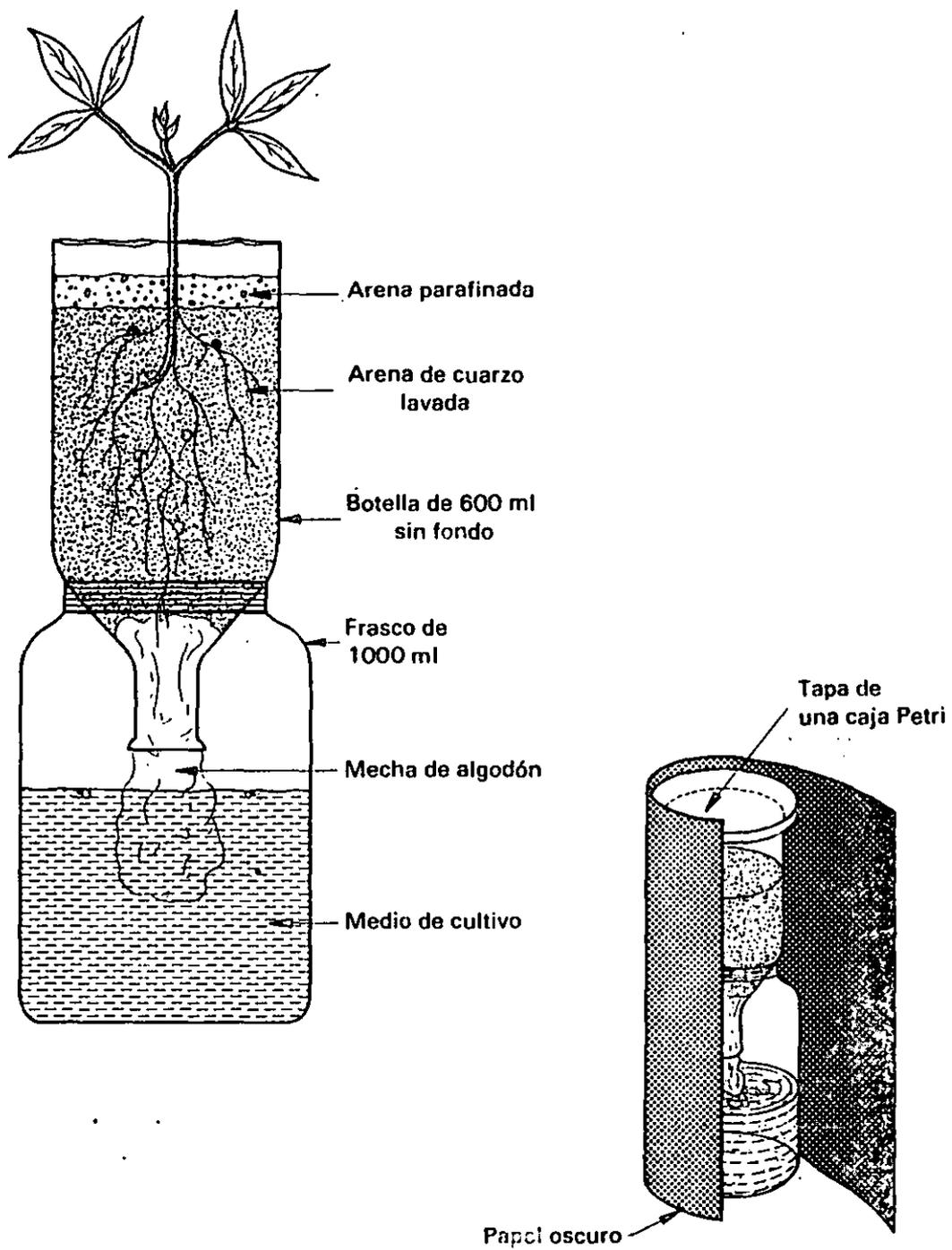


Figura 9.3. Montaje de una jarra de Leonard.

Se procede luego del modo siguiente:

- Colocar la arena en un envase plástico.
- Humedecer la arena.
- Agregar el ácido diluido y completar con agua hasta un nivel que cubra totalmente la arena, y mezclar bien. Dejar reaccionar durante 24 horas.
- Después de 24 horas, introducir una manguera hasta el fondo del envase y dejar que el agua fluya de la manguera y lave la arena hasta que el agua salga cristalina. Asegurarse de que se mezclen bien la arena y el agua durante este proceso.
- Extender la arena para secarla al aire.

Agregar al frasco inferior el medio de Norris y Date, para leguminosas forrajeras tropicales, o el medio de Sandman para frijol.

9.5.3 Esterilización

Tapar la parte superior de la botella con la tapa de una caja Petri o con papel de aluminio, y envolver toda la jarra en papel oscuro, asegurándolo con cinta adhesiva.

Esterilizar todo el dispositivo anterior en el autoclave durante 2 horas. Para ahorrar espacio en el autoclave, se pueden esterilizar separadamente las dos partes de la jarra. La parte inferior con el medio nutritivo se esteriliza en el autoclave con tapa de papel de aluminio, cubriendo la bandeja para evitar que se contamine la parte externa de los frascos. La parte superior se esteriliza colocándola sobre una botella vacía, todo el montaje envuelto en papel oscuro, en un horno a 160 °C. Después de esterilizar se cambia la botella vacía por la parte inferior con el medio estéril, tomando precauciones para evitar la contaminación.

9.5.4 Siembra e inoculación de la semilla

- .1 Preparar las jarras como se indicó anteriormente, y rotular el papel que envuelve la jarra con el nombre o genotipo de la leguminosa que se sembrará en ella, con el número de la cepa, y con la repetición correspondiente.
- .2 Tener preparadas las diferentes cepas que se inocularán en medio de cultivo líquido (LM), es decir, con aproximadamente 2 ó 10 días de crecimiento (según sean cepas de crecimiento rápido o lento). También se puede usar una suspensión de rizobios a partir de cajas Petri (ver 12.1).
- .3 Dos días antes de la siembra, esterilizar la semilla para ponerla a germinar en cajas Petri (ver Sección 9.1); puede ser necesario escarificar las semillas de las leguminosas forrajeras (ver el Capítulo 13). Este proceso se debe hacer tan asépticamente como sea posible para evitar la contaminación. Se siembran sólo las semillas que estén libres de contaminación.
- .4 El mismo día de la siembra, humedecer la arena de las jarras con 200 ml por jarra ya sea medio de Norris y Date para leguminosas forrajeras, o ya de la solución de calcio de Sandman para frijol (9.2.2).
- .5 Ahoyar la arena con una espátula, y colocar una semilla germinada en cada hoyo valiéndose de una pinza estéril; colocar dos semillas grandes, o cuatro pequeñas, en cada jarra.
- .6 Agregar a cada semilla 0.5 ml de inoculante y cubrir las semillas con la arena. Se debe tener la precaución de utilizar elementos y material estériles cuando se trabaja con cada cepa para evitar la contaminación entre las cepas.

- .7 Tapar cada jarra con la tapa de una caja Petri; esta tapa se debe quitar cuando las plantas tengan 2 cm de altura. La superficie de la arena de la jarra se cubre con arena parafinada estéril (13.5).
- .8 Colocar las jarras en un cuarto de crecimiento o en el invernadero.
- .9 Una semana después de la siembra, ralear las plantas de la jarra dejando solamente las mejores (una o dos, dependiendo de la especie de la planta). Se puede inocular después del raleo en vez de hacerlo al momento de la siembra; en tal caso, se inocula cada planta con 0.5 ml de suspensión del cultivo de rizobios, y se agrega la arena parafinada.

El tiempo que toman estos ensayos es de 5 a 8 semanas, durante las cuales se debe revisar, y corregir periódicamente el nivel de la solución nutritiva en cada jarra. El riego se aplica en el frasco inferior con solución de Norris y Date o de Sandman (diluida 1:4), o con agua destilada estéril. Al final del ensayo, se corta la parte aérea de cada planta y se coloca en una bolsa de papel --debidamente rotulada con el número de la cepa, el nombre de la leguminosa, y la repetición a la que pertenece la muestra-- para hacer luego el análisis de su peso seco.

Las raíces se separan con mucho cuidado de la mecha de algodón y se colocan en bolsas plásticas rotuladas. Se cuentan los nódulos, y se determina su peso seco y el peso seco de toda la raíz según las necesidades del ensayo.

El diseño experimental recomendado para este tipo de ensayo es completamente al azar o el de bloques al azar con cinco repeticiones; se necesita incluir en él dos testigos: uno sin inocular y sin N, y otro con N. Para fertilizar con nitrógeno, se agregan 0.75 g de KNO_3 o 0.57 g de NH_4NO_3 por litro de solución nutritiva, aunque la fuente y cantidad necesaria de nitrógeno puede variar entre especies y ecotipos de leguminosas. Además, una pequeña cantidad de nitrógeno 'iniciador' aplicada a los tratamientos inoculados puede estimular el crecimiento de las plántulas y la nodulación.



La infección y formación de nódulos en las raíces de una leguminosa es el único criterio confiable para diferenciar los rizobios de otros microorganismos del suelo. Cuando se requiere hacer un recuento de los rizobios presentes en una muestra que contenga varios tipos de microorganismos --inoculante preparado con turba no esterilizada, por ejemplo, o muestras de suelo-- es necesario contar los rizobios indirectamente por los nódulos formados en plantas estériles de una leguminosa. La leguminosa que se usa más frecuentemente para hacer recuentos del grupo de rizobios que nodula en las leguminosas forrajeras es 'Siratro', un cultivar mejorado de Macroptilium atropurpureum, por su habilidad de nodular con un rango amplio de cepas de rizobios de crecimiento lento. Para recuentos de R. leguminosarum biovar. phaseoli se usa el frijol común (Phaseolus vulgaris) porque no se conoce una leguminosa de semilla pequeña que nodule con estos rizobios. Es necesario comprobar que el sistema NMP usado es confiable; para hacerlo, se comparan los resultados obtenidos con los dos métodos (NMP y cajas Petri), empleando diluciones de un cultivo puro.

10.1 Procedimiento

Preparar, para cada recuento, una serie de seis o más diluciones 1/10 de la muestra e inocular cuatro plantas con cada una de estas diluciones; habrá en total, 24 tubos con Siratro o 24 bolsas de crecimiento con frijol u otra leguminosa, preparados según la explicación dada en el Capítulo 9. Es preferible hacer tres repeticiones de cada tratamiento, es decir, preparar series de diluciones a partir de tres muestras ya sea de semilla inoculada, de inoculante o de suelo.

Se hacen diluciones para cada muestra según la explicación que se dará para el Recuento en cajas Petri (Capítulo 11), y se inoculan, con 4 alícuotas de 1 ml de la suspensión, 4 tubos con Siratro o 4 bolsas con frijol. Si se emplean tres repeticiones de la muestra, se necesitarán 3 repeticiones x 6 diluciones x 4 tubos

(o bolsas), es decir, un total de 72 tubos o bolsas; además, y según el número de diluciones, se necesitan 18 o más tubos con diluyente (peptona al 0.1% con 0.1 ml de Tween-40 por litro de solución) para las diluciones. Si no se cuenta con suficientes tubos, se hace solamente una repetición; sin embargo, este procedimiento abreviado no permite estimar la variabilidad entre las muestras. Después de tres a cuatro semanas de crecimiento, se evalúa la nodulación (presencia o ausencia de nódulos en la raíz de cada planta) y se utiliza la tabla de NMP (Cuadro 10.1) para calcular el NMP de rizobios por semilla o por gramo de suelo (ver ejemplos a continuación).

10.2 Ejemplo 1

Se agregaron muestras de 100 semillas de Pueraria phaseoloides, inoculadas con la cepa 2422 y peletizadas con cal o roca fosfórica, a 100 ml de diluyente. La suspensión de 100 semillas en 100 ml (el volumen inicial) se denominó 10^2 . Se agitó muy bien, y luego se agregó 1 ml de esta suspensión a 9 ml de diluyente; esta dilución, la primera con que se inocularon las plantas (1 ml/planta), se denominó 10^3 . Se prepararon así diluciones sucesivas, hasta la 10^9 .

Los resultados obtenidos (presencia o ausencia de nodulación) en las lecturas fueron los siguientes:

Dilución	Cepa 2422 con cal				Dilución	Cepa 2422 con RF			
	en tubo no:					en tubo no:			
	1	2	3	4		1	2	3	4
10^3	+	+	+	+	10^3	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+	10^4	+	+	+	(-)
10^5	+	-	-	-	10^5	+	+	+	+
10^6	-	-	-	-	10^6	+	+	+	+
10^7	+	-	-	-	10^7	+	+	+	+
10^8	-	-	-	-	10^8	+	+	+	+
10^9	-	-	-	-	10^9	-	-	-	-

La tabla de NMP (Cuadro 10.1) muestra los números más probables para 10, 8, 6 ó 4 diluciones (S). En este ejemplo hay 7, por lo que se considera la dilución 10^4 como la dilución 1, y se trabajará con 6 diluciones (S = 6). Es importante incluir siempre una dilución en que todos los tubos sean negativos, y otra donde todos sean positivos.

En el tratamiento con RF, uno de los tubos de dilución 10^4 no noduló, aunque en las cuatro diluciones siguientes sí hubo nodulación; se considera entonces este tubo como positivo.¹ Por tanto, de las semillas peletizadas con cal hay 6 tubos positivos, y de las semillas con RF hay 20 tubos.

Consultando el Cuadro 10.1, en la columna S = 6, el número de tubos positivos se convierte en los números más probables 5.8, y 1.8×10^4 células para cal y RF, respectivamente, en la primera dilución considerada (10^4).

Se emplea la fórmula:

$$NMP = \frac{m \times d}{v \times n}$$

donde: m = número más probable (por ml) en la primera dilución considerada (10^4);

d = dilución de la primera dilución considerada;

v = volumen inoculado (1 ml);

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

-
1. Las diluciones menores pueden contaminarse mucho con otros microorganismos que a veces inhiben el crecimiento de la planta o la nodulación, o ambos fenómenos, mientras que en las diluciones mayores las plantas nodulan porque hay menos contaminantes; en estos casos se consideran los tubos como positivos.

Cuadro 10.1. Estimación de la cantidad de rizobios.^a

Cantidad de rizobios (m, ver fórmula) estimada según el recuento de plantas infectadas: diluciones de 1/10 (A = 10).^{*}

Tubos positivos		Etapas de la dilución(es)			
n = 4	n = 2	s = 10			
40	20	>7 × 10 ⁸			
39					
38	19	6,9			
37		3,4			
36	18	1,8			
35		1,0			
34	17	5,9 × 10 ⁷			
33		3,1			
32	16	1,7	s = 8		
31		1,0	>7 × 10 ⁶		
30	15	5,8 × 10 ⁶	6,9		
29		3,1	3,4		
28	14	1,7	1,8		
27		1,0	1,0		
26	13	5,8 × 10 ⁵	5,9 × 10 ⁵		
25		3,1	3,1		
24	12	1,7	1,7	s = 6	
23		1,0	1,0	>7 × 10 ⁴	
22	11	5,8 × 10 ⁴	5,8 × 10 ⁴	6,9	
21		3,1	3,1	3,4	
20	10	1,7	1,7	1,8	
19		1,0	1,0	1,0	
18	9	5,8 × 10 ³	5,8 × 10 ³	5,9 × 10 ³	
17		3,1	3,1	3,1	
16	8	1,7	1,7	1,7	s = 4
15		1,0	1,0	1,0	>7 × 10 ²
14	7	5,8 × 10 ²	5,8 × 10 ²	5,8 × 10 ²	6,9
13		3,1	3,1	3,1	3,4
12	6	1,7	1,7	1,7	1,8
11		1,0	1,0	1,0	1,0
10	5	5,8 × 10 ¹	5,8 × 10 ¹	5,8 × 10 ¹	5,9 × 10 ¹
9		3,1	3,1	3,1	3,1
8	4	1,7	1,7	1,7	1,7
7		1,0	1,0	1,0	1,0
6	3	5,8 × 1	5,8 × 1	5,8 × 1	5,8 × 1
5		3,1	3,1	3,1	3,1
4	2	1,7	1,7	1,7	1,7
3		1,0	1,0	1,0	1,0
2	1	0,6	0,6	0,6	0,6
1		<0,6	<0,6	<0,6	<0,6
0	0				
Amplitud aprox.		10 ⁹	10 ⁷	10 ⁵	10 ³

Factor, 95% de los límites de confianza^{**}

(X, ÷): n = 2 6,6
n = 4 3,8

* Cuadro calculado según el cuadro VIII₂ de Fisher y Yates (1963).

** Cochran, Biometrics, 1950, cap. 6, p. 105.

a. Tomado de: Vincent, L. M., 1970.

Sustituyendo los datos:

$$\text{Para cal: } \frac{5.8 \times 10^4}{1 \times 100} = 580 \text{ rizobios/semilla}$$

$$\text{Para RF: } \frac{1.8 \times 10^4 \times 10^4}{1 \times 100} = 1.8 \times 10^6 \text{ rizobios/semilla}$$

10.3 Ejemplo 2

Se hicieron recuentos de R. leguminosarum biovar. phaseoli en un suelo de una finca en Tambo, Depto. del Cauca, Colombia. Se tomaron tres muestras de suelo (repeticiones) y de cada una de ellas, una submuestra de 10 g. Se agregó la submuestra de 10 g a 90 ml de diluyente; este volumen inicial de 100 ml se denominó 10^2 . Un ml de esta solución se agregó a 4 bolsas de crecimiento, y 10 ml se agregaron al siguiente frasco que contenía 90 ml de diluyente; éste se denominó 10^3 , y así se continuó sucesivamente hasta 10^7 .

Los resultados obtenidos en las lecturas fueron los siguientes:

<u>Dilución</u>	Rep. I		Rep. II		Rep. III	
10^2	+ + + +	4	+ + + +	4	+ + (-) +	4
10^3	+ + - +	3	+ + + +	4	+ + + +	4
10^4	+ - + +	3	- + + +	3	+ + + -	3
10^5	+ - + -	2	- - + -	1	+ - - +	2
10^6	- - - -	0	- + - -	1	+ - - -	1
10^7	- - - -	0	- - - -	0	- - - -	0
Total		12		13		14

Según la tabla de NPM, los números de rizobios/ml de la dilución 10^2 son 1.7×10^2 , 3.1×10^2 , y 5.8×10^2 para las tres repeticiones, respectivamente.

Se emplea la fórmula:

$$NMP = \frac{m \times d}{v \times n}$$

y en ella se sustituyen los datos:

$$\text{Rep. I: } \frac{1.7 \times 10^2 \times 10^2}{1 \times 10 \text{ g}} = 1.7 \times 10^3/\text{g}$$

$$\text{Rep. II: } \frac{3.0 \times 10^2 \times 10^2}{1 \times 10 \text{ g}} = 3.1 \times 10^3/\text{g}$$

$$\text{Rep. III: } \frac{5.8 \times 10^2 \times 10^2}{1 \times 10 \text{ g}} = 5.8 \times 10^3/\text{g}$$

Por lo tanto, para el suelo de esta finca: Promedio y desviación estándar = $3.5 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$ células de R. leguminosarum biovar. phaseoli/g de suelo.

11. RECuento DE RIZOBIOs VIABLEs EN CAJAS PETRI

El propósito de este recuento es asegurarse de que las células de rizobios presentes en los inoculantes y en las semillas peletizadas que se emplean en los ensayos de evaluación agronómica de la simbiosis, se hallen en número suficiente para producir una buena infección de las raíces. En caso de que falle alguno de los tratamientos inoculados en los ensayos, esta información servirá para confirmar que la falla no se debió a un bajo número de rizobios, sino a la mala adaptación de la cepa a las condiciones locales o a la falta de compatibilidad entre la leguminosa y la cepa utilizada.

Se deben hacer recuentos en las semillas inoculadas poco antes de sembrarlas. Es aconsejable obtener los inoculantes con suficiente anticipación para hacer un recuento que permita detectar los de mala calidad y descartarlos del ensayo. El método de cajas Petri sólo se puede usar con inoculantes en soporte estéril, es decir, con muestras que están prácticamente sin contaminantes; si la muestra los contiene, se debe emplear el método del número más probable (ver Capítulo 10).

11.1 Recomendaciones para hacer las diluciones

- 11.1.1 Asegurar una dispersión homogénea de las células de rizobios, introduciendo perlas de vidrio en las botellas y en los tubos de dilución, y agregando dispersantes en las soluciones. Se agita muy bien cada muestra antes de hacer la dilución siguiente, si es posible, usando un agitador eléctrico (Vortex) para tubos.
- 11.1.2 Evitar la muerte o la multiplicación de las células en la solución de las diluciones, haciendo la serie de diluciones y sembrando las cajas de los tratamientos de una misma repetición tan rápidamente como sea posible.
- 11.1.3 Mantener buenas condiciones de asepsia empleando material estéril, mecheros, alcohol y, si es posible, una cámara de aislamiento de flujo laminar o una construida según las

instrucciones de NIFTAL (ver Anexo I). El uso de una lámpara de luz ultravioleta durante la noche puede reducir bastante la contaminación en el laboratorio.

11.1.4 Utilizar solución de peptona al 0.1% para hacer las diluciones, y como dispersante Tween-40 (0.1 ml por litro de la solución de dilución) o Calgon (hexametáfosfato de sodio) al 1.0%. Los volúmenes utilizados (100, 99, 9 o 0.9 ml) deben ser exactos; por consiguiente, es preferible distribuir la solución de las diluciones a los tubos o botellas ya esterilizados en autoclave, usando una jeringa distribuidora estéril. Para los recuentos en semillas inoculadas, el volumen de la primera dilución es de 100 o 10 ml; para 1 g de suelo, inoculante, etc., es de 99 o 9 ml.

11.1.5 El empleo de pipetas de vidrio para los recuentos se dificulta cuando se usa la cámara de aislamiento diseñada por NIFTAL (Anexo I). Para facilitar el trabajo, se pueden emplear pipetas automáticas (que tienen nombres comerciales como 'Gilson' o 'Eppendorf'), con puntas estériles, de capacidad para 1.0 y 0.1 ml. Cuando se trabaja con pipetas automáticas, se pueden emplear, para hacer las diluciones, tubos plásticos para microcentrífuga esterilizables en autoclave del tipo 'Eppendorf' (con 0.9 ml de solución diluyente), en vez de tubos de vidrio con tapa roscada (con 9.0 ml de solución diluyente). Para el empleo de tubos Eppendorf es indispensable un agitador eléctrico para tubos (ver punto 11.2.5).

11.1.6 Para hacer la siembra en las cajas Petri, conviene disponer de 5 a 10 rastrillos de vidrio, que se esterilizan quemándolos con alcohol y dejándolos enfriar algunos minutos antes de utilizarlos.

11.2 Procedimientos para el recuento de muestras tanto de semilla peletizada como de inoculante

11.2.1 Antes de empezar el recuento, es necesario definir las diluciones que se sembrarán, según el tipo de muestra: para inoculantes se

usan generalmente las diluciones 10^4 a 10^8 , y para semillas, 10^2 a 10^6 . Antes de empezar se deben marcar todos los tubos de las diluciones y las cajas Petri con la fecha, el tratamiento, y la repetición, y se organizan luego en el orden en que serán usados.

- 11.2.2 De las semillas peletizadas se toman tres muestras de 10 o 20 semillas (una muestra de cada repetición) evitando la contaminación entre tratamientos; de los inoculantes se usan tres muestras de 1 g cada una. Se agrega una muestra por tratamiento en una botella con 100 o 99 ml de solución de dilución para semillas e inoculante respectivamente. Se agitan las botellas durante 10 minutos aproximadamente para desprender del todo el recubrimiento de las semillas y separar las células unas de otras. Esta suspensión se denomina 10^2 . En caso de utilizar 10 o 9 ml para la primera dilución, se denomina 10^1 .

Es importante separar el trabajo por repeticiones y no por tratamientos, especialmente cuando hay muchos tratamientos. Si se emplean de 3 a 5 horas para hacer ese trabajo, el número de rizobios puede cambiar con el tiempo en las diluciones. Es necesario entonces sembrar primero toda la repetición I, luego la repetición II, y así sucesivamente.

- 11.2.3 Ejemplo de una serie de diluciones usando pipetas de vidrio (1 ml) graduadas.

- 1 De cada suspensión 10^2 se toma 1 ml con una pipeta (No. 1), y se diluye en 9 ml de solución diluyente; se obtiene así una dilución 1×10^3 . De la dilución 10^2 se agrega, con la misma pipeta, 0.1 ml sobre la superficie de una caja Petri, distribuyendo muy bien esas gotas con un rastrillo esterilizado previamente con alcohol y flameado. Se desecha ahora la pipeta No. 1.

- .2 Utilizando un agitador eléctrico para tubos, si se dispone de él, se mezcla muy bien la dilución 10^3 . Con una pipeta (No. 2) limpia se pasa 1 ml de esta dilución a un tubo que contiene 9 ml de solución diluyente. Se obtiene así una dilución 10^4 . Con la misma pipeta No. 2, se agrega 0.1 ml de la dilución 10^3 a una caja Petri, y se rastrillan esas gotas.
- .3 Se continúa así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^6 (Cuadro 11.1), tomando siempre 1 ml de la solución anterior con una pipeta nueva y pasándolo a tubos con 9 ml de solución diluyente, y luego, con la misma pipeta, pasando 0.1 ml de la última dilución a la caja Petri (Figura 11.1).

11.2.4 Un sistema alternativo es hacer la serie de diluciones en la misma forma, pero sin pasar 0.1 ml de las diluciones a las cajas Petri. Cuando ya esté lista esa serie, se agrega con una pipeta 0.1 ml de la última dilución a una caja Petri; se puede usar entonces la misma pipeta para distribuir las alícuotas de 0.1 ml de las otras diluciones, siempre y cuando se haga, en la secuencia, desde la dilución más alta hasta la más baja (concentrada).

11.2.5 Cuando se utilizan pipetas automáticas, y un volumen de 9 ml para hacer las diluciones, se emplea la pipeta de 1.0 ml de capacidad (con puntas azules) para las diluciones, y se cambia por la otra de capacidad 0.1 ml (con puntas amarillas) para distribuir las alícuotas en las cajas Petri. Si se utilizan tubos 'Eppendorf' de 0.9 ml para las diluciones, se puede hacer todo el trabajo con la pipeta de capacidad 0.1 ml. Sin embargo, por su tamaño tan reducido, es indispensable mezclar las diluciones hechas en tubos Eppendorf con un agitador 'Vortex'.

11.2.6 Para reconocer fácilmente las colonias de las cepas de rizobios en los recuentos, se recomienda también hacer resiembras con rastrillo de algunas diluciones (10^5 a 10^8) de una asa de un cultivo puro de cada cepa (ver 3.8).

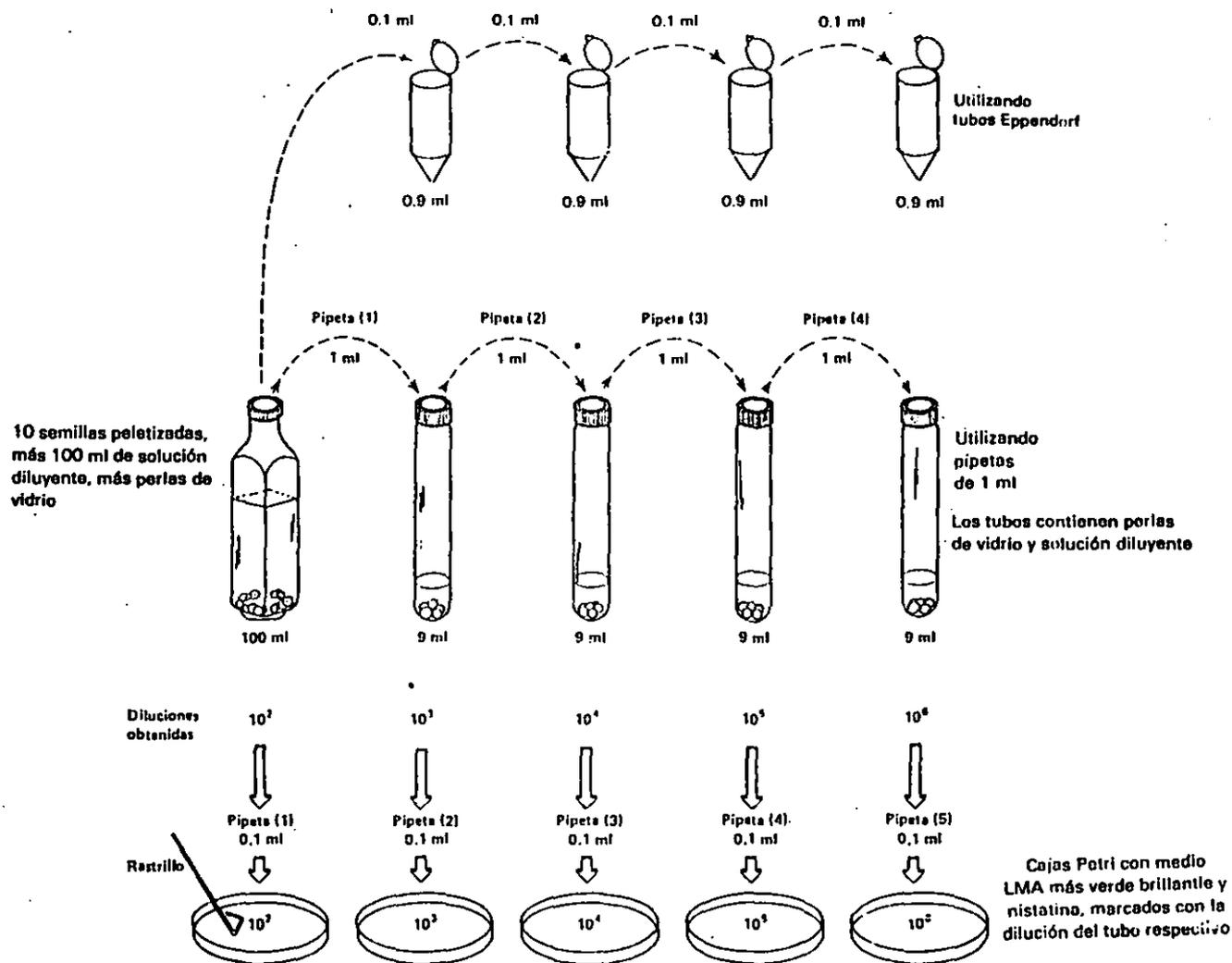


Figura 11.1 Esquema de las diluciones y de la siembra, en un recuento de células de rizobios en cajas Petri.

Cuadro 11.1 Ejemplo de obtención de diluciones para el recuento de rizobios en un inoculante sembrando diluciones de 10^4 a 10^8 , usando pipetas de vidrio de 1 ml, graduadas.

Operación	Volumen del diluyente (ml)	Dilución obtenida
Agregar: 1 g de inoculante. Agitar 10 minutos.	99	10^2
Usar la pipeta No. 1 para tomar 1 ml de la botella 10^2 , y pasarlo al tubo 10^3 ; agitar el tubo 10^3 .	9	10^3
Usar la pipeta No. 2 para tomar 1 ml del tubo 10^3 , y pasarlo al tubo 10^4 ; agitar el tubo 10^4 .	9	10^4
Usar la pipeta No. 3 para tomar 1 ml del tubo 10^4 , y pasarlo al tubo 10^5 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^4 y pasarlo a la caja Petri; agitar el tubo 10^5 .	9	10^5
Usar la pipeta No. 4 para tomar 1 ml del tubo 10^5 , y pasarlo al tubo 10^6 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^5 y pasarlo a la caja Petri; agitar el tubo 10^6 .	9	10^6
Usar la pipeta No. 5 para tomar 1 ml de tubo 10^6 y pasarlo al tubo 10^7 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^6 y pasarlo a la caja Petri; agitar el tubo 10^7 .	9	10^7
Usar la pipeta No. 6 para tomar 1 ml del tubo 10^7 , y pasarlo al tubo 10^8 ; usarla además para tomar 0.1 ml de 10^7 y pasarlo a la caja Petri; agitar el tubo 10^8 .	9	10^8
Usar la pipeta No. 7 para tomar 0.1 ml de 10^8 y pasarlo a la caja Petri.		

11.2.7 Se debe colocar las cajas en posición invertida, e incubarlas a temperaturas entre 26 y 28 °C. Para las cepas de crecimiento lento se hacen recuentos desde el sexto hasta el décimo día, y para las cepas de crecimiento rápido, desde el segundo hasta el quinto día. Puede haber variabilidad entre colonias de la misma cepa, pero por comparación con las cepas puras se pueden reconocer las colonias fácilmente. Las colonias contadas se señalan en el fondo de la caja con un marcador de tinta indeleble. Es necesario hacer los recuentos varias veces durante la incubación, porque las colonias que crecen rápidamente pueden unirse con el paso del tiempo, mientras otras demoran más en aparecer.

11.3 Cálculos

Para cada serie de diluciones, se escogen las cajas Petri que tengan entre 30 y 300 colonias. Se multiplica el número de colonias por la dilución, y luego por 10 porque únicamente se puso 0.1 ml de la dilución en cada una de las cajas Petri. Este resultado corresponde al número de células presentes en la muestra de semillas inoculadas o en 1 g de inoculante. Para saber el número de células de rizobios por semilla, se divide este resultado por el número de semillas que había en la muestra. Este cálculo se hace para cada repetición, y después se determinan el promedio y la varianza de los datos obtenidos.

11.3.1 Ejemplo 1: Semillas

No. de colonias en la caja de la dilución $10^4 = 36$

No. de células en 10 semillas = 36×10^5

No. de células/semilla = $\frac{36 \times 10^5}{10 \text{ semillas}} = 36 \times 10^4$ (en una repetición)

11.3.2 Ejemplo 2: Inoculante

Repetición 1:

No. de colonias en la caja de la dilución $10^6 = 85$

$$\text{No. de células en 1 g} = \frac{85 \times 10^6 \times 10}{1 \text{ g}} = 8.5 \times 10^8$$

Repetición 2:

No. de colonias en la caja de la dilución $10^6 = 59$

$$\text{No. de células en 1 g} = \frac{59 \times 10^6 \times 10}{1 \text{ g}} = 5.9 \times 10^8$$

Repetición 3:

No. de colonias en la caja de la dilución $10^5 = 291$

$$\text{No. de células en 1 g} = \frac{291 \times 10^5 \times 10}{1 \text{ g}} = 2.9 \times 10^8$$

$$\text{Células de rizobios por gramo de inoculante} = 5.8 \times 10^8 + 2.3 \times 10^8.$$

PREPARACION DE PEQUEÑAS CANTIDADES DE INOCULANTES A PARTIR DE
CULTIVOS PUROS DE RIZOBIOS EN MEDIO LMA

12.1 Preparación del caldo

12.1.1 Cantidades grandes de caldo se preparan partiendo de cultivos desarrollados en medio LM líquido que pasen las 'pruebas de pureza para cepas de rizobios' (ver Capítulo 6). Para más información sobre producción de cantidades grandes de inoculantes, refiérase a FONAIAP, 1982 y Somasegaran y Hoben, 1985.

12.1.2 Preparación de cantidades pequeñas de caldo:

- .1 Tomar varias colonias¹ de la cepa con el asa de platino y sembrarlas en estrías en tres cajas Petri con medio LMA a pH 5.5, si se trabaja con cepas para leguminosas forrajeras tropicales, o con medio LMA a pH 6.8, si son cepas para otras leguminosas.
- .2 Incubar a 28 °C hasta que la cepa alcance un buen crecimiento, o sea, de 3 a 4 días para rizobios de crecimiento rápido, y de 10 a 15 días para especies de Bradyrhizobium.
- .3 Para preparar el inoculante, se escogen las dos cajas en que haya mayor crecimiento de los rizobios; antes de desprender éstos de las cajas Petri, se recomienda examinar las colonias y, si hay dudas, examinar el cultivo directamente al microscopio, para verificar que no esté contaminado (ver Capítulo 6).

1. Nunca se deben preparar los inoculantes a partir de una sola colonia, porque los rizobios mutan fácilmente; una colonia individual puede haber perdido su habilidad de fijar el nitrógeno. Sin embargo, es necesario asegurar la pureza de las cepas sembrándolas de colonias individuales (ver Capítulos 3, 5 y 6).

- .4 Para cada inoculante, tener preparados 20 ml de medio de cultivo líquido esterilizado (LM líquido) en un Erlenmeyer de 50 ml.
- .5 Verter en cada caja un poco del medio líquido, y despegar con el asa todas las colonias de rizobios que hayan crecido.
- .6 Homogeneizar el líquido, y devolverlo al mismo Erlenmeyer con una pipeta Pasteur. Tapar el frasco con cuidado para evitar la contaminación.
- .7 Poner a agitar el Erlenmeyer para homogeneizar el caldo; éste se debe mezclar el mismo día con la turba.

12.2 Preparación de inoculantes en turba estéril

12.2.1 Se pueden obtener paquetes de turba esterilizada mediante radiación gamma del Agricultural Laboratories PTY Ltd.²

También se puede esterilizar algunos tipos de turba en el autoclave, empacada en bolsas de polietileno de alta densidad. Estas bolsas (grosor 5/100) se pueden solicitar a Socoplast³, y las hay en algunos países listas para usar en hornos de microondas. La bolsa se sella previamente con un sellador eléctrico, y se le hace un pequeño orificio para permitir la entrada del vapor en la esterilización.

La turba se esteriliza en autoclave durante una hora diaria tres días consecutivos; así se asegura la eliminación de hongos y bacterias que formen esporas. Para preparar pequeñas cantidades de inoculante que se usen inmediatamente, se puede esterilizar la turba en frascos o tubos de ensayo tapados con algodón.

2. Agricultural Laboratories PTY Ltd., 95-99 Carlingford Rd., Sefton, NSW, Australia. Cuando se hacen ensayos colaborativos con el CIAT, éste puede suministrar la turba estéril.

3. Socoplast, 280 Rue Richette, 69400 Villefranche sur Saone, Francia.

Se debe evaluar, durante seis meses, cada fuente de turba esterilizada para determinar el número de rizobios por gramo, y su capacidad para retener el líquido. El proceso de esterilización en el autoclave puede liberar sustancias tóxicas de la turba y alterar su capacidad de retención de líquidos.

12.2.2 Para preparar los inoculantes, se inyecta el caldo directamente en la bolsa plástica de modo que haya 22 ml por cada 50 g de turba australiana. Para otras turbas se determina la cantidad óptima de caldo en ensayos preliminares. Se rotula la bolsa con el número de la cepa, la cantidad de inoculante que contiene, y la fecha de preparación.

12.2.3 Incubar ("madurar") los paquetes a una temperatura entre 25 y 28 °C durante una semana, dejando abiertos los orificios hechos por la aguja para facilitar la respiración de las células. Terminada la maduración, se sellan los orificios con cinta pegante. Se pueden utilizar los inoculantes inmediatamente, o pueden almacenarse hasta 6 meses a 4 °C.

12.2.4 Antes de utilizar el inoculante, se debe evaluar su calidad mediante recuentos de células. En el caso de los inoculantes con soportes estériles, se utiliza el método de recuentos en cajas Petri (ver Capítulo 11).

12.3 Preparación de inoculante en turba no estéril

Aunque es preferible utilizar turba estéril, los inoculantes en turba no estéril también pueden ser muy efectivos. Su calidad depende del control del crecimiento de hongos que se haga mediante la refrigeración. Si no se dispone de una fuente de turba esterilizable, o se desea reducir los costos de producción de los inoculantes, se puede usar turba no estéril. La turba debe seleccionarse previamente por su habilidad para mantener una alta población de rizobios durante seis meses.

Todo el proceso de preparación de inoculantes en turba no estéril se debe realizar fuera de la cámara de siembra, para evitar la contaminación de las áreas estériles del laboratorio.

- 12.3.1 La turba debe estar seca, molida y tamizada en una malla No. 100. El tamaño final de las partículas debe ser de 10 a 50 micras. El inoculante granulado tiene partículas más grandes (malla No. 40).
- 12.3.2 Hacer una mezcla de turba con CaCO_3 si es necesario, para obtener un pH de 6.5. La turba utilizada en el CIAT tiene un pH de 5.5, aproximadamente, y para ajustarla a un pH neutro se agrega CaCO_3 al 5%. Cuando se trabaja con una fuente nueva de turba, se debe evaluar previamente la sobrevivencia de los rizobios en turba mezclada con diferentes niveles de cal.
- 12.3.3 Agregar el caldo a la turba en una proporción aproximada de 1:2. Por ejemplo, se mezclan 10 ml de caldo con 20 g de turba. Las diferentes clases de turba pueden variar en su capacidad de absorber el líquido, por lo que se deben hacer previamente ensayos que determinen la proporción óptima en cada caso.
- 12.3.4 Dejar el inoculante extendido durante 12 horas en un lugar fresco y limpio; si la cantidad preparada es muy poca, se deja durante menos tiempo para evitar que se seque demasiado.
- 12.3.5 Colocar la mezcla en una bolsa de plástico delgado, previamente rotulada con el número de la cepa, la cantidad de inoculante que contiene, y la fecha de preparación. Este tipo de inoculante puede almacenarse hasta 6 meses a 4 °C.
- 12.3.6 Antes de utilizar el inoculante, se debe evaluar su calidad mediante recuentos. Si el inoculante se hizo en turba no estéril, se usa el método de NMP mediante la infección de plantas estériles (ver Capítulo 10).

En la Etapa 1 se hacen evaluaciones en cilindros con suelo sin perturbar, para medir la nodulación y la respuesta al N en diferentes leguminosas y suelos comparando dos tratamientos: 1) sin nitrógeno (-N), y 2) fertilizado con nitrógeno (+N). En la Etapa 2 se aplican tratamientos con inoculación (ver Capítulo 19).

Se sabe que la perturbación del suelo puede causar un aumento en la tasa de mineralización del nitrógeno, con la consiguiente liberación de nitrógeno mineral; éste puede inhibir la nodulación (Sylvester-Bradley et al., 1983; Sylvester-Bradley y Mosquera, 1985) y, para evitar ese efecto, se usa suelo sin perturbar. Esta metodología se emplea en el CIAT para evaluar la efectividad de la simbiosis de leguminosas forrajeras en diferentes suelos, antes de realizar la evaluación en el campo. También se puede adaptar a la evaluación de leguminosas de grano, tomando precauciones para evitar las deficiencias nutricionales, por variaciones tanto del tamaño de los cilindros, como del número de plantas por cilindro y de los niveles de fertilización. Sin embargo, este método no se puede utilizar cuando es necesario incorporar cal al suelo.

13.1 Elección del sitio

El sitio escogido debe hallarse en la sabana o en una pradera de gramínea pura preestablecida que tenga, por lo menos, un año de establecimiento.

13.2 Extracción y preparación de los cilindros

Para extraer el suelo sin perturbar se emplean cilindros de 10 cm de diámetro por 25 cm de largo. Lo más práctico es utilizar trozos de tubería de PVC de 4 pulgadas de diámetro. Estos tubos, que se consiguen en el mercado en tramos de 6 m, tienen diferentes

calidades; se recomienda adquirir los de tipo 'sanitario', cuyas paredes tienen un grosor de aproximadamente 5 mm. De un tubo de 6 m se pueden obtener 23 cilindros de 25 cm de longitud, cuyo borde inferior interno se debe afilar para facilitar su penetración en el suelo (Figura 13.1). Los cilindros se introducen en el suelo a golpes --protegiendo su borde superior con una tabla--¹ hasta aproximadamente 2 cm del borde superior: así se deja espacio para colocar la capa de arena parafinada que se describirá más adelante. Los cilindros se extraen luego con la ayuda de una pala, o se pueden dejar enterrados en cada sitio hasta cuando se monte el ensayo, para conservarlos bajo condiciones naturales. Si el suelo está demasiado duro para enterrar los cilindros, se puede regar previamente con agua limpia, cuidando que ésta se distribuya uniformemente en el área que se muestrea. Es aconsejable enterrar los cilindros en hileras, y no pisar las áreas de muestreo.

Para transportar los cilindros se deben construir guacales especiales de madera, con capacidad para 15 a 20 cilindros cada uno, ya que el peso de un número mayor de cilindros dificulta su manejo.

Cada cilindro representa un área muy localizada; por consiguiente, no hay un efecto homogeneizador como el que ocurre en los trabajos con macetas en los cuales se mezcla el suelo antes de distribuirlo en los macetas. Por este motivo, puede ser necesario hacer un número mayor de repeticiones.

Antes de establecer el ensayo se debe eliminar la maleza de la superficie del cilindro evitando, en lo posible, disturbar el suelo; luego se pesa cada cilindro, y se determina el contenido de humedad del suelo de algunos de ellos (ver 13.4). Los cilindros se dividen en grupos según determinados rangos de peso, cada uno de los cuales corresponde a un bloque o repetición del ensayo (ver 13.4).

-
1. También se ha empleado con éxito un tubo metálico con el borde inferior afilado, en el que cabe exactamente el cilindro de PVC; así se protege más el cilindro de los golpes. (R. Cantarutti, CEPLAC, Brasil. Comunicación personal.)

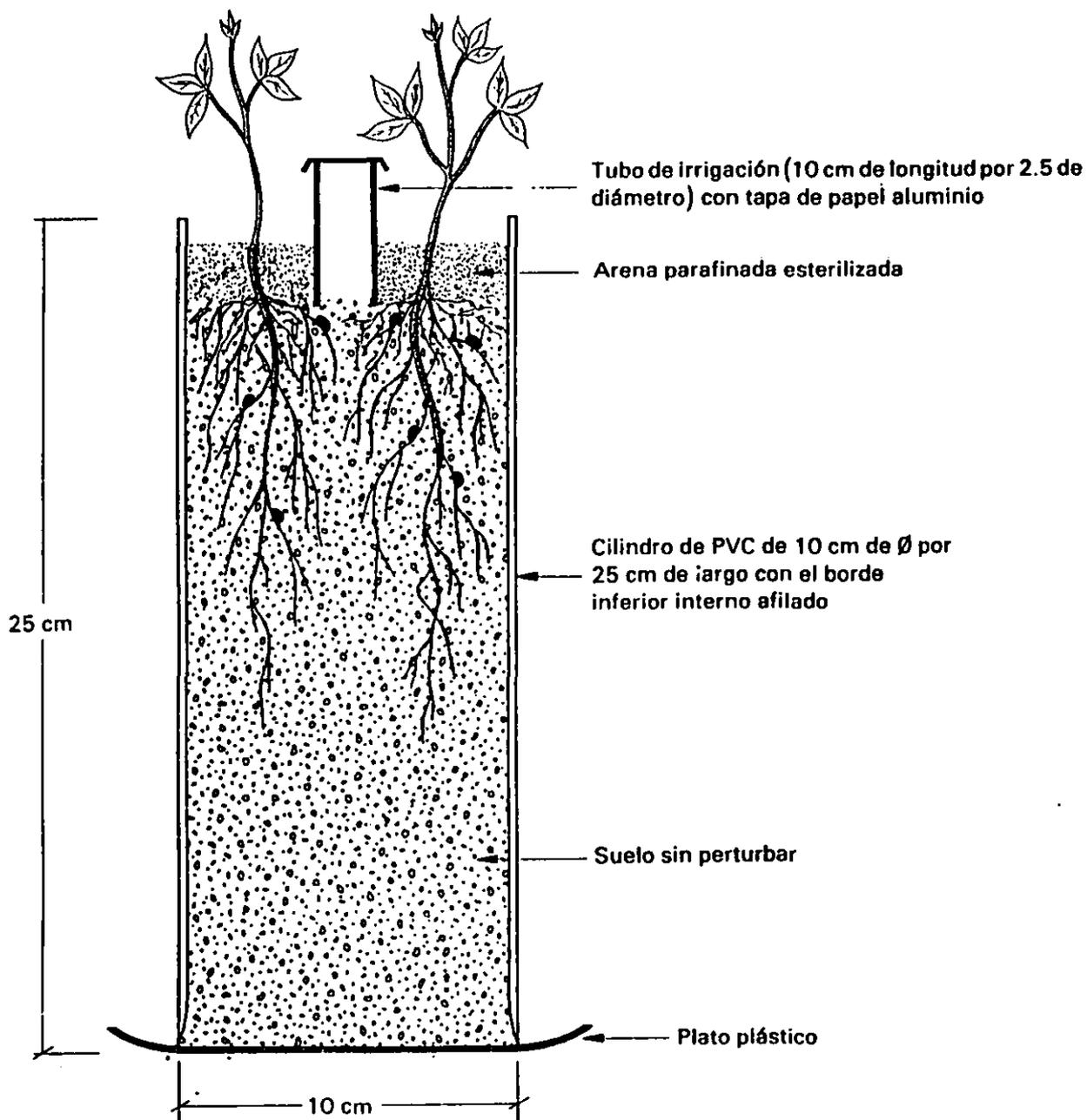


Figura 13.1. Cilindro con suelo sin perturbar.

Se emplea un diseño experimental de bloques al azar. Para evitar la contaminación antes de la siembra, se deben cubrir los cilindros con platos o de alguna otra manera.

13.3 Fertilización

Es importante que los niveles de nutrimentos aplicados a los cilindros sean suficientes para alcanzar las concentraciones adecuadas de los elementos nutritivos en el tejido foliar. En los cilindros, y en las macetas, el desarrollo de las raíces es restringido; por lo tanto, puede ser necesario aplicar niveles mayores de nutrimentos que los requeridos en el campo. Por ejemplo, en cilindros con suelo de Carimagua, es necesario aplicar 100-200 kg de P por hectárea para alcanzar los mismos niveles de fósforo en el tejido que se obtienen en el campo con 20 kg/ha; es necesario aplicar también niveles mayores de K, Ca, Mg y S (CIAT, 1985). Con estas tasas de fertilización, y por la alta concentración de los nutrimentos aplicados a la superficie del suelo de los cilindros, pueden presentarse problemas de toxicidad por cloro o por sodio; se recomienda entonces evitar las fuentes que contengan estos elementos y fraccionar la fertilización en dos partes, por lo menos. Puede ser necesario hacer un ensayo preliminar para conocer los niveles de nutrimentos adecuados para las plantas en estudio, analizando el tejido foliar al final del ensayo. Una buena guía son los niveles críticos determinados y publicados en el Informe Anual de Pastos Tropicales del CIAT por la Sección de Nutrición de Plantas (CIAT, 1981) que se presentan en el Cuadro 13.1.

En el Cuadro 13.2 aparecen los niveles de fertilización que el Programa de Pastos Tropicales del CIAT usa en los cilindros de suelo de Carimagua sin perturbar (suelo ácido), para hacer la evaluación de los rizobios. El diámetro interno de esos tubos era de 10.6 cm, y la superficie del suelo, por tanto, era igual a $\pi r^2 = 88.3 \text{ cm}^2$. El diámetro de los tubos que provienen de lotes de producción diferentes puede variar un poco; por ello, se

Cuadro 13.1. Niveles críticos de P, Ca y K en el tejido foliar de algunas leguminosas forrajeras tropicales.

Especie de leguminosa	P (%)	Ca (%)	K (%)
C. <u>macrocarpum</u>	0.16	0.72	1.24
S. <u>capitata</u>	0.18	0.73	1.18
P. <u>phaseoloides</u>	0.22	1.04	1.22
D. <u>ovalifolium</u>	0.10	0.74	1.03

debe medir siempre el diámetro de los tubos adquiridos y calcular la fertilización según el área superficial del suelo en cada tipo de cilindro con que se trabaje.

Los nutrimentos se agregan poco antes de la siembra. En la primera aplicación de los fertilizantes semi-insolubles [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , flor de azufre, MgO] pesados para todos los cilindros, se mezclan con suelo seco y molido, hasta completar un volumen total de 5 ml por cilindro en una probeta. Usando una tara, se distribuyen 5 ml en la superficie de cada cilindro, y se mezcla ligeramente. Las fuentes solubles se aplican disueltas en agua. La cantidad de agua no debe superar el peso húmedo final calculado por cilindro o bloque (ver 13.4). Se aplica el nitrógeno, y la segunda dosis de P y K, disueltos en agua y a través del tubo de irrigación.

13.4 Cálculo y manejo del riego en los ensayos con cilindros

Para dar un suministro adecuado de agua a las plantas, evitando el encharcamiento, es necesario conocer la capacidad de campo del suelo, y mantener la humedad del suelo en ese nivel durante todo el

Cuadro 13.2. Niveles de fertilización usados en cilindros con suelo no perturbado de Carimagua (área de la base o tapa del cilindro: 88.3 cm²).

Elemento nutricional		Fórmula o nombre	Fuente		Peso molecular	Peso del elemento en la molécula
Símbolo	Cantidad (kg/ha)		(kg/ha)	Cantidad (mg/cilindro)		
P*	50x2	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	204x2	180x2	252	62
Ca**	128	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	-	-	-	-
	64	CaCO ₃	160	141	100	40
K*	30x2	K ₂ SO ₄	67x2	59x2	174	78
S***	60	K ₂ SO ₄	-	-	-	32
		32.5	Flor de azufre	38.2	33.7	(85% S)
		2.95	Fuentes de Zn y Cu	-	-	-
Mg	40	MgO	67	59	40	24
Zn	5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22	19.4	287	65
Cu	1	CuSO ₄ anhidro	2.51	2.22	160	64
B	0.5	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	4.3	3.8	382	44
Mo	0.4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.01	0.89	242	96
N****	30x5	Urea	65.2x5	58.2x5	(46% N)	-

* Aplicar el Ca(H₂PO₄)₂·H₂O y el K₂SO₄ en 2 adiciones de 180 y 59 mg/cilindro, respectivamente, a las 0 y 6 semanas.

** Aplicar 128 kg de Ca por hectárea, parte en el Ca(H₂PO₄)₂·H₂O y parte en el CaCO₃.

*** Aplicar el S con las fuentes de K (24.64 kg/ha), de Zn (2.45), de Cu (0.5) y en la flor de azufre (32.5 kg/ha).

**** Aplicar 5 veces solamente en los tratamientos que llevan 150 kg de N por hectárea.

ensayo². El exceso de agua puede ser tan perjudicial para el crecimiento de las plantas como su deficiencia. Se puede estimar la capacidad de campo muestreando el suelo un día después de una lluvia fuerte.

Para regar correctamente los cilindros, es necesario seguir el procedimiento que se describe a continuación.

13.4.1 Determinación del porcentaje de humedad inicial del suelo

Se toman de 3 a 5 cilindros y se vierte su contenido, mezclándolo bien. Se toman muestras de 100 g de suelo cada una, y se secan en la estufa a 120 °C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se pesan para conocer su porcentaje de humedad.

Ejemplo

Pesos después de secar:

M ₁	=	75.24 g
M ₂	=	92.20 g
M ₃	=	<u>88.22 g</u>
Total		255.66

Promedio = 85.22 g

Humedad (%) = $\frac{100 \text{ g} - 85.22 \text{ g}}{100} \times 100 = 14.78\%$ (del peso húmedo)

2. Téngase en cuenta que los datos de capacidad de campo determinados en los laboratorios de suelos se expresan como porcentaje del peso seco del suelo, pero cuando se trabaja con cilindros, que contienen diferentes pesos de suelo, se utiliza el porcentaje del peso húmedo del suelo.

13.4.2 Asignación de los bloques

Los demás cilindros se pesan el mismo día en que se toman las muestras usadas para determinar humedad. Cada cilindro se marca con su número de identificación y su peso. Según los pesos, los cilindros se dividen en grupos; cada grupo representa un rango de peso, que se considera como repetición o bloque. Se deben eliminar los cilindros que no estén dentro de un rango de peso de 100 g, en cada bloque.

Ejemplo:

Bloque I: 3775 a 3825 g
Bloque II: 3826 a 3875 g
Bloque III: 3876 a 3925 g
Bloque IV: 3926 a 3975 g
Bloque V: 3976 a 4025 g

13.4.3 Cálculo del peso de suelo húmedo final para cada bloque

Los cilindros de PVC que se usan en el CIAT pesan, vacíos, 437 g (490 g con el plato plástico). El peso del suelo húmedo final se calcula tomando el promedio del peso de los cilindros de cada bloque.

Ejemplo

Para el Bloque I:

$3800 \text{ g} - 437 \text{ g} = 3363 \text{ g/cilindro}$, de suelo húmedo = PSH_1
donde: PSH_1 = peso del suelo húmedo, inicial.

Humedad del suelo (medida) = 14.78%

Peso del suelo seco (PSS) = $PSH_1 - \text{Contenido de humedad} =$
 $= 3363 - \left[3363 \times \frac{14.78}{100} \right] = 2866 \text{ g}$

Asumiendo que el contenido de humedad final, que se desea para este suelo con el fin de mantenerlo a la capacidad de campo, es de 20% del peso húmedo, el porcentaje de peso seco deseado es 80% del peso final del suelo húmedo, PSH_f .

Por consiguiente:

$$\text{Peso del suelo seco (PSS)} = PSH_f \times 0.8;$$

$$PSH_f = \frac{PSS}{0.8} = \frac{2866}{0.8} = 3582 \text{ g en el bloque I}$$

13.4.4 Cálculo del peso final de los cilindros (antes de sembrar)

Al valor del peso del suelo final (en capacidad de campo), se suma el peso del cilindro vacío (437 g), para saber el peso final requerido para los cilindros en cada bloque.

$$\begin{aligned} \text{Peso final del cilindro con suelo húmedo} &= \text{Peso final suelo} \\ &\quad \text{húmedo} + \text{peso cilindro} \\ &= 3582 \text{ g} + 437 \text{ g} \\ &= 4019 \text{ g} \\ &= \text{Peso final del cilindro} \\ &\quad \text{(antes de sembrar)} \end{aligned}$$

13.4.5 Riego inicial de los cilindros (antes de sembrar)

Por lo tanto, un cilindro de este Bloque I, que pesó 3800 g cuando se determinó la humedad del suelo, debía regarse con 219 ml de agua. Si el suelo se ha secado después, puede requerir más agua. Todos los cilindros de un bloque se llevan al mismo peso. Sin embargo, cuando hay mucha variabilidad dentro de los bloques, es mejor calcular el peso final de cada cilindro individualmente, que utilizar un solo valor calculado para el promedio del peso de los cilindros de todo el bloque. No se agrega toda el agua a la vez; sólo importa que esté húmeda la superficie del suelo del

cilindro, dejando así suficiente espacio para la solución nutritiva y el agua de riego que se agregan durante la primera semana de crecimiento.

13.4.6 Cálculo de peso final y riego de cilindros sembrados

Una vez sembradas las semillas en los cilindros, se suman al peso final calculado los pesos del plato (53 g), del tubo de irrigación (25 g), de la arena parafinada (65 g), y del suelo usado para la fertilización (5 g), o sea, 148 g. Cada semana se pesan los cilindros, y se agrega agua hasta que se complete el peso final calculado por cilindro sembrado en cada bloque. Por ejemplo, (Bloque I)

$4019 \text{ g} + 148 \text{ g} = 4167 \text{ g}$ (peso final por cilindro sembrado en el bloque I).

13.5 Pregerminación, siembra y raleo

En ensayos con leguminosas forrajeras tropicales, se trabaja con dos plantas por cilindro y cinco repeticiones por tratamiento. No es necesario esterilizar las semillas para estos ensayos. Sin embargo, se recomienda hacer pregerminar las semillas de esas leguminosas en los ensayos de invernadero, porque su germinación es muy variable aunque hayan sido escarificadas. Para escarificarlas, se recomienda utilizar ácido sulfúrico comercial al 45%; el tiempo necesario de escarificación varía con la edad y la condición de las semillas. Los siguientes tiempos sirven como una guía aproximada: se ha encontrado que las semillas de Centrosema spp. necesitan, en promedio; 17 minutos; las de Stylosanthes capitata, 7 minutos (12 minutos, si tienen vaina); las de S. guianensis, 4 a 5 minutos; y las de Pueraria phaseoloides, 2 minutos. También se pueden escarificar las semillas mecánicamente (ver 9.1.5). Las semillas se colocan luego sobre papel de filtro mojado, en cajas Petri, y se incuban durante uno o dos días hasta que comience a aparecer la radícula. No se debe permitir que crezcan mucho las radículas, porque se dañan al sembrarlas. Como alternativa, se pueden sembrar en arena húmeda en bandejas.

Para la siembra, se abren cuatro huecos pequeños en la superficie del suelo de cada cilindro, dejando un espacio en el centro para el tubo de irrigación. En cada hueco se coloca una semilla pregerminada. El cilindro se riega dos veces al día durante la primera semana de crecimiento. Los detalles sobre la inoculación se describen en el punto 19.1.

Cuando las plántulas tengan unos 2 cm de altura, se coloca el tubo de irrigación y la capa de arena parafinada.

Aproximadamente una semana después de agregar la arena parafinada, se ralean las plantas dejando las dos mejores en cada cilindro.

Arena parafinada

La arena parafinada ayuda a mantener una temperatura baja en el suelo, y evita el desecamiento del suelo y el crecimiento de algas en su superficie. Si el ensayo incluye inoculantes, la arena ayuda a evitar la contaminación entre los tratamientos.

Preparación:

Método 1: Disolver 4 g de parafina sólida en 100 ml de benzol. La parafina se disuelve con dificultad; es necesario rallarla y mezclar con un agitador magnético durante varias horas. Mezclar vigorosamente esa solución con 1 kg de arena de cuarzo seca (9.5.2). Una vez evaporado el benzol, esterilizar la arena durante dos horas en un horno a 160 °C, en frascos tapados. Atención! El benzol es carcinogénico y debe usarse con cuidado.

Método 2: Fundir 4 g de parafina sólida (sometiéndola a 90 °C) y agregarla a 1 kg de arena caliente (90 °C), agitando bien. Esterilizar durante 2 horas a 160 °C.

13.6 Fertilización con nitrógeno

La primera aplicación de nitrógeno se hace dos semanas después de la germinación, por el tubo de irrigación. La aplicación de nitrógeno se debe fraccionar; por ejemplo, para aplicar 150 kg de N por hectárea durante un ensayo que durará unos tres meses, se aplica el equivalente de 30 kg/ha cada dos semanas durante las primeras 10 semanas del ensayo, aunque se requieren niveles mayores en algunos casos. Téngase cuidado de no utilizar un volumen de solución tan grande que encharque el suelo, y de agregar un volumen igual de agua a los tratamientos que no reciban nitrógeno.

13.7 Cosecha y análisis

Al finalizar el ensayo, o sea, de 8 a 12 semanas después de la siembra según la especie de leguminosa, se evalúa el peso seco de las plantas, el contenido de N de su parte aérea, y la nodulación --número o peso seco de los nódulos y, opcionalmente, su tamaño, color y distribución (ver Capítulo 17). No es necesario evaluar la nodulación en los tratamientos con N.

Se extraen del cilindro los nódulos con las raíces del modo siguiente: uno o dos días antes de cosechar las plantas, se deja de regar el suelo para facilitar la extracción de las raíces; se golpea entonces el cilindro por fuera con un mazo de madera para que el suelo afloje y salga fácilmente:

En los ensayos de la Etapa 1 se pueden expresar los resultados del rendimiento de nitrógeno de la parte aérea de la planta como la diferencia entre los dos tratamientos, convertidos a porcentaje del rendimiento potencial, es decir, del rendimiento de N en tratamientos con N.

La igualdad que expresa este 'índice de respuesta al N' (IRN) es la siguiente:

$$\text{IRN} = \frac{\text{Rendimiento de N(+N)} - \text{Rendimiento de N(-N)}}{\text{Rendimiento de N(+N)}} \times 100$$

donde (+N) y (-N) representan los tratamientos con N y sin N, respectivamente.

También se analiza el rendimiento de N de las leguminosas en los dos tratamientos por separado, y se ordenan éstas según ese parámetro.

Para conocer la manera de analizar los resultados de la Etapa 2, ver el punto 19.1.4.

(Etapas 1 y 2)

La evaluación de las combinaciones leguminosa-rizobio en el invernadero se puede hacer tanto en cilindros con suelo sin perturbar (Capítulo 13) como en macetas. Este último método es una alternativa cuando por algún motivo se dificulta el uso de cilindros con suelo sin perturbar. Esto ocurre especialmente con leguminosas de grano (por ejemplo, con frijol) que frecuentemente, requieren la incorporación de cal en el suelo.

En los ensayos correspondientes a la Etapa 1, se evalúa la nodulación y la respuesta a la fertilización nitrogenada de varios genotipos de leguminosas, en diferentes suelos; se aplican en ellos, por tanto dos tratamientos: con baja disponibilidad de nitrógeno mineral (-N) y con fertilización nitrogenada (+N). En los ensayos de la Etapa 2 se emplean además tratamientos con inoculación (ver Capítulo 19).

Al hacer la evaluación en macetas, téngase en cuenta que se produce un incremento en la mineralización del nitrógeno cuando el suelo es secado y molido. Aunque el empleo de macetas, en vez de cilindros de suelo sin perturbar, tiene la ventaja de proporcionar un ambiente de crecimiento más homogéneo, es necesario generalmente emplear prácticas especiales para disminuir los niveles de nitrógeno mineral en el suelo.

14.1 Preparación del suelo

La selección de suelos para este tipo de ensayos debe hacerse considerando factores tales como la historia del terreno --los cultivos anteriores pueden afectar considerablemente la población nativa de rizobios-- y el pH del suelo en la zona de interés. El suelo se extrae hasta una profundidad de 20 cm, aproximadamente, desechando antes el material no degradable, tal como trozos grandes de madera, piedras, etc.; luego se seca, se muele (si tiene terrones grandes), y se tamiza con una malla de 1 cm, si se considera necesario. El suelo no debe ser de textura muy fina porque se puede compactar en las macetas.

Se toma una muestra de este suelo para el análisis químico; se mide su pH suspendiendo una muestra en una cantidad igual de agua destilada y haciendo la lectura 60 minutos después. Si es necesario, se agrega cal, pero en ese caso se requiere un período de incubación de dos semanas (ver 14.8). El fertilizante y el suelo para cada maceta se pesan separadamente para reducir así la variabilidad del experimento; los fertilizantes insolubles se mezclan con el suelo en un recipiente limpio o en una bolsa plástica, y luego se llena la maceta con la mezcla.

14.2 Medidas para minimizar el nivel de nitrógeno mineral

Como los métodos de acondicionamiento del suelo producirán probablemente, altos niveles de nitrógeno mineral, se deben tomar medidas especiales con el fin de establecer los tratamientos de baja disponibilidad de nitrógeno. Hay varios modos de rebajar el contenido de nitrógeno del suelo:

- .1 Sembrar una planta no leguminosa antes de la leguminosa que se evaluará, o junto con ella.
- .2 Mezclar con el suelo azúcar, harina de yuca, o algún otro material orgánico de alta relación C:N. En el CIAT se utiliza harina de yuca al 0.4%, pero esta proporción debe determinarse para cada suelo. Recuérdese que estos materiales pueden provocar el desarrollo de hongos patogénicos.
- .3 Regar con abundante agua para lixiviar el nitrógeno mineral. Si el suelo contiene mucha arcilla, es necesario mezclarlo con arena para facilitar el drenaje del agua. Se espera a que el suelo seque antes de empezar el ensayo.

14.3 Fertilización

Puesto que el volumen de suelo de las macetas es limitado, y los métodos usados para disminuir el nitrógeno del suelo pueden rebajar

también la disponibilidad de otros nutrimentos, es necesario agregar a las macetas dosis de fertilizantes mucho mayores que las recomendadas para ensayos de campo; cuando se aumentan tres o cuatro veces las dosis empleadas en el campo, se producen, comúnmente, concentraciones similares de nutrimentos en los tejidos vegetales. Se debe evitar el uso de fuentes de fertilizantes que contengan Na^+ y Cl^- , como se indicó en el Capítulo 13. Un ejemplo de los niveles de fertilización que se emplean en las macetas preparadas con suelo de CIAT-Palmira (suelo fértil y de pH neutro) se muestra en el Cuadro 14.1. En vez de las fuentes individuales de S, Mg y K, se puede utilizar 'sulpomag' --un sulfato de potasio y magnesio-- (2.22 g/maceta).

14.4 Siembra y raleo

En cada maceta, que contiene 2 kg de suelo, se establecen una o dos plantas de leguminosas de grano, como el frijol. Inicialmente se siembra el doble de semillas (dos o cuatro) en el suelo húmedo, y después de una semana, cuando empieza a abrir la primera hoja trifoliada, se ralean las plántulas menos vigorosas, dejando una o dos de tamaño uniforme; para no romper las raíces de éstas, las plantas raleadas se arrancan cuidadosamente o se cortan al nivel del suelo. Un diseño completamente al azar o de bloques al azar con cinco o seis repeticiones es adecuado para hacer este tipo de ensayo en el invernadero.

14.5 Fertilización con nitrógeno

La primera aplicación de nitrógeno se hace al momento del raleo, y se continúa haciendo las demás cada dos semanas. La urea --u otra fuente de nitrógeno-- se disuelve en el agua de riego, y se aplica por fracciones, de manera que la dosis acumulada equivalga a una aplicación de 200 a 300 kg de N/ha. Por ejemplo, si se agregan en cada maceta 130 mg de urea cada 10 días, cinco aplicaciones darían el equivalente de 300 kg de N/ha.

Cuadro 14.1 Niveles de fertilización aplicados a macetas que contienen 2 kg de suelo de CIAT-Palmira.

Elemento nutricional ^a	Fuente del fertilizante	Cantidad	
		De elemento (kg/ha)	De fuente (mg/maceta)
P	Superfosfato triple	400	1990
S	Flor de azufre	240	212
Mg	MgO	160	266
B	Bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	2	18
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	88
K	K_2SO_4	120	268

- a. Los nutrimentos P, S, y Mg se mezclan con el suelo seco antes de llenar las macetas. Los nutrimentos B, Zn, y K se disuelven en agua y se agregan al suelo al momento de la siembra.

14.6 Control de la humedad

Es muy importante que la humedad del suelo se mantenga en un nivel constante y adecuado durante todo el ensayo, ya que ambos extremos --exceso o escasez de humedad-- afectan mucho la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Hay varios métodos para estimar la capacidad de campo de un suelo. Uno de ellos, descrito en el Capítulo 13, consiste en aplicar riego al suelo en el campo, dejarlo drenar durante un día, y medir luego su contenido de humedad. El otro método consiste en llenar con suelo un cilindro transparente de 200 a 300 ml de capacidad provisto de un agujero en el fondo, y agregarle agua del grifo lentamente hasta humedecer unas dos terceras partes del suelo; se espera 24 horas hasta que la humedad alcance un equilibrio, se desechan los 5 cm superficiales de suelo, y se extraen los 5 cm siguientes. Se pesa

este suelo, se seca luego, se pesa de nuevo, y se calcula su contenido de humedad, al cual debe mantenerse el suelo en las macetas.

También se puede estimar la capacidad de campo directamente en las macetas, aunque en éstas el drenaje es pobre y, en consecuencia, se sobreestimaré la capacidad de campo. Por ello se recomienda mantener el contenido de humedad de las macetas al 70% de la capacidad de campo que se estime por este método.

14.7 Cosecha y análisis

Para obtener la máxima información posible de este tipo de ensayo, lo mejor es 'cosechar' las leguminosas de grano durante su floración, período en que la nodulación y la tasa de fijación del nitrógeno alcanzan niveles máximos; además, en ese momento el contenido de nitrógeno está correlacionado generalmente con el que la planta tendrá cuando llegue a su madurez.

En otros casos son de mayor interés las estimaciones ya sea del contenido máximo de nitrógeno durante el período de llenado de las vainas, o ya de la producción de grano a la madurez de la planta. En estos dos períodos del desarrollo de la planta los nódulos están descompuestos, y por eso en ellos no se puede evaluar la nodulación. Por otra parte, las mediciones del rendimiento de grano en un número tan pequeño de plantas son muy variables y, por tanto, poco confiables.

La cosecha se hace cortando los tallos al nivel del suelo, junto al primer nudo. Se puede secar y moler toda la parte aérea de las plantas, o las vainas y el resto del foilaje por separado. Se determina en esas muestras el porcentaje de nitrógeno, y multiplicado por el peso seco se calcula el nitrógeno total. Se pueden expresar los resultados de los ensayos de la Etapa 1 usando el índice de respuesta al N (IRN) (Ver 13.7); los de la Etapa 2, en que hay tratamientos con inoculación de las plantas, se expresan según las indicaciones en el punto 19.1.4.

Las raíces se separan cuidadosamente del suelo, y se lavan con agua corriente en un tamiz. La nodulación se evalúa en los tratamientos de baja disponibilidad de nitrógeno por el número de nódulos, por su masa, o su volumen, y por su color interno (ver Capítulo 17). Las raíces se secan, se pesan, y luego se determina su contenido de nitrógeno, bien sea separadamente o en muestras en que ellas se mezclan con la parte aérea.

14.8 Estimación de la cal necesaria para elevar el pH del suelo¹

14.8.1 Método 1. Incubación con hidróxido de calcio

.1 Preparación de la solución saturada de hidróxido de calcio

Agregar 1 g de óxido de calcio, o 1.5 g de hidróxido de calcio, a 1 litro de agua sometida a vacío para liberar el CO₂ disuelto en ella. Esperar hasta que el exceso de soluto precipite y tomar luego la solución saturada que sobrenada, cuya concentración de Ca será de 0.04 meq/ml, aproximadamente. Esta solución se guarda en un frasco protegido del CO₂ atmosférico, ya que la concentración de Ca en la solución disminuye si se precipita como carbonato.

.2 Procedimiento

Colocar 10 g de suelo en cada uno de 7 vasos (beakers) de 100 ml. Agregar 0, 5, 15, 20, 30, 40 y 50 ml de solución saturada de hidróxido de calcio a los vasos, de modo que haya 0 ml en el vaso 1 y 50 ml en el vaso 7. Agregar luego suficiente agua a los vasos hasta obtener una relación suelo:agua de 1:5. Esperar 3 días y medir el pH de las siete suspensiones.

1. American Society of Agronomy, 1982.

Hacer una gráfica del pH observado contra los miliequivalentes de Ca agregados por 100 g de suelo (1 miliequivalente de Ca = 20 mg). Con esta gráfica se determina la cantidad de calcio necesaria para alcanzar el pH deseado. Con este dato y con la equivalencia de calcio en la fuente de fertilizante que se utilizará, se calcula la dosis que se debe aplicar por maceta, o por hectárea en el campo.

Por ejemplo, un suelo cuya densidad es 1.2 g/cm^3 tiene $2.4 \times 10^9 \text{ g}$ de suelo/ha, considerando sólo 20 cm de profundidad:

$$(10,000 \text{ m}^2/\text{ha} \times 0.2 \text{ m} = 2000 \text{ m}^3/\text{ha} = 2 \times 10^9 \text{ cm}^3/\text{ha}; \\ 2 \times 10^9 \text{ cm}^3/\text{ha} \times 1.2 \text{ g/cm}^3 = 2.4 \times 10^9 \text{ g/ha}).$$

Asumiendo que en ese suelo 20 mg de Ca fueron suficientes para alcanzar el pH deseado, se calcula de la siguiente manera: 20 mg de Ca en 100 g de suelo equivalen a 480 kg Ca/ha (20 mg Ca $\times 2.4 \times 10^9 \text{ g/100 g} = 48 \times 10^7 \text{ mg Ca} = 480 \text{ kg Ca}$); además, en 100 kg de CaCO_3 hay 40 kg de Ca. Por consiguiente, en ese suelo se requieren 1.2 t de cal/ha.

14.8.2 Método 2. Se basa en la acidez intercambiable (aluminio e hidrógeno) de los suelos cuyo pH es menor de 5.4 (Salinas y García, 1985).

.1 Extracción

- a. Preparar una solución de KCl 1N disolviendo 74.56 g de KCl en 500 ml de agua desionizada o destilada; completar con agua hasta un volumen de 1 litro.
- b. Depositar 10 g de suelo seco en un Erlenmeyer de 100 ml.
- c. Añadir 50 ml de KCl 1N.

- d. Agitar durante 30 minutos y filtrar, recibiendo el filtrado en un balón volumétrico de 100 ml.
- e. Lavar el suelo retenido en el filtro con KCl 1N, usando 5 porciones adicionales de 10 ml cada una que se reciben también en el balón; completar el volumen recogido hasta 100 ml con KCl 1N.

.2 Titulación

- a. Transferir 50 ml del extracto anterior a un Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, y agregar 3 gotas de fenolftaleína al 1%.
- b. Titular con NaOH 0.05N hasta que aparezca un color rosado pálido permanente. Anotar el volumen (ml NaOH) empleado en la titulación.

.3 Cálculos

Grado de acidez (meq/100 g suelo) =

$$\text{ml NaOH} \times \text{Normalidad NaOH} \times \frac{100 \text{ g suelo}}{10 \text{ g muestra}} \times \frac{100 \text{ ml extracto}}{50 \text{ ml alicuota}} =$$

$$= \text{ml NaOH} \times 0.05 \times 20$$

por lo tanto, grado de acidez (meq/100 g suelo) = ml NaOH

Requerimiento de Ca (meq/100 g suelo) = 1.5 x grado de acidez
 Esta conversión, sin embargo, depende del cultivo con que se esté trabajando (Cochrane et al., 1980).

Calcular finalmente el requerimiento de cal en kg/ha a partir de meq Ca/100 g suelo de la manera descrita en 14.8.1.2, al final.

15 EVALUACION DE LA SIMBIOSIS LEGUMINOSA FORRAJERA-RIZOBIO

EN EL CAMPO (Etapas 1 y 2)

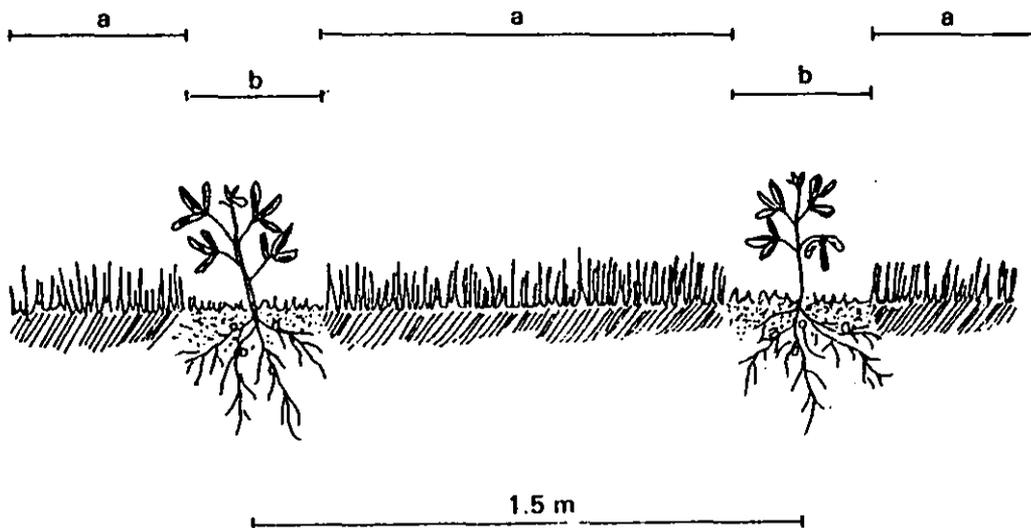
Se ha demostrado que el establecimiento de leguminosas forrajeras mediante la labranza reducida en sabana o en praderas de gramíneas preestablecidas, permite una evaluación confiable de la efectividad de las combinaciones leguminosa-rizobio (Sylvester-Bradley y Mosquera, 1985). La labranza reducida disminuye tanto la tasa de mineralización como la disponibilidad del nitrógeno mineral en el suelo, porque perturba menos el suelo y por la competencia con las gramíneas que crecen entre los surcos de las leguminosas (Figura 15.1). Este sistema de labranza asegura además un buen establecimiento de las leguminosas porque evita que las lluvias arrastren el suelo y las semillas.

En estos ensayos sólo se evalúa la simbiosis hasta el final de la fase de establecimiento. Por eso se facilita la consecución de lotes para hacerlos, porque después del ensayo le queda al propietario de la tierra una pradera con leguminosas introducidas, lista para que inicie el pastoreo.

En los ensayos correspondientes a las Etapas 1 y 2, en que se requiere información sobre el potencial genético de la planta para fijar nitrógeno con las cepas nativas o inoculadas de rizobios, deben mantenerse las plantas en condiciones óptimas de crecimiento; se aplicarán, por tanto, niveles de fertilización adecuados para un buen desarrollo del germoplasma que se evalúa. La evaluación de la simbiosis bajo condiciones de estrés se estudia en la Etapa 3 (Capítulo 20).

15.1 Epoca de siembra

Se debe sembrar en la época en que lo hacen los agricultores de la región.



- a. Gramínea preestablecida o sabana, quemada o guadañada, poco antes de la siembra de la leguminosa.
- b. Surcos de 10 a 40 cm preparados, fertilizados, y sembrados con la leguminosa.

Figura 15.1 Labranza reducida para la evaluación de leguminosas forrajeras tropicales.

15.2 Elección del sitio

Es necesario trabajar con parcelas grandes para cumplir tres objetivos: permitir la toma de muestras grandes, lo que se hace necesario debido a la alta variabilidad en este tipo de experimento, tener suficientes plantas para evaluar la nodulación, y hacer varios cortes en diferentes lugares durante la etapa de establecimiento de las plantas. El área elegida debe tener poca pendiente, debe ser representativa de la región, y en ella no han debido sembrarse antes leguminosas. El área para el ensayo puede estar ubicada en la sabana nativa o en una pradera degradada o preestablecida con una gramínea. Es importante que la gramínea haya sido previamente establecida para evitar que su establecimiento poco uniforme afecte el crecimiento de la leguminosa.

15.3 Diseño experimental

Las parcelas consisten en surcos hechos en una pradera de gramínea, a una distancia de 1.5 m entre uno y otro. Los surcos tienen de 10 a 40 cm de ancho, y quedan separados entre sí por áreas de gramínea sin perturbar.

Se requieren, por lo menos, 12 m lineales de surco por parcela, para hacer dos cortes; cada corte estará compuesto de 3 submuestras de 2 m lineales. Sin embargo, dada la gran variabilidad que se presenta en distancias muy pequeñas durante el establecimiento de las leguminosas forrajeras tropicales, se recomiendan, como mínimo, 18 m lineales de surco por parcela; además, este tamaño permite que los sitios de las submuestras se distribuyan al azar dentro de las parcelas. No es necesario tener en cuenta aquí el efecto de borde, ya que hay una distancia entre los surcos suficientemente grande.

Los surcos y los bloques deben orientarse siempre perpendicularmente a la pendiente del terreno. Si se decide hacer más de dos cortes, se puede aumentar el tamaño de las parcelas de modo que tengan 40 m lineales de surco (Figura 15.2).

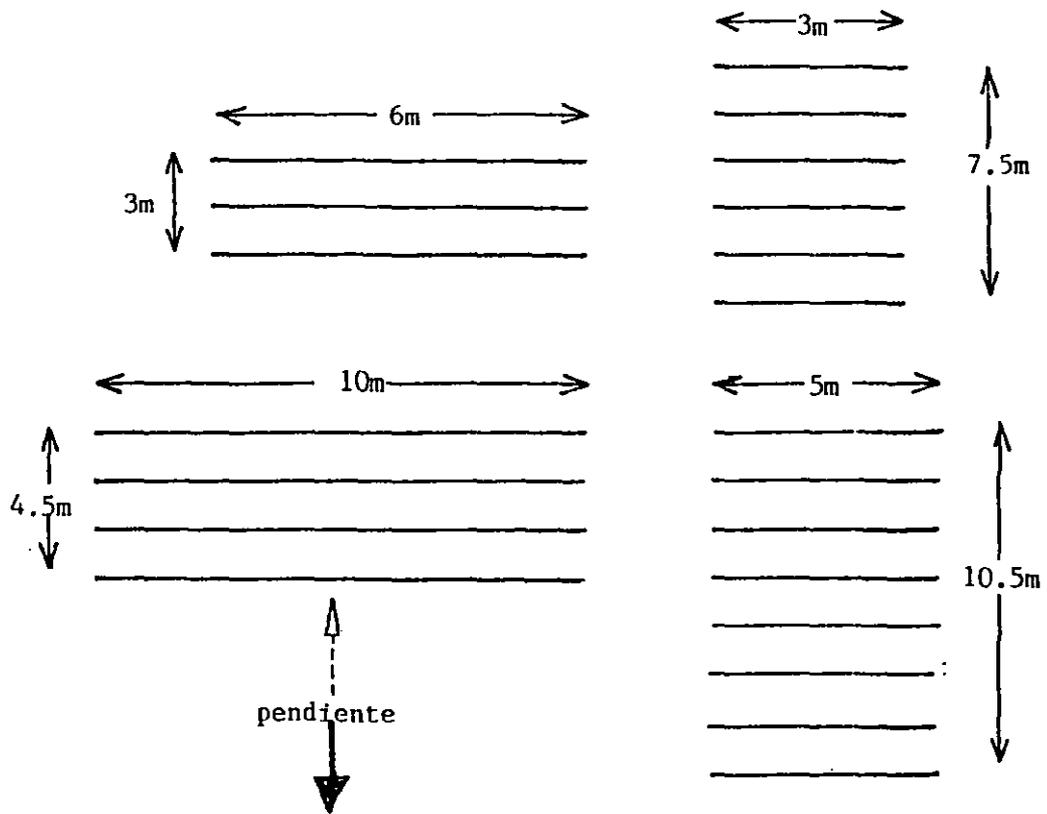


Figura 15.2 Tamaño y orientación de las parcelas en ensayos de campo con leguminosas forrajeras tropicales. (Ejemplo: 18 m lineales para 2 cortes; 40 m lineales para 3 o 4 cortes).

El croquis de la Figura 15.3 muestra un esquema de un ensayo típico de la Etapa 1, con un diseño de parcelas divididas. El diseño de bloques al azar es más preciso, pero requiere un manejo muy cuidadoso de las aplicaciones de nitrógeno. El diseño de los ensayos que se utilizan en la Etapa 2 se describe en el Capítulo 19.

15.4 Preparación del suelo

Se recomienda, al empezar, quemar la sabana o guadañar (cortar) la gramínea para reducir la competencia de ésta con las plántulas de la leguminosa sembrada. Se pueden hacer los surcos con una profundidad de 10 a 15 cm usando un azadón, y asegurándose de que se eliminan las raíces de la gramínea en el área de siembra. También se pueden preparar los surcos con un cultivador, montando un par de escardillos para cada surco, con 40 cm entre ellos, en la primera barra del cultivador, y una pala pequeña en la segunda barra, centrada entre los dos escardillos. Otro arreglo es colocar la pala en la primera barra y los escardillos en la segunda. Puede ser necesario cambiar el sistema de preparación de los surcos en cada sitio, según la maquinaria disponible, y según las características del suelo y de la gramínea asociada; por esto se recomienda ensayar previamente para elegir el mejor método de preparación de los surcos. Obviamente, es importante cercar el área del ensayo antes de la siembra para evitar el ingreso en ella de ganado u otros animales. Puesto que pueden surgir problemas con la preparación de la tierra, es aconsejable hacerla algunos días antes de la fecha de siembra.

15.5 Fertilización

Aplicar el fertilizante en el surco calculando, para cada metro lineal de surco, la cantidad que se necesitaría para 1 m^2 de terreno. En ausencia de recomendaciones específicas sobre el sitio donde se realiza el ensayo, se recomienda aplicar, en g/m de surco, 12.0 de Ca, 2.2 de P, 4.0 de S, 3.3 de K, 2.0 de Mg, 0.5 de Zn, 0.2 de Cu, 0.1 de B y 0.04 de Mo. Incorporar el fertilizante con

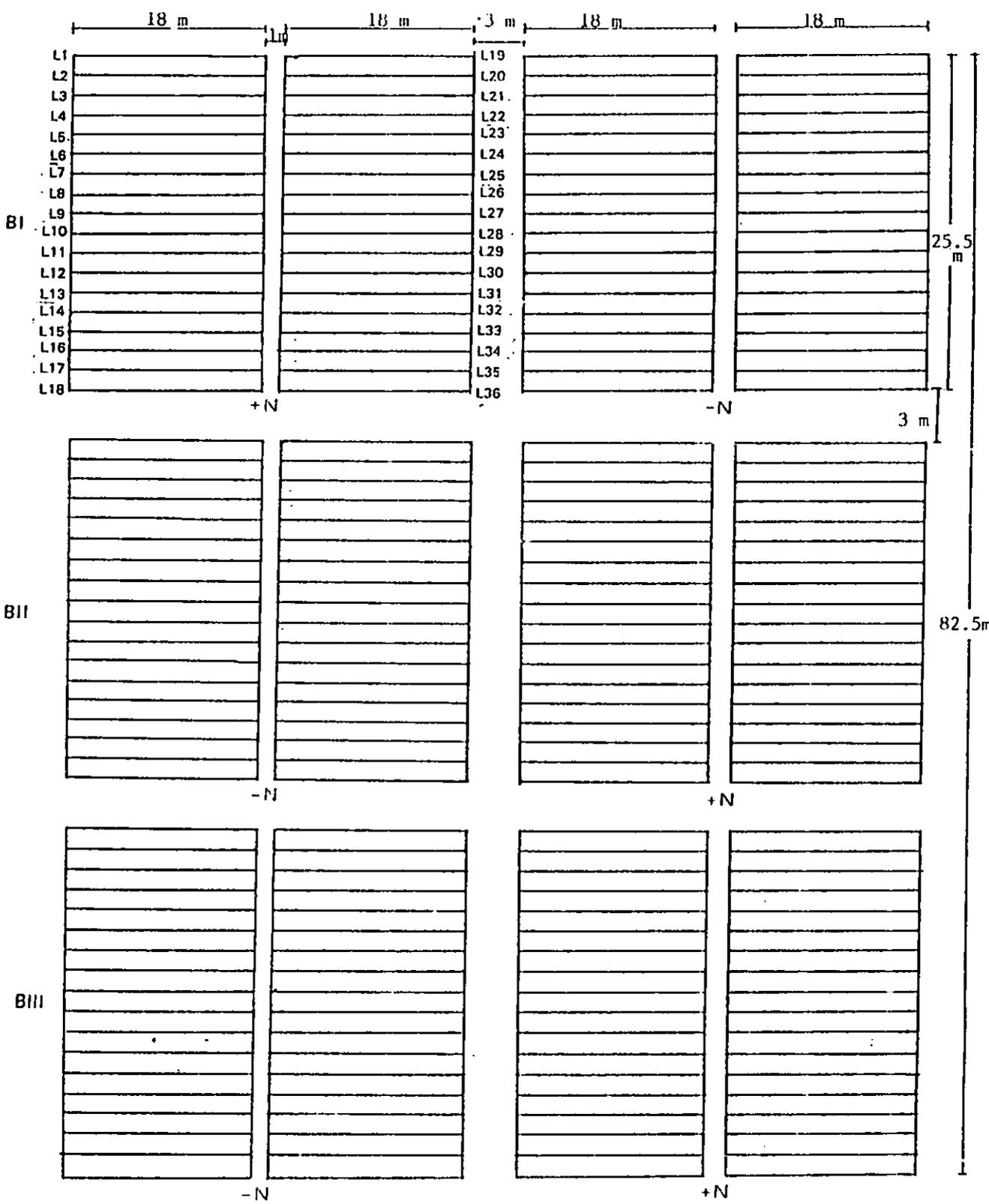


Figura 15.3. Croquis de un ensayo típico de la Etapa 1. Parcela principal: fertilización con N; subparcela: leguminosa.

un azadón y esperar en lo posible, a que llueva antes de sembrar. El contacto directo del fertilizante con la semilla puede ser dañino para ésta.

En el tratamiento con N se aplican 20 kg de N/ha (4.3 g urea por m de surco), cada dos semanas durante el ensayo; la primera aplicación se hace 2 a 4 semanas después de la siembra. Si antes de finalizar el ensayo se presenta una sequía, se deben suspender las aplicaciones de N hasta que empiece a llover nuevamente. Es necesario aplicar niveles altos de N, ya que el objetivo de este tratamiento es demostrar el potencial máximo de rendimiento de las plantas cuando el nitrógeno no limita su crecimiento.

15.6 Identificación de las parcelas

Se identifican las parcelas con placas pintadas con los números de los tratamientos y de los bloques, antes de empezar la siembra.

15.7 Siembra

Para la siembra se debe escoger un día en que el suelo esté húmedo, y en que no esté lloviendo ni haciendo sol intenso. La semilla se siembra en el centro del surco, a una tasa de siembra que proporcione de 15 a 20 plantas/m. Las siguientes tasas, en gramos de semilla por metro de surco, son adecuadas, por lo regular: para Centrosema spp., 1.0 g/m; para P. phaseoloides, 0.4 g/m; y para Desmodium spp. y Stylosanthes spp., 0.3 g/m. Se deben escarificar las semillas (ver 13.5), y además lavarlas y secarlas si están tratadas con fungicidas. Es importante tapar las semillas con un poco de suelo que se compacta bien con un implemento o con el pie para evitar que la lluvia las arrastre. Para los ensayos que incluyen tratamientos inoculados, como los que se emplean en la Etapa 2, ver el Capítulo 19.

15.8 Control de malezas

Las malezas se controlan manualmente; las hormigas y otros insectos se controlan con Aldrín u otro insecticida. Si la gramínea crece mucho, se puede cortar con machete.

15.9 Resiembra y raleo

Se deben evitar, en lo posible, las resiembras, pero si la población está mal distribuída se pueden trasplantar plántulas del mismo tratamiento, llevando siempre con la plántula el suelo que rodea las raíces, y tratando de no perturbar las raíces. El raleo es más fácil de hacer que la resiembra; su objetivo es evitar una competencia más intensa entre plantas en los casos en que germinan muchas semillas en el mismo sitio.

15.10 Cortes

El número mínimo de cortes durante el establecimiento es de dos. En cada uno se cortan tres submuestras de 2 m lineales, en sitios escogidos al azar dentro de cada parcela; las submuestras de cada corte se toman en sitios diferentes, cortando las plantas al nivel del suelo. Se recomienda hacer el primer corte de 9 a 12 semanas después de la siembra, y el último cuando se considere que la leguminosa estará en condiciones para que empiece el pastoreo (4 a 5 meses). Se toma nota del número de plantas de cada submuestra, y se reúnen las tres submuestras para determinar el peso verde. Si la época de crecimiento es muy corta, se hace un corte durante el primer período de crecimiento, y se hace otro corte cuando empiece a llover nuevamente. Sin embargo, no se debería seguir evaluando una vez que la leguminosa esté establecida, es decir, en condiciones para que empiece el pastoreo, porque tales condiciones ya no son representativas de una pradera bajo pastoreo.

Después de reunir las submuestras del campo y determinar su peso verde, se toma de este material mezclado, una submuestra de 100 g --o todo el material si es menor que 100 g-- para secarla; una vez secada a 60-80 °C, se muele y se determina su porcentaje de N. Se considera que cada metro lineal de surco representa 1 m² de parcela, es decir, las tres submuestras de 2 m lineales cada una representan 6 m²: esta muestra es suficientemente grande para cubrir la variabilidad existente dentro de las parcelas.

15.11 Evaluación de la nodulación

La evaluación de la nodulación se hace según las instrucciones dadas en el Capítulo 17.

15.12 Análisis de los datos

Para los ensayos del tipo Etapa 1, en que hay dos tratamientos por leguminosa (-N y +N), se calcula la respuesta al nitrógeno de cada leguminosa usando el IRN (ver 13.7) y se comparan las leguminosas. También se analiza el rendimiento de N de las leguminosas en los dos tratamientos por separado, y se ordenan éstas según ese parámetro. Se comparan estos datos con los de la nodulación y, según los resultados, se seleccionan las mejores combinaciones leguminosa-suelo para futuros ensayos. Para el análisis de los datos que se obtengan en los ensayos de la Etapa 2, se utiliza el IEI (ver 19.1.4).

En los ensayos de la Etapa 1 se evalúa la nodulación de los genotipos de frijol y su respuesta a la fertilización con nitrógeno en diferentes suelos, aplicando tratamientos de alta y baja disponibilidad de nitrógeno mineral. Se determina así la capacidad de un genotipo para alcanzar su potencial de producción con el nitrógeno suministrado por la simbiosis entre la planta y la población nativa de Rhizobium phaseoli. Una fuerte respuesta a la fertilización con nitrógeno indica que la población nativa de los rizobios es bastante inefectiva o que el genotipo de frijol tiene un potencial bajo para la fijación del nitrógeno, o que ambos fenómenos ocurren. En los ensayos de la Etapa 2 se incluyen tratamientos de inoculación (ver Capítulo 19).

16.1 Elección del sitio y medidas para minimizar el nivel de nitrógeno mineral

Se elige un sitio representativo de la región de interés pero, cuando se evalúa frijol en monocultivo, deben tomarse precauciones especiales para asegurarse de que haya baja disponibilidad de N mineral en ese sitio. Si es posible, se recomienda hacer una evaluación de la tasa de mineralización (ver Capítulo 18).

Si el nivel inicial de N mineral es alto, una siembra previa de maíz, cosechada un poco antes de la siembra del frijol, ayudará a reducirlo. Si la tasa de mineralización es alta, se puede incorporar al suelo (aproximadamente, 1 kg/m^2), aserrín, trozos de yuca o bagazo de caña, sustancias que aumentan la relación C:N y contribuyen a disminuir la disponibilidad de nitrógeno mineral. Otra forma de reducir ese nitrógeno es haciendo siembras intercaladas, por ejemplo, se siembra un surco de trigo o de maíz entre los surcos de frijol. Es necesario hacer ensayos preliminares en la región para seleccionar el mejor método de minimizar el nitrógeno mineral.

16.2 Diseño experimental

Se requieren como mínimo, dos tratamientos por genotipo. Para facilitar el manejo de la fertilización nitrogenada, es útil usar un diseño de parcelas divididas con los tratamientos de N en las parcelas principales y los genotipos en las subparcelas. Si se usa un diseño de bloques al azar, es importante dejar suficiente espacio entre las parcelas para evitar la contaminación con el fertilizante; por la misma razón, el lote debe tener poca pendiente.

Las dimensiones de las parcelas se calculan considerando que se necesitan de 6 a 8 plantas para cada evaluación de la nodulación. Se recomiendan, como mínimo, tres repeticiones por cada tratamiento. El croquis de la Figura 16.1 muestra un diseño para un experimento típico de la Etapa 1.

16.3 Fertilización

En los tratamientos de alta disponibilidad de nitrógeno mineral se aplica urea, u otro fertilizante nitrogenado, en dosis divididas, hasta alcanzar una dosis total de 150 a 200 kg de N/ha. Se recomienda hacer las aplicaciones en banda, cada dos semanas.

En los ensayos correspondientes a las Etapas 1 y 2, cuando se requiere información sobre el potencial genético del germoplasma del frijol con las cepas nativas o inoculadas de los rizobios, deben mantenerse las plantas en condiciones óptimas de crecimiento mediante el riego, la aplicación de fertilizantes, y el control de enfermedades y plagas. Se debe aplicar cal y también fósforo, potasio y micronutrientos, uniformemente en todos los tratamientos, y en dosis suficientes según los requerimientos locales. Las malezas deben controlarse para evitar que compitan por el nitrógeno mineral y por los otros nutrientes.

La expresión de un buen potencial de fijación de nitrógeno en plantas sometidas a condiciones de estrés, como la deficiencia de fósforo o la sequía, se evalúan posteriormente, en la Etapa 3.

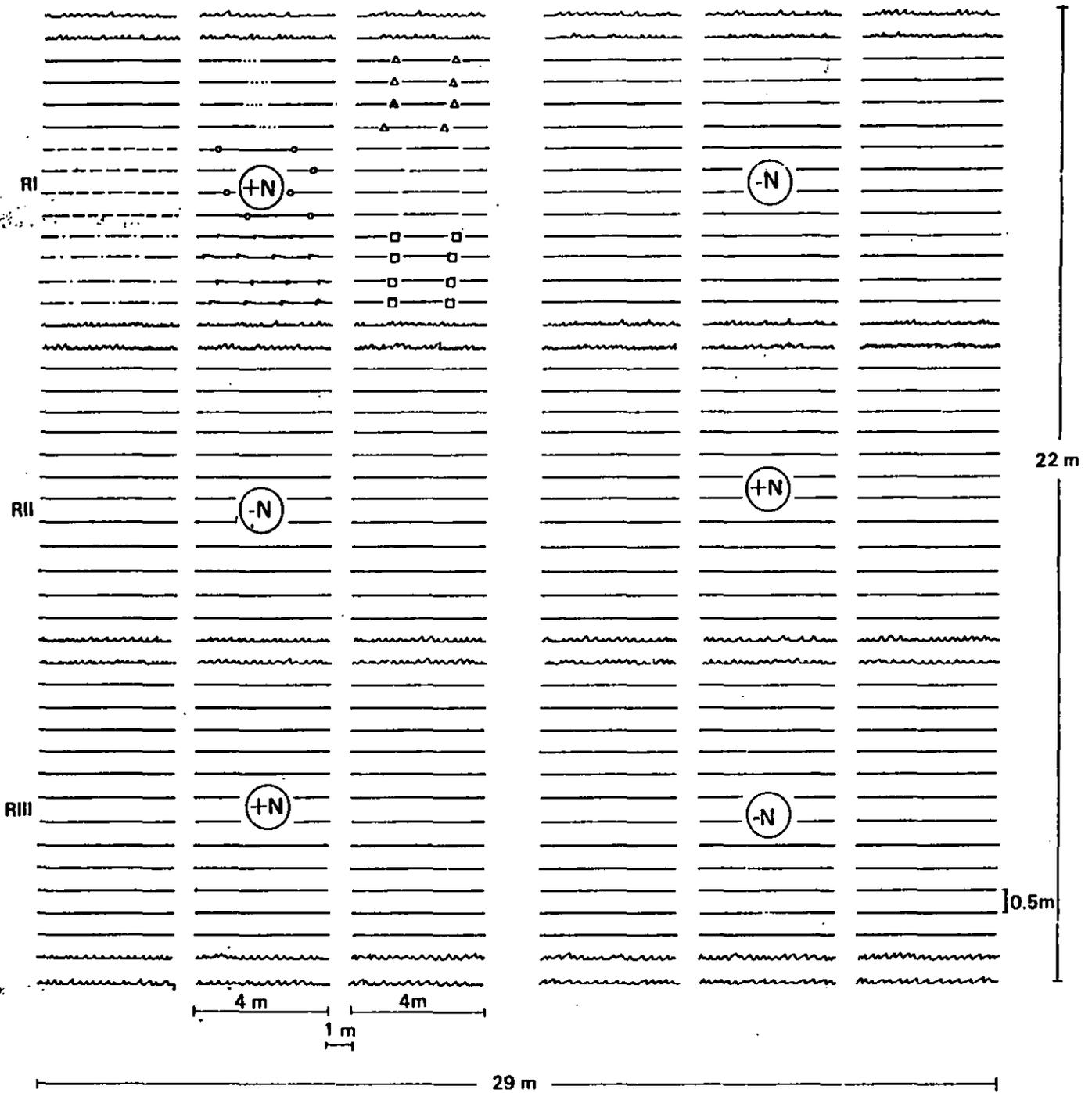


Figura 16.1. Croquis de un ensayo de frijol, en la Etapa I. Nueve genotipos, con niveles altos y bajos de nitrógeno, y tres repeticiones.

16.4 Evaluación de la nodulación

La nodulación debe evaluarse de acuerdo con las instrucciones dadas en el Capítulo 17. Si no es posible hacer más de una evaluación, debe hacerse en la mitad del período de floración, cuando el número y la masa de los nódulos alcanzan el nivel máximo. La nodulación temprana también es importante, y debe evaluarse siempre que sea posible.

16.5 Evaluación del rendimiento

El vigor vegetativo está relacionado muchas veces con la fijación del nitrógeno; por ello, las plantas que se cosechan para evaluar la nodulación pueden ser secadas y pesadas para obtener una estimación de su vigor.

La planta alcanza generalmente el máximo contenido de nitrógeno durante la etapa del llenado de vainas, antes de que las hojas caigan. Las plantas pueden cosecharse en ese momento para determinar el nitrógeno total, aunque es más usual evaluar la producción de grano. En los proyectos de mejoramiento que se realizan específicamente para incrementar el potencial de rendimiento o la fijación de nitrógeno, la información sobre la variación de los genotipos en el índice de cosecha del N es valiosa (proporción del N total que está en el grano).

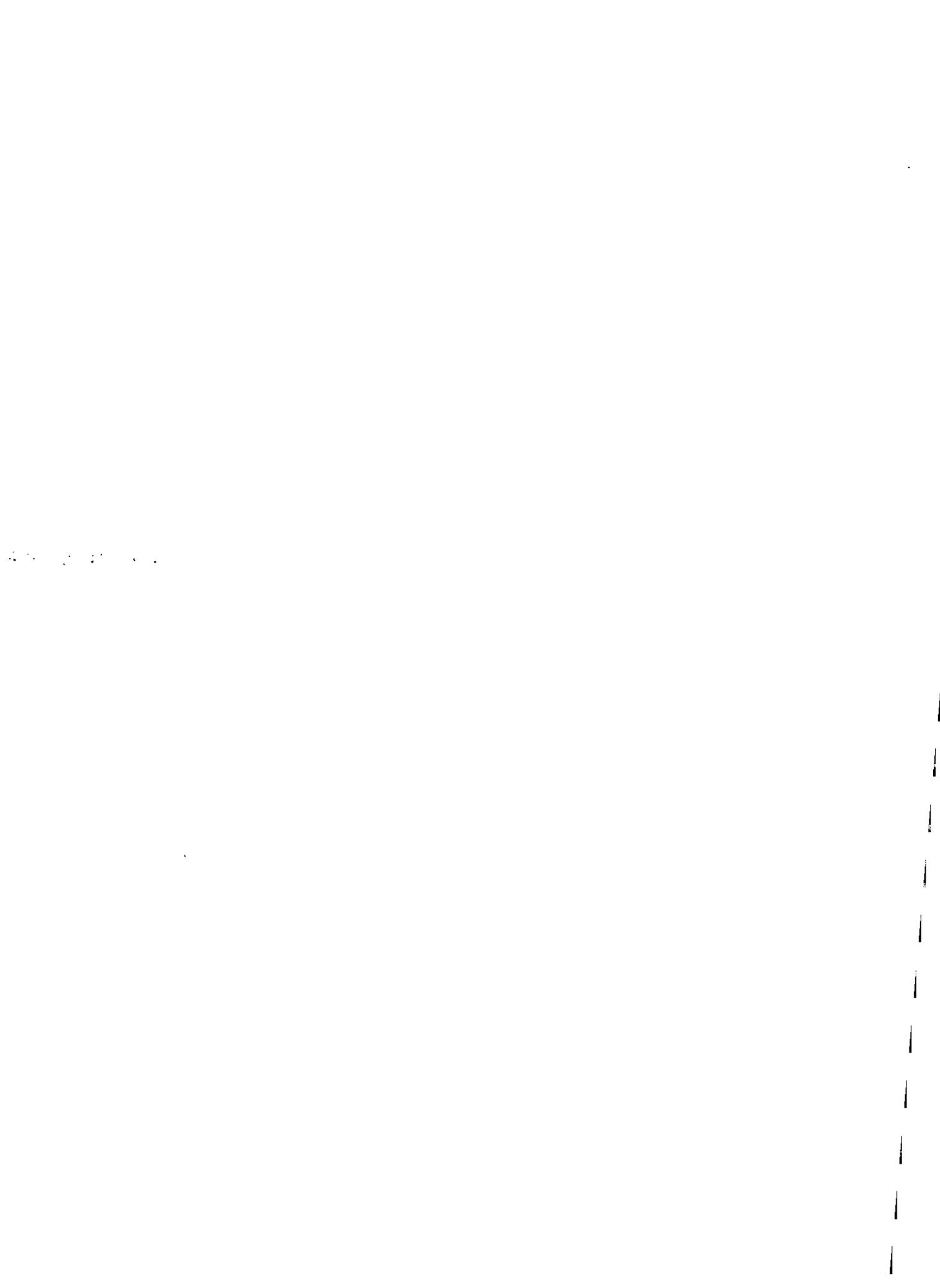
Sin embargo, para un ensayo típico de la Etapa 1, es suficiente, en general, determinar la producción de grano y, si se puede, el contenido de nitrógeno en el grano; se sabe que la concentración del N varía entre los genotipos, y aun dentro de un genotipo si cambian las condiciones del medio ambiente.

En los sistemas de cultivo intercalados, la determinación del rendimiento de nitrógeno de los cultivos asociados es también importante, porque interesa conocer el balance total del nitrógeno. Un genotipo de frijol que establezca una simbiosis efectiva

competirá menos por la pequeña cantidad de nitrógeno mineral disponible en el suelo, y entonces las diferencias entre los tratamientos pueden ser más claras en los cultivos asociados que en el frijol mismo.

16.6 Análisis de los datos

En los ensayos de la Etapa 1, donde hay dos tratamientos por genotipo --no inoculados con baja y con alta disponibilidad de N mineral-- se analiza la respuesta al nitrógeno (IRN) de cada genotipo (ver 13.7). También se compara el orden de los genotipos en los dos tratamientos separadamente. Estos datos se evalúan junto con los datos de la nodulación, y según ellos se seleccionan los mejores genotipos para futuros ensayos. En ensayos del tipo Etapa 2 se emplea el IEI (19.1.4) junto con los otros parámetros de evaluación.



17 MÉTODOS PARA EVALUAR LA NODULACION

El método elegido para evaluar la nodulación depende del tipo de germoplasma que se evalúa, de la edad de la planta, del número de nódulos presentes, y de la facilidad de extraer las raíces del suelo. En general, la nodulación no se evalúa en los tratamientos fertilizados con nitrógeno.

17.1 Leguminosas forrajeras tropicales

17.1.1 Evaluación de la nodulación en los ensayos en cilindros con suelo sin perturbar

En los ensayos de invernadero es relativamente fácil recuperar todos los nódulos, aunque no se puedan separar las raíces (y por eso los nódulos) de las dos plantas del mismo cilindro. Los nódulos de muchas de las leguminosas forrajeras son pequeños, lo que dificulta la estimación de su peso. Además, ese peso es tan pequeño que su estimación no es confiable a causa de las pequeñas cantidades de suelo adheridas a los nódulos que es difícil eliminar de las muestras; por esta razón, solamente se recomienda contar los nódulos.

Luego de extraer las raíces de los cilindros, se colocan éstas sobre un tamiz y se lavan cuidadosamente con agua. Si no se puede hacer el recuento inmediatamente, se deben guardar en el congelador las raíces con los nódulos, en bolsas plásticas rotuladas.

17.1.2 Evaluación de la nodulación durante la fase de establecimiento en el campo

En un ensayo de campo se deben hacer, por lo menos, dos evaluaciones de la nodulación durante la fase de establecimiento de la leguminosa.

.1 Consideraciones generales sobre los parámetros que se evalúan

El número de nódulos por planta es el parámetro más importante. En los ensayos en que hay tratamientos que producen nodulación abundante o muy abundante (más de 50 nódulos por planta) se puede evaluar esa abundancia por categorías, según el Cuadro 17.1. Si no se encuentran plantas con nodulación abundante, es preferible contar los nódulos. Se recomienda inspeccionar algunas de las plantas más vigorosas en los tratamientos sin nitrógeno, para decidir si es más adecuado utilizar recuentos o categorías para evaluar la abundancia.

Por lo regular, la primera evaluación de la nodulación se realiza seis semanas después de la siembra, haciendo conteos de los nódulos. En la segunda evaluación (de 12 a 16 semanas después de la siembra) se utilizan las categorías de abundancia si se encuentran tratamientos con más de 50 nódulos por planta.

Las categorías de 'tamaño predominante', nodulación en la raíz principal ('distribución'), y 'color interno predominante' (Cuadro 17.1) se utilizan para complementar los datos sobre la abundancia de los nódulos. No siempre es necesario tomar estos datos, pero es recomendable hacerlo cuando los tratamientos producen cambios en estos parámetros.

.2 Toma de las muestras

Se evalúan seis plantas por parcela. Es aconsejable reservar las plantas de los extremos de los surcos (los últimos 50 cm de cada surco) para hacer la evaluación de la nodulación temprana. Si se pretende evaluar el color interno de los nódulos, es necesario hacerlo en el campo debido al rápido deterioro de los colores de los nódulos una vez extraídos del suelo; primero se debe hacer su recuento ya que luego se destruyen para evaluar el color interno.

Cuadro 17.1 Códigos para la evaluación de cuatro parámetros de la nodulación de plantas individuales de leguminosas forrajeras tropicales.

A. <u>Abundancia</u> (No. aproximado de nódulos por planta)			D. <u>Color interno predominante</u> (10 nódulos vivos examinados por planta)	
<u>Evaluación</u>		<u>Código</u>	<u>Evaluación</u>	<u>Código</u>
Más de 100	Muy abundante	4	Negro	9
50 - 100	Abundante	3	Rojo ^b	8
10 - 50	Mediana	2	Verde	7
1 - 10	Poca	1	Blanco	6
0	No hay	0	Marrón	5
B. <u>Tamaño predominante</u>			Rojo y verde ^c	4
<u>Evaluación</u>		<u>Código</u>	Rojo y negro	3
Grandes		4	Marrón y verde	2
Medianos		3	Sin color predominante	1
Pequeños		2	Sin nódulos	0
Sin tamaño predominante		1		
No hay nódulos		0		
C. <u>Nodulación en la raíz principal^a</u>				
<u>Evaluación</u>		<u>Código</u>		
Predominante		3		
Regular		2		
Nulo		1		
No hay nódulos		0		

a. Este parámetro es relativo para cada planta: 'predominante', por ejemplo, quiere decir que la mayoría de los nódulos están en la raíz principal.

b. El color rojo incluye nódulos rosados y otras variaciones del color rojo.

c. Los colores dobles (categorías 2, 3 y 4) representan nódulos que exhiben dos colores dentro de un nódulo.

Para tomar las muestras, se cava cuidadosamente alrededor de la planta, sin destruir el sistema radical y teniendo en cuenta los nódulos que se encuentran en las raíces secundarias, a veces muy distantes de la raíz principal.

.3 Métodos para hacer las evaluaciones

Para hacer las evaluaciones se lleva al campo una tarjeta de referencia, y luego se registran las calificaciones en el formulario de la página 17-6. La tarjeta de referencia se puede hacer por el modelo de la Figura 17.1.

a. Abundancia

Se registra el número exacto o aproximado de los nódulos. Si se evalúa el número aproximado, se registra la categoría que corresponda a cada planta (0, 1, 2, 3 ó 4).

b. Tamaño

La calificación del tamaño depende del género de la leguminosa; Centrosema, y Pueraria phaseoloides, forman nódulos de mayor tamaño que Stylosanthes, Desmodium, Zornia y Arachis. La Figura 17.2 puede servir como guía para evaluar el tamaño de los nódulos de los grupos de leguminosas mencionados. Sin embargo, esta guía puede adaptarse según el criterio del evaluador, siempre y cuando se definan y mantengan las mismas categorías en cada ensayo. Además, es importante observar detalladamente las raíces porque a veces hay una mezcla de nódulos grandes y pequeños, y estos últimos pueden ser casi invisibles.

c. Distribución

La distribución de los nódulos entre la raíz principal y las raíces secundarias es un parámetro importante, que puede

PARAMETROS PARA LA EVALUACION DE LA NODULACION

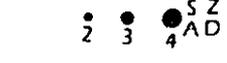
ABUNDANCIA		TAMAÑO PREDOMINANTE	NODULACION EN LA RAIZ PRINCIPAL		COLOR PREDOMINANTE			
	Cat.			Cat.		Cat.		Cat.
Más de 100	4		Predominante	3	Negro	9	Rojo y Verde	4
50 - 100	3		Regular	2	Rojo	8	Rojo y Negro	3
10 - 50	2		Nulo	1	Verde	7	Marrón y Verde	2
1 - 10	1	No Predominante: 1			Blanco	6	No Predominancia	1
0	0	Sin Nódulos: 0	Sin Nódulos	0	Marrón	5	Sin Nódulos	0

Figura 17.1. Modelo de tarjeta de referencia para la evaluación en el campo.

Cat. = categoría. S = Stylosanthes, A = Arachis, Z = Zornia
 D = Desmodium, C = Centrosema, P = Pueraria.

Diámetro (mm)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0
								
<u>Stylosanthes</u> , <u>Zornia</u> ,								
<u>Desmodium</u> , <u>Arachis</u>	P	M	G	G				
<u>Pueraria phaseoloides</u>	P	P	P	M	M	G	G	
<u>Centrosema</u> spp.	P	P	P	P	P	M	G	G

Figura 17.2. Guía para evaluar los nódulos por tamaño, en las leguminosas forrajeras. P = pequeño (categoría 2), M = mediano (categoría 3), G = grande (categoría 4).

FECHA DE EVALUACION: _____

ENSAYO No. _____

Tratamiento	Planta no.	Abundancia			Tamaño			Nodulación en raíz principal			Color interno predominante		
		RI	RII	RIII	RI	RII	RIII	RI	RII	RIII	RI	RII	RIII
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												

variar ya sea entre las cepas de rizobios, o ya entre plantas según que hayan sido --o no-- inoculadas. Es un parámetro relativo; por ejemplo, si sólo hay cinco nódulos, todos ellos en la raíz principal, la nodulación en esa raíz se califica como 'predominante' (Categoría 3).

d. Color interno

El color interno más común es el rojo (o rosado), pero ciertas cepas y condiciones causan la formación de nódulos de color marrón, negro, verde o blanco. También pueden encontrarse nódulos con dos colores y, especialmente en el género Centrosema, pueden presentarse zonas verdes y rojas dentro del mismo nódulo. Se evalúan aproximadamente 10 nódulos --representativos de los diferentes tamaños de los nódulos de cada planta-- abriéndolos con la uña para observar el color interno.

Con los parámetros de tamaño y color interno se califica la característica que predomine en la mayoría de los nódulos; esto implica que sólo se asigna una categoría cuando más de la mitad de los nódulos de una planta tienen la misma característica; en caso contrario se asigna la categoría 1 (sin tamaño o color predominante). Los nódulos muertos no se toman en cuenta.

Si hay necesidad de almacenar las muestras, éstas deben mantenerse en condiciones de refrigeración, aunque aun así se pueden perder los colores nítidos originales, que por ello son más fáciles de evaluar en el campo.

.4 Análisis de los datos

Los datos de las categorías se analizan calculando 'ji' cuadrado mínimo, modificado para tablas de frecuencia, y tomando cada parámetro separadamente. En el parámetro de abundancia, las tablas de frecuencia se basan en todos los datos, pero en los parámetros de tamaño, distribución y color

interno no se tienen en cuenta las plantas sin nódulos. Si el análisis de 'ji' cuadrado es significativo, se forman grupos de tratamientos que difieran aparentemente entre ellos, y se vuelve a probar ji cuadrado para cada grupo. Cuando se obtenga un ji cuadrado no significativo dentro de cada grupo de tratamientos, se asigna un nivel a cada grupo, como en el siguiente ejemplo:

Tratamientos donde 50% de las plantas tienen:

más de 50 nódulos	= nivel 1
10-50 nódulos	= nivel 2
0-10 nódulos	= nivel 3

El mismo procedimiento se aplica a los otros parámetros. Con los niveles asignados a cada tratamiento, en cada parámetro, se construye una tabla que describe la nodulación en todo el ensayo. Existen programas de computadora para este tipo de análisis. Se puede consultar al CIAT para obtener información más detallada.

17.1.3 Evaluación de la nodulación en una pradera establecida

Escoger un sitio de la pradera donde la cobertura de la leguminosa sobrepase el 60%. Estimar el porcentaje de cobertura de la leguminosa utilizando un marco de 1 m² dividido en cuadros de 20 por 20 cm, según una escala de 1 a 4 para cada cuadro. Luego, con un barreno de 7 cm de diámetro (Figura 17.3) que se introduce en el suelo a golpes de martillo, sacar una muestra de suelo de cada línea de cinco cuadros del marco, cada una de una columna diferente (Figura 17.4).

Dividir cada muestra de suelo en cuatro submuestras que representen cuatro profundidades del suelo, 0-4, 4-8, 8-12, y 12-16 cm; contar luego el número de nódulos en las veinte submuestras. Repetir el proceso en otros cuatro sitios de la pradera que tengan más del 60% de cobertura de la leguminosa. En caso de obtener un bajo número de nódulos por muestra, se puede

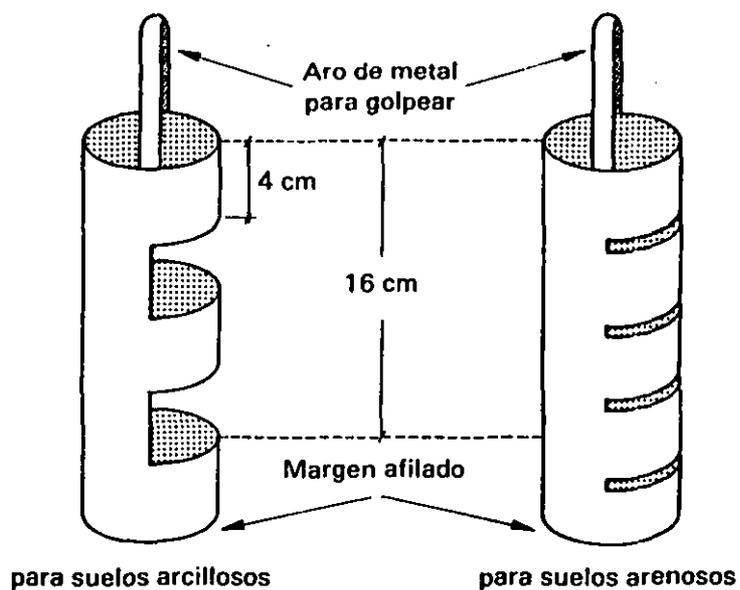


Figura 17.3. Barreno para extraer las muestras de suelo para evaluar la nodulación en praderas.

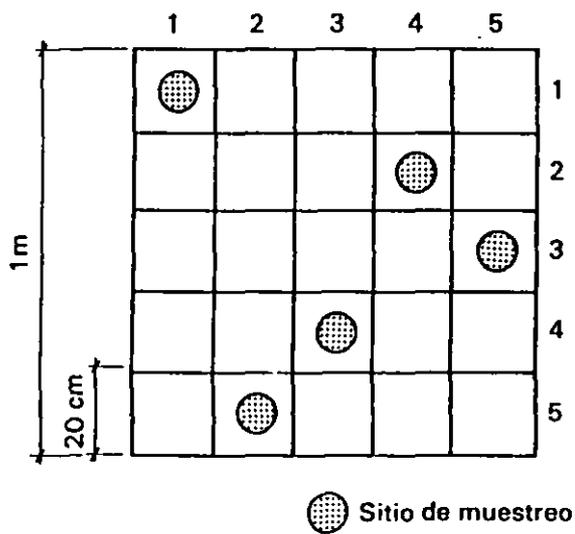


Figura 17.4. Plano de muestreo para obtener muestras de suelo.

aumentar el número de muestras por marco o el número de sitios muestreados. Se debe tomar nota del color interno de los nódulos y especificar si los números representan el total de nódulos o únicamente los nódulos vivos. El número de nódulos puede expresarse referido al área, al porcentaje de cobertura de la leguminosa, o a la planta.

En praderas donde no haya áreas que tengan más de 60% de cobertura de la leguminosa, la evaluación debe realizarse con la metodología descrita anteriormente (ver 17.1.2).

17.2 Frijol y otras leguminosas de grano

17.2.1 Evaluación de la nodulación en ensayos de invernadero

No es difícil recuperar todos los nódulos de las plantas de frijol que crecen en macetas; para hacerlo, se lavan las raíces cuidadosamente con agua corriente en un tamiz y, de ser posible, se cuentan los nódulos inmediatamente. Se pueden guardar congeladas las raíces con nódulos, dentro de bolsas plásticas rotuladas, pero los nódulos perderán su estructura firme y su color característico. Los nódulos muertos o senescentes no se toman en cuenta.

Si hay diferencias en el tamaño de los nódulos entre los tratamientos, puede ser útil medir la masa de los nódulos, usando parámetros tales como el peso fresco, el volumen fresco, o el peso seco; cualquiera que sea el método usado, es necesario retirar los nódulos de las raíces, operación que toma mucho tiempo.

Para determinar el peso o el volumen fresco, es importante que cada muestra sea tratada de igual manera y que se emplee el mismo tiempo en lavar las raíces, retirar los nódulos de las raíces, y pesarlos o medirlos. El volumen de los nódulos se mide colocándolos dentro de una probeta pequeña (FAO, 1985); el peso

seco de los nódulos se mide después de mantenerlos durante 48 horas a 60 °C, y es absolutamente necesario remover de los nódulos toda la arena y el suelo antes de pesarlos.

17.2.2 Evaluación de la nodulación en el campo

Se recomienda examinar las raíces de seis plantas por parcela, como mínimo. En el caso de que los ensayos con frijol voluble intercalado con maíz se puedan sacrificar únicamente este número de plantas, mientras que en ensayos con monocultivos de frijol arbustivo se toman muestras de ocho a diez plantas.

Se excluye la última planta de cada surco, y se extraen cuidadosamente las plantas siguientes, dejando la parte central de la parcela para las estimaciones de rendimiento. Antes de extraer la planta se cava, con una pala, alrededor de ella; luego se separan cuidadosamente las raíces del suelo, y se examina bien el suelo para recuperar los nódulos desprendidos.

.1 Nodulación temprana

La primera evaluación debe hacerse durante la etapa en que se abren la segunda y la tercera hojas trifoliadas (V3 a V4). Es relativamente fácil recuperar todo el sistema radical en esta etapa; en ella se debe contar el número de nódulos por planta. Todos los nódulos se cuentan, aun los pequeños y los que tengan color blanco.

.2 Evaluación en mitad del período de floración

En esa etapa (R6) las plantas alcanzan generalmente los niveles máximos en número y masa de los nódulos, momento en que se debe hacer la segunda evaluación de la nodulación. En este estado de desarrollo de las plantas es más difícil recuperar todo el sistema radical, por lo que se requiere mucha paciencia y cuidado.

En la medida en que sea posible, se debe contar el número exacto de nódulos 'aparentemente efectivos' por planta, es decir, los nódulos de color interno rojo o rosado. En el frijol se pueden distinguir los nódulos que tienen un color interno rojo o rosado de los que son verdes, blancos, o grises y senescentes, inmediatamente después de extraer las raíces del suelo y sin necesidad de abrir los nódulos. En otras leguminosas de grano puede ser necesario abrir los nódulos, tal como se hace con los de las leguminosas forrajeras tropicales (ver 17.1.2). En los ensayos grandes, o cuando las plantas tienen muchos nódulos, puede ser preferible utilizar una escala visual para esta evaluación, estableciendo categorías de abundancia en vez de contar todos los nódulos.

En el Programa de Frijol del CIAT se utiliza un sistema de categorías que van de 1 a 9 para evaluar la resistencia de líneas de frijol a enfermedades, su vigor, su adaptación, y otras características. La categoría 1 se utiliza para indicar resistencia o excelencia, mientras que la categoría 9 representa susceptibilidad o mal desempeño. Para evaluar la nodulación se ha adoptado la misma escala: 1 = excelente, y 9 = muy pobre (Cuadro 17.2).

Las categorías de abundancia pueden variar según el sitio o el tipo de frijol. En el Cuadro 17.2 se muestran los dos ejemplos de la escala visual utilizados en el CIAT. Las categorías se establecen fundadas en la experiencia obtenida en cada región con un tipo dado de frijol, tomando muestras de varias parcelas, tanto de plantas muy vigorosas como de plantas muy pobres; a éstas se les hace un recuento de nódulos para adjudicar el número de nódulos correspondiente a las categorías extremas. En las estaciones experimentales del CIAT, en Colombia, el frijol arbustivo forma de 10 a 80 nódulos por planta, generalmente, mientras que los genotipos volubles tienen con frecuencia hasta 250 nódulos, y esto crea la necesidad de establecer escalas visuales separadas.

Cuadro 17.2 Calificación de la nodulación 'aparentemente efectiva' en el frijol.

Categoría (código)	Número de nódulos (rojos y rosados)	Ejemplo ^a	
A. Frijol arbustivo			
1	más de 80		
2*		NR	C
3	41 a 80		
4*		30 grandes	4
5	21 a 40	30 medianos	5
6*		30 pequeños	6
7	10 a 20		
8*			
9	menos de 10		
B. Frijol voluble			
1	más de 240		
2*		NR	C
3	121 a 240		
4*		100 grandes	4
5	61 a 120	100 medianos	5
6*		100 pequeños	6
7	30 a 60		
8*			
9	menos de 30		

a. NR = nódulos rojos; C = categoría.

* Se utilizan los números pares para indicar que la mayoría de los nódulos son grandes o pequeños, y los números impares para los nódulos que, en su mayoría, son medianos.

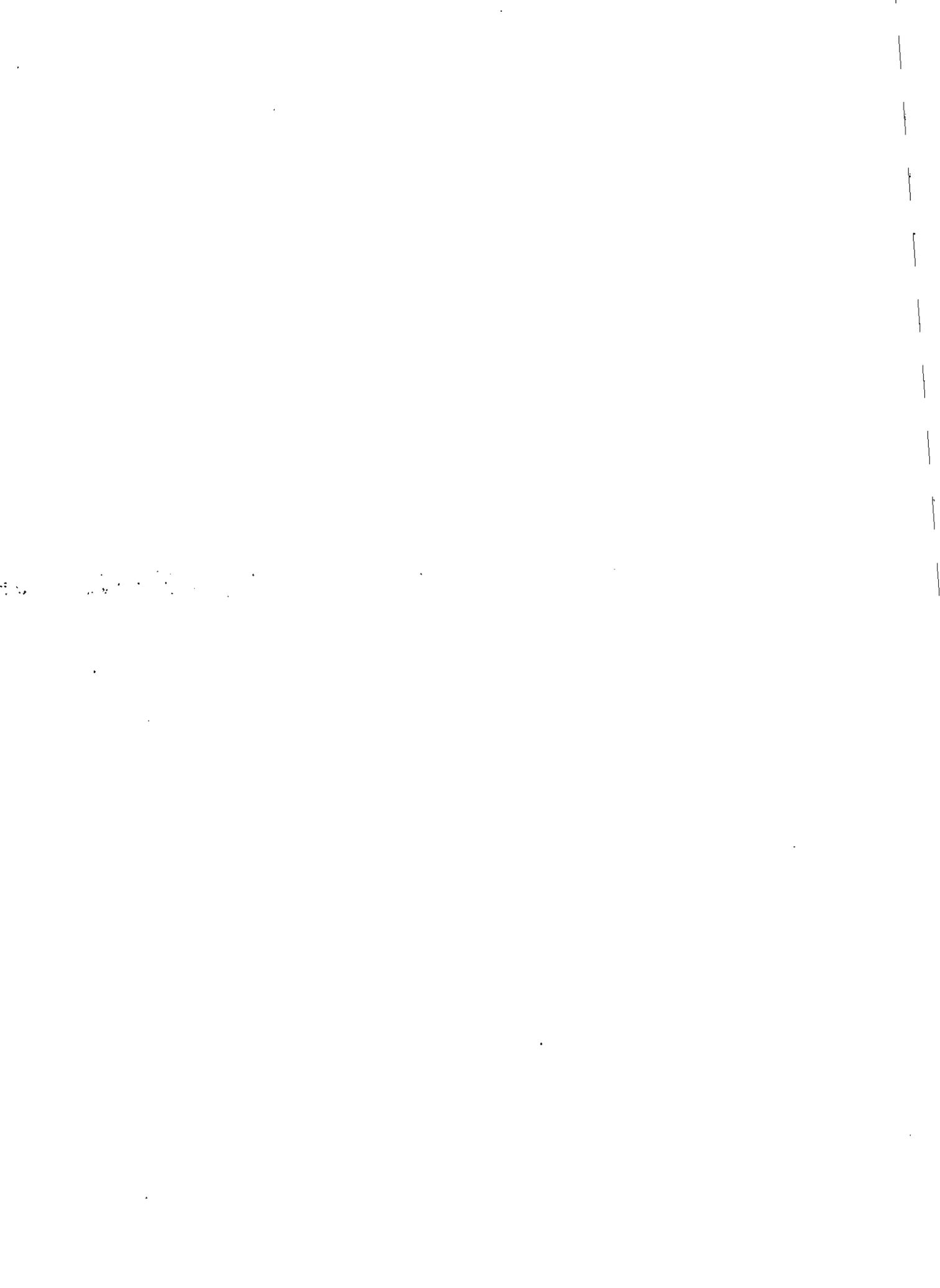
El número de nódulos 'aparentemente efectivos' se estima mediante un examen visual del sistema radical, y asignándole una categoría; por ejemplo, a una planta de frijol arbustivo que tiene entre 20 y 40 nódulos, se le asigna la categoría 5.

En algunos casos puede ser útil evaluar otras características de la nodulación, además de la abundancia, como la distribución, el tamaño y el color. Se pueden emplear categorías no continuas, tal como se indicó tratando de las leguminosas forrajeras. Como lo que interesa, generalmente, es la masa total del tejido activo, se pueden tomar en cuenta las variaciones grandes en el tamaño de los nódulos, usando las categorías intermedias (números pares) en el Cuadro 17.2. Dado cierto número de nódulos, si la mayoría son de tamaño medio --o no hay un tamaño predominante-- sólo se les asignan las categorías representadas por los números impares; pero a ese mismo número de nódulos, si en su mayoría son grandes, se les asigna la categoría inmediatamente inferior. Si los nódulos son pequeños, en cambio, se les asigna la categoría más alta siguiente. De esta manera, una sola categoría puede indicar número, color y tamaño de los nódulos para estimar la masa de tejido activo de éstos. Si los tratamientos afectan la proporción de nódulos rojos y rosados, es decir, los 'aparentemente efectivos', es recomendable hacer dos evaluaciones, una de estos nódulos y otra de todos los nódulos.

Es mejor evaluar los datos que se registren como categorías por medio del análisis de varianza no paramétrico. Sin embargo, si se considera que el porcentaje de variación en el número o masa de los nódulos entre las categorías es constante, se puede emplear el método más común, es decir, el análisis de varianza paramétrico. Otro método de evaluación similar se incluye en las recomendaciones de Brockwell et al (1982).

.3 Senescencia tardía de los nódulos

En algún ensayo pueden despertar también interés los efectos del genotipo, de la inoculación, o del manejo agronómico en la senescencia de los nódulos. Se debe hacer, en tal caso, una tercera evaluación, o sea, de la nodulación tardía, durante la época del llenado de vainas; desafortunadamente, es difícil obtener de ella datos confiables, ya que en esta época se inicia la senescencia de las raíces y se dificulta por ello su extracción. Si hay nódulos efectivos, se encuentran probablemente en las raíces laterales a una distancia considerable del tallo principal; además, el suelo está generalmente seco en esta época, dificultando más la extracción del sistema radical.



18 MÉTODOS PARA LA DETERMINACION DEL NITROGENO

18.1 Determinación del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal

Es importante determinar el contenido de nitrógeno en el tejido vegetal cuando se evalúa la respuesta de las leguminosas a la fertilización nitrogenada o a la inoculación. Aunque el rendimiento de materia seca puede dar una indicación acerca de ese contenido de nitrógeno, la relación entre estos dos parámetros no es necesariamente lineal. El método que se presenta a continuación para la determinación del N ha sido tomado de Salinas y García (1985).

18.1.1 Muestras de tejido vegetal

Antes del análisis químico, las muestras del tejido vegetal se someten generalmente a cuatro fases de preparación (Steyn, 1959; Jones y Steyn, 1973), así:

- .1 Limpieza del material para remover la contaminación superficial. El material vegetal de la muestra está siempre cubierto con una capa fina de polvo que puede afectar los resultados del análisis. Sin embargo, para el análisis del nitrógeno en el tejido de las plantas el efecto contaminante del polvo no es, en general, significativo, ya que el nivel de N es alto en los tejidos y bajo en el suelo. El efecto contaminante es significativo tratándose de elementos como Ca, Mg, Al, Si, Fe o Mn cuyo contenido es alto en el suelo y relativamente bajo en el tejido vegetal.
- .2 Secado del material a 60 °C, hasta alcanzar un peso constante. El secado detiene las reacciones enzimáticas que puedan ocurrir en el material vegetal, y permite determinar la producción de materia seca.

- .3 Molienda mecánica, que da al material la finura apropiada para el análisis químico. Un molino tipo Wiley con criba de acero inoxidable de 1 mm funciona bien. Puede ser necesario secar las muestras antes de molerlas.
- .4 El tejido vegetal seco y molido se empaqueta en frascos plásticos, rotulados, de 25 g de capacidad como mínimo, que se sellan herméticamente para prevenir cambios de humedad en las muestras. Cuando los frascos no se sellan, las muestras se deben secar nuevamente antes del análisis.

18.1.2 Determinación del nitrógeno (%)

.1 Materiales:

Tubos de digestión, bloques de digestión a 370 °C, microdestilador, bureta con frasco de 50 ml, y frascos Erlenmeyer de 125 ml.

.2 Reactivos y su preparación:

- a. Hidróxido de sodio al 50%.
- b. Indicador mixto. Pesar 0.5 g de indicador verde bromocresol y 0.1 g de indicador rojo metilo; disolverlos en 100 ml de alcohol etílico al 96%.
- c. Solución de ácido bórico al 4%. Por cada litro de esta solución, agregar 5 ml de la solución de indicador mixto.
- d. HCl 0.02 N. Prepararlo partiendo de HCl 1 N, del cual se toman 20 ml y se diluye en agua doblemente deionizada o destilada, hasta 1 litro.
- e. Acido sulfúrico concentrado.

- f. Catalizador. Mezclar 0.5 g de selenio y 100 g de Na_2SO_4 hasta que queden bien compactos. (Otro catalizador que se puede usar es una mezcla de 0.10 g de CuSO_4 y 5 g de Na_2SO_4 .)

.3 Procedimiento:

- a. Pesar y colocar 0.1 g de muestra en un tubo de digestión, y agregar el catalizador (+ 1 g).
- b. Agregar 4 ml de ácido sulfúrico concentrado y digerir en bloques a 370 °C durante 30 minutos.
- c. Dejar enfriar, y agregar un poco de agua deionizada. Pasar cuantitativamente el contenido del tubo a un microdestilador, enjuagando con agua deionizada o destilada.
- d. Agregar 20 ml de la solución de hidróxido de sodio al 50%, y destilar recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico al 4%.
- e. Titular el destilado con HCl 0.02 N hasta obtener un color gris claro.
- f. Preparar y titular un control que contenga todos los reactivos excepto la muestra; el volumen gastado (ml) en la titulación de este control se debe anotar para restarlo de las muestras cuando se hagan los cálculos.

.4 Cálculos:

$$N (\%) = \frac{V - B}{1000} \times 0.02 \times 14 \times \frac{100}{0.1};$$

$$N (\%) = 0.28 (V - B)$$

donde:

V = Volumen de HCl 0.02 N gastado en titular la muestra (ml)

B = Volumen de HCl 0.02 N gastado en titular el control (ml)

$\frac{V - B}{1000}$ = Volumen neto convertido a litros

0.02 = normalidad del HCl (equivalentes/litro)

14 = peso equivalente del N (g)

100 = relación porcentual

0.1 = peso de la muestra (g)

18.2 Determinación del N mineral en el suelo

Por lo regular, la determinación del N mineral proporciona una mejor estimación del N disponible para la planta que el N total presente en el suelo (Page et al., 1982). Hay dos métodos para estimar el N mineral disponible:

18.2.1 Indirecta (con plantas)

Se pueden usar métodos biológicos en los cuales una planta sirve como indicadora de la disponibilidad del nitrógeno. Las plantas difieren en su habilidad para utilizar el N mineral; por ello se escogen generalmente, como indicadora, plantas exigentes en este elemento, tales como la lechuga, el maíz, o el pasto guinea Panicum maximum. Después de determinado tiempo de crecimiento, se cosechan las plantas, se determina su rendimiento como peso de materia seca, y su contenido de nitrógeno, y luego se calcula el rendimiento de nitrógeno. Si estas plantas no muestran síntomas de deficiencia de nitrógeno, la fijación de este elemento por las leguminosas puede ser inhibida, y no se puede evaluar con los métodos descritos en este manual.

18.2.2 Directa (con suelo incubado)

El método de incubación se emplea para evaluar la capacidad que poseen determinados suelos de suministrar N a los cultivos

durante una estación de crecimiento. Este método consiste en incubar una muestra de suelo y evaluar luego la cantidad de N mineral producido durante la incubación; el suelo puede estar o no tratado durante la incubación. Las muestras deben incubarse bajo condiciones de laboratorio o de invernadero, o en otro lugar protegido de la lluvia. Para evitar cambios en las condiciones del suelo, se pueden tomar las muestras en cilindros de PVC y mantener la humedad inicial más o menos constante durante la incubación; en ausencia de lixiviación y de absorción del N por las plantas, se observan tasas de acumulación de N mineral que varían entre un suelo y otro y entre tratamientos del mismo suelo.

Esta técnica tiene la ventaja de que sólo requiere alrededor de 10 días para obtener los resultados; sin embargo, es necesario analizar las muestras inmediatamente o congelarlas para prevenir cambios en el N mineral. El análisis del NO_3^- se realiza en extractos acuosos y el del NH_4^+ en extractos con KCl 1 N. Las muestras no se deben secar antes de hacer los análisis, ya que esto causa la liberación del NH_4^+ fijado, que no es disponible para las plantas. Si se acumula en el suelo más de 1 ppm de N mineral por día, no es posible evaluar la fijación de nitrógeno como se indica en este manual.

.1 Análisis del NO_3^-

- a. El NO_3^- se extrae fácilmente, lavando el suelo una sola vez en agua: pesar 10 g de suelo y agregar 0.5 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y 50 ml de agua; agitar durante 15 minutos y filtrar.
- b. Tomar una alícuota de 25 ml; evaporar y secar a 70 °C durante 24 horas.
- c. Agregar 3 ml de ácido fenoldisulfónico.¹

1. Este ácido se prepara así: 104.9 ml de fenol + 1 litro de H_2SO_4 concentrado (o 111.1 g de fenol sólido + 1 litro de H_2SO_4 concentrado). Atención! El fenol es carcinogénico.

- d. Verter en un balón de 100 ml que contenga aproximadamente 25 ml de agua.
- e. Agregar 15 ml, más o menos, de NaOH 7N, hasta que aparezca un color amarillo.
- f. Completar hasta 100 ml con agua, dejar enfriar esta solución, y leer a 420 nm en un colorímetro.
- g. Comparar con una curva estándar preparada con concentraciones conocidas de NO_3^- , desde 0 hasta 40.0 ppm.

.2 Análisis del NH_4^+

- a. El NH_4^+ requiere una extracción más vigorosa empleando K^+ , que lo sustituye en las partículas de arcilla:

Pesar 10 g de suelo y agregar 50 ml de KCl 1 N. Agitar durante 30 minutos y filtrar, lavando el residuo en el filtro 5 veces con volúmenes de 10 ml de KCl. Completar el filtrado hasta 100 ml con KCl, en un balón volumétrico.

- b. Hay varios métodos para determinar el NH_4^+ (Page et al., 1982). Se puede destilar como se ha descrito en el método para determinar el N en el tejido vegetal, empezando con el paso d. del procedimiento 18.1.2.3, así
 - Agregar 5 ml (en vez de 20 ml) de la solución de hidróxido de sodio al 50%, a los 100 ml del extracto y destilar, recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico al 4%.
 - Titular como se indicó anteriormente (18.1.2.3; e. y f.)

19

INSTRUCCIONES PARA LOS ENSAYOS CON TRATAMIENTOS DE INOCULACION

(Etapa 2)

En los ensayos de la Etapa 2 se emplean los mismos sistemas de cultivo y evaluación de las plantas que en los de la Etapa 1; estos métodos están descritos en los Capítulos 13 a 18.

En la Etapa 2 se agregan tratamientos de inoculación, y por esta razón es necesario tomar precauciones adicionales. En este capítulo se describen estas precauciones y los métodos de inoculación que se emplean en los ensayos hechos en el invernadero y en el campo.

19.1 Ensayos de inoculación en el invernadero

19.1.1 Diseño experimental

En el invernadero se aplica, por lo regular, un diseño completamente al azar. Si existe algún gradiente en el invernadero, o cuando se trabaja con cilindros con suelo, en donde los bloques representan diferentes pesos, se debe utilizar un diseño de bloques al azar. En esta forma se puede evaluar cualquier número de cepas, suelos o leguminosas.

19.1.2 Precauciones para evitar la contaminación entre tratamientos

Antes de establecer un ensayo, es necesario lavar bien las macetas o tubos de PVC, y sumergirlos durante una hora en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, para evitar la contaminación de rizobios provenientes de ensayos anteriores.

Durante el trascurso del ensayo, se deben lavar las manos y los implementos con alcohol u otro desinfectante (por ejemplo, cloruro de benzalconio), y comprobar que el agua de riego no esté contaminada con suelo.

Después de la germinación, se coloca un tubo para el riego en cada macetá o cilindro, y se cubre el suelo con una capa de arena parafinada (ver el método de preparación en 13.5). Esta capa ayuda a evitar la contaminación entre los tratamientos y a mantener la humedad del suelo.

19.1.3 Inoculación

Las semillas se inoculan empleando la misma metodología que se emplearía en el campo (ver 19.3), teniendo cuidado de proporcionar más o menos el mismo número de rizobios por semilla en todos los tratamientos. Se deben aplicar, como mínimo, 300 células/semilla, que se pueden aumentar hasta 10,000.

Otro método de inocular consiste en sembrar las semillas pregerminadas, y colocar aproximadamente 0.1 g de inoculante, o 0.5 ml de suspensión de células de rizobio, bajo cada semilla.

Un tercer método es esperar hasta el momento del raleo, e inocular el suelo con 0.5 ml de una suspensión de células de rizobio. La ventaja de este método reside en que se pueden reemplazar, antes de la inoculación, las macetas o los cilindros que tengan dificultades en la germinación, si se ha sembrado una cantidad extra de ellos.

19.1.4 Cosecha y análisis (Etapa 2; en el invernadero)

Se cosecha la parte aérea de la planta, se seca, se muele, se analiza su porcentaje de N y se evalúa la nodulación como se explicó en los Capítulos 13, 14, 17 y 18. En la mayoría de los casos se pueden comparar los tratamientos directamente por análisis de varianza.

El efecto de los tratamientos de inoculación en el rendimiento de N puede también ser evaluado mediante el 'índice de efectividad

de la inoculación' (IEI), que se define así:

$$IEI = \frac{\text{Rendimiento de N (+I)} - \text{Rendimiento de N (-I)}}{\text{Rendimiento de N (+I)}} \times 100$$

Este índice permite evaluar la efectividad relativa de una cepa comparando su rendimiento de N con el del testigo no inoculado; también puede usarse para comparar la efectividad de varias cepas o tratamientos de inoculación. El testigo fertilizado con nitrógeno se evalúa mediante el índice de respuesta a nitrógeno (IRN) que se describió en el Capítulo 13. Un IEI igual o cercano al IRN, en una misma leguminosa, indica que el tratamiento inoculado es efectivo. El IEI es útil cuando se quiere comparar evaluaciones en diferentes tiempos durante la curva de crecimiento, y en los ensayos de la Etapa 3.

19.2 Ensayos de inoculación en el campo

19.2.1 Diseños experimentales

En los ensayos de campo que se proponen en este capítulo se aplican tratamientos sin inocular, inoculados y fertilizados con N, con los cuales se puede evaluar la efectividad de las cepas nativas y de las cepas inoculadas. Para asegurar el éxito de esos ensayos, es necesario minimizar la disponibilidad del nitrógeno mineral empleando la labranza reducida (Capítulo 15) u otros métodos (Capítulo 16). Si en todos los tratamientos se observa buen rendimiento, pero la nodulación es deficiente, probablemente el nitrógeno no está limitando el crecimiento. En este caso, será necesario mejorar el método usado para minimizar el nitrógeno del suelo.

Se espera que se presente una respuesta al nitrógeno, es decir, una diferencia en rendimiento de nitrógeno entre el tratamiento no inoculado y el tratamiento fertilizado con nitrógeno, para que ocurra también una respuesta a la inoculación. Si no hay respuesta al nitrógeno, y las plantas no inoculadas nodulan bien, este resultado puede deberse a la efectividad de las cepas nativas. La falta de una respuesta al nitrógeno cuando las plantas no han nodulado bien y el rendimiento es pobre, indica que la leguminosa no está adaptada, o que el crecimiento está siendo limitado por otros factores (deficiencias nutricionales, de agua, etc.). Si hay una respuesta al nitrógeno pero no a la inoculación, la causa puede ser la falta de adaptación de las cepas inoculadas a las condiciones locales, o un inoculante de mala calidad, o una tasa demasiado baja de rizobios por semilla, o el bajo potencial de la leguminosa para fijar el nitrógeno. Si hay una buena respuesta tanto a la inoculación como al nitrógeno, se puede concluir que las cepas inoculadas son efectivas y competitivas bajo las condiciones locales.

.1 Leguminosas forrajeras

Para instrucciones generales sobre el establecimiento de ensayos de campo con leguminosas forrajeras, refiérase al Capítulo 15. En la Etapa 2 se recomienda evaluar la respuesta a la inoculación solamente durante la fase de establecimiento (duración máxima del ensayo: seis meses) por varias razones. En primer lugar, es más útil estudiar un alto número de leguminosas y de cepas durante la fase de establecimiento que evaluar pocos materiales a largo plazo. Además, es probable que ocurra contaminación a través del tiempo, por lo cual los resultados de los ensayos a largo plazo no son muy confiables si no se dispone de métodos adecuados --como los serológicos-- para identificar las cepas presentes en cada parcela. Finalmente, las cepas de los rizobios se pueden comportar, en las parcelas que se mantienen bajo corte durante mucho tiempo, de modo diferente a como lo hacen en una pradera sometida al pastoreo.

Se podría montar un ensayo sencillo para evaluar la respuesta a la inoculación con tres cepas durante la fase de establecimiento de la leguminosa; se sugiere que ese ensayo incluya los dos testigos (-I, +N) y tres cepas de rizobios recomendadas, o sea, cinco tratamientos en total. Debe contener, por lo menos, una cepa recomendada, y se pueden adicionar cepas aisladas localmente. Es importante considerar que una mezcla de cepas puede ser menos efectiva que algunas de esas cepas probadas individualmente (CIAT, 1985); por eso se recomienda evaluar mezclas de cepas solamente si se incluyen en el ensayo tratamientos inoculados con esas mismas cepas individualmente.

En un ensayo de cinco tratamientos solamente, se puede usar un diseño como el indicado en el croquis de la Figura 19.1. Si se desea aumentar el número de tratamientos, es preferible establecer parcelas con 6 surcos de 3 m de largo cada uno, en vez de 3 surcos de 6 m, para evitar que el bloque quede demasiado largo y estrecho (ver 15.3). Las calles entre las parcelas deben tener un ancho mínimo de 2 m --de ser posible, 3 m-- y deben tener zanjas para mejorar el drenaje.

.2 Leguminosas de grano (frijol)

Para instrucciones generales sobre el establecimiento de ensayos de campo con frijol, refiérase al Capítulo 16. El diseño que se emplea en los ensayos en que se evalúa la respuesta del frijol a la inoculación depende del sistema de cultivo: frijol voluble o arbustivo, monocultivo o siembra intercalada. Se recomienda el diseño estadístico de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento, como mínimo.

Dos o más surcos sembrados entre las parcelas ayudan a minimizar tanto la contaminación por rizobios entre las parcelas como la lixiviación del nitrógeno de las parcelas que reciben fertilización nitrogenada hacia aquéllas en que se aplican tratamientos con bajos niveles de nitrógeno. Además,

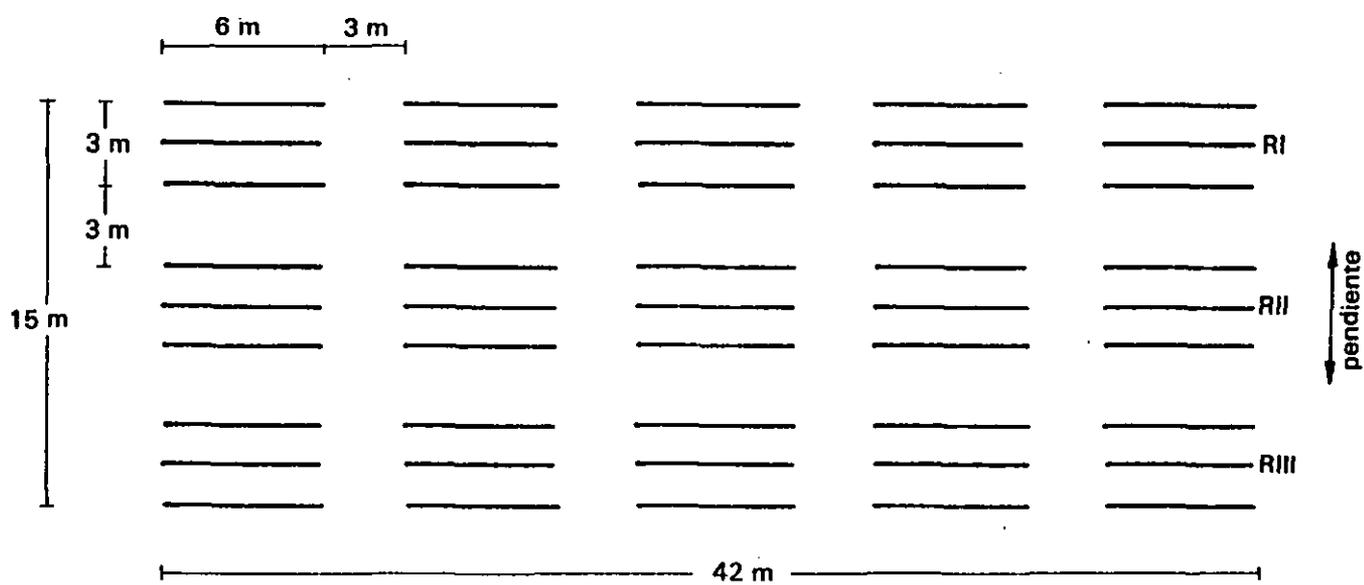


Figura 19.1. Croquis de un ensayo con leguminosas forrajeras en que se aplican cinco tratamientos.

cuando las calles están sembradas se puede cosechar la parcela completa, si es necesario, y no únicamente los surcos centrales.

Las parcelas de cinco surcos de 4 m son apropiadas para ensayos de frijol arbustivo en monocultivo, pero se necesitan parcelas mayores para los cultivos de frijol asociado con maíz (Figuras 19.2 y 19.3).

19.2.2 Cuidados para evitar la contaminación entre las parcelas

Se debe evitar la contaminación entre parcelas utilizando siempre recipientes y herramientas diferentes para cada tratamiento, y lavando bien estos elementos y las manos con agua, y luego con alcohol u otro desinfectante, antes de pasar de un tratamiento a otro. Es de suma importancia evitar que se contaminen los tratamientos no inoculados; por ello se sugiere trabajar primero con estos tratamientos y luego pasar a los tratamientos inoculados. Además, al entrar en cada parcela los pies se deberían cubrir con bolsas plásticas que, al salir, se dejarían colgadas en una estaca para que puedan usarse nuevamente. En los ensayos con inoculantes es necesario trazar calles anchas (2 a 3 m) y hacer zanjas entre las parcelas para evitar la contaminación causada por el agua de lluvia que fluye entre las parcelas.

19.2.3 Manejo de los inoculantes en los ensayos de campo

Se deben seguir las instrucciones para hacer la inoculación contenidas en las secciones 19.3 a 19.6. En el CIAT se utiliza el método de la 'peletización' (19.3.1) para hacer las pruebas de inoculantes con leguminosas forrajeras, y la inoculación del suelo (19.3.2) para los ensayos de frijol. Sin embargo, puede ser necesario comparar varios métodos de inoculación dada una situación específica (Capítulo 20).

Se debe preparar con anticipación el inoculante en un soporte estéril, si es posible, y evaluar su calidad (mediante recuentos

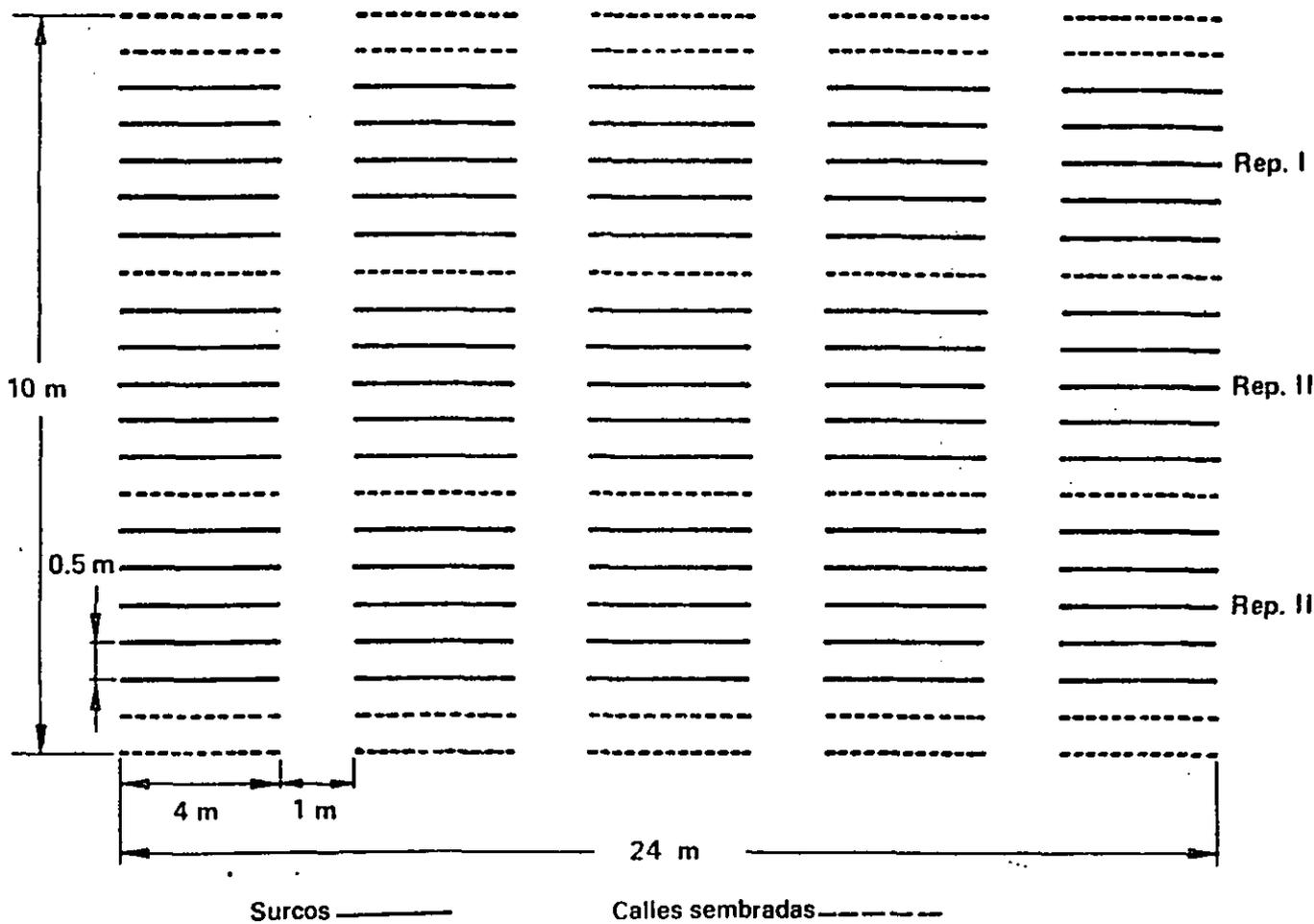


Figura 19.2. Ensayo de frijol en monocultivo con cinco tratamientos: sin inocular, alto N, y tres cepas de rizobios.

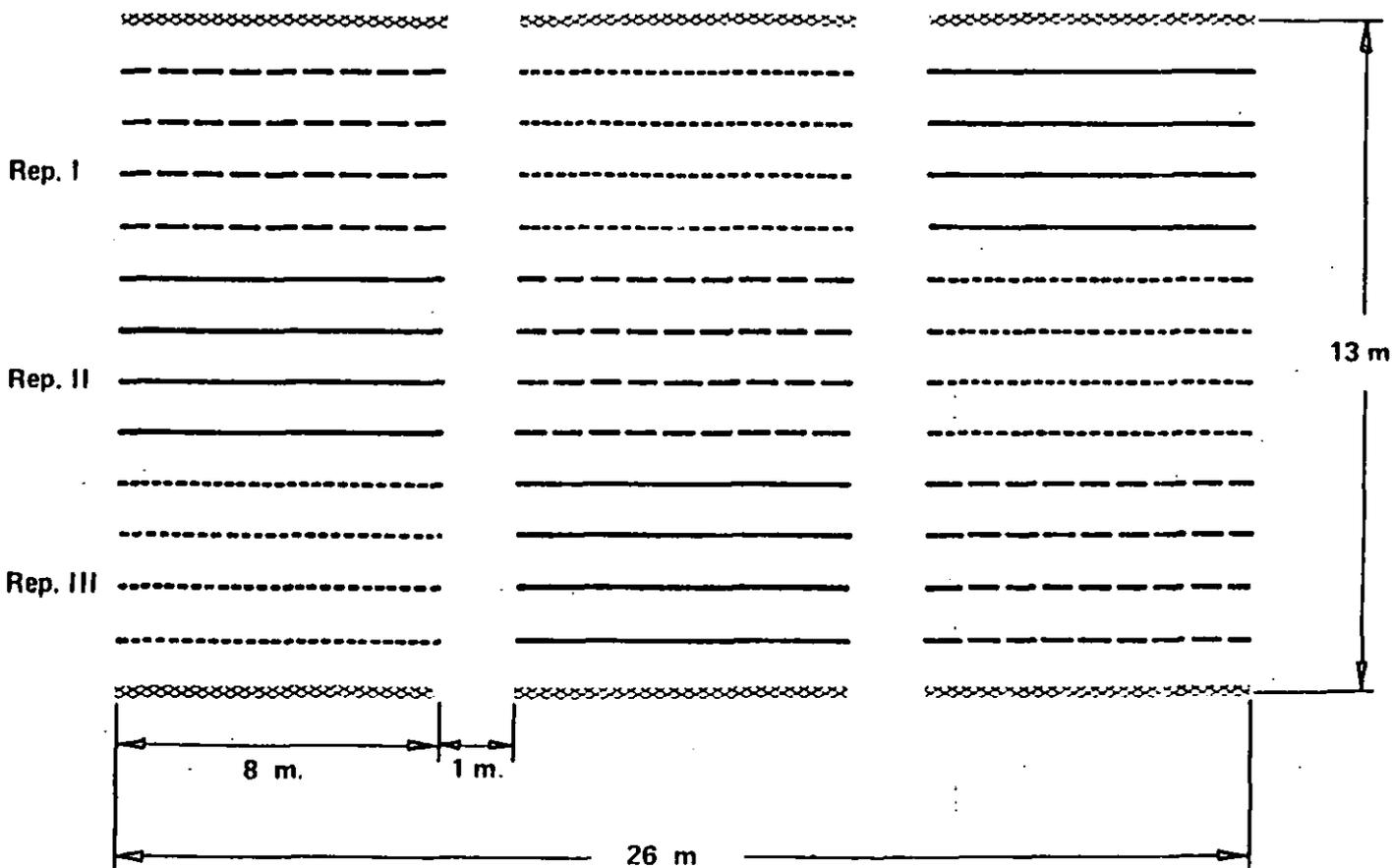


Figura 19.3. Ensayo de frijol en asociación con maíz, con tres tratamientos: sin inocular, alto N, y una cepa de rizobio.

en cajas Petri), una o dos semanas antes de la siembra; si el inoculante resulta ser de mala calidad, hay que prepararlo de nuevo. Un inoculante de buena calidad debe contener, por lo menos, 10^9 células de rizobio por gramo. Si no es posible evaluar la calidad de los inoculantes, al menos se debe tomar la precaución de prepararlos separadamente para cada repetición. Así se reduce el riesgo de que el inoculante de una cepa de rizobio sea de mala calidad en todos los bloques.

19.2.4 Cosecha y análisis

La cosecha, el análisis del tejido, y la evaluación de la nodulación se hacen según las instrucciones en los Capítulos 15, 16, 17, y 18. El análisis estadístico de los datos de rendimiento se hace también mediante el método que se describió en 19.1.4.

19.3 Inoculación en el campo

19.3.1 Inoculación de las semillas con inoculante en turba

La forma más sencilla de realizar la inoculación de las semillas es mezclar el inoculante con agua limpia y agregarlo directamente a las semillas. Este método, sin embargo, es poco efectivo, y por ello se recomienda adherir el inoculante a las semillas mediante un pegante y cubrirlas luego con un material protector, como la roca fosfórica, el carbón vegetal o la cal; este último procedimiento se denomina 'peletización' y el recubrimiento se ha denominado 'pelete' (del inglés 'pellet' = pella, píldora, gránulo). La roca fosfórica o el carbón vegetal se utilizan para 'peletizar' las semillas de la mayor parte de las leguminosas forrajeras; la cal se recomienda para el frijol (Phaseolus vulgaris) y para Leucaena sp.

La respuesta a la inoculación se puede mejorar si se agrega (en la proporción 1:3) MoO_3 o molibdato de amonio al material usado para la peletización, dada la importancia del molibdeno en el

proceso de fijación del nitrógeno. No se puede utilizar Na_2MoO_4 como fuente de Mo, porque este compuesto es tóxico cuando entra en contacto directo con los rizobios (Kerridge et al., 1973).

El pegante más adecuado es la goma arábiga comercial, que viene molida, y puede adquirirse en las droguerías de algunos países. Se ha sustituido por 'polvilho de mandioca' (almidón de yuca) en el Brasil (Seiffert y Miranda, 1983; Faria et al, 1985); también se puede usar una solución de metilcelulosa al 5%. El azúcar usado como pegante puede ejercer un efecto positivo en la sobrevivencia de los rizobios en las semillas (Burton, 1976). Más detalles sobre factores que afectan la efectividad de la inoculación se describen en Roughley (1970) y Brockwell (1982).

Las semillas se deben inocular el día de la siembra; si por algún motivo las semillas ya inoculadas no se pueden sembrar ese mismo día, deben lavarse e inocularse nuevamente el día de la siembra. Para ensayos sobre la simbiosis leguminosa-rizobio es aconsejable hacer la inoculación muy temprano en la mañana para poder iniciar la siembra y los recuentos en las siguientes horas, aún tempranas, de la mañana. Es importante incluir semillas adicionales en los tratamientos en que se tomen muestras para los recuentos; si la muestra es de 10 semillas, por ejemplo, se agregan esas 10 semillas antes de la inoculación.

Se recomienda inocular y evaluar separadamente las semillas de cada parcela: así se cubre el riesgo de que ocurra algún error en el proceso de inoculación. Además, si se inoculan a la vez todas las semillas de un tratamiento, habrá que separar después la cantidad necesaria para cada parcela, operación difícil porque las semillas inoculadas pesan más que las no inoculadas.

A continuación se describen los pasos que se siguen para inocular las semillas de leguminosas forrajeras usando goma arábiga como pegante (Figura 19.4).



1. Si las semillas están tratadas con fungicidas, lavarlas y secarlas.

Un día antes de la siembra:

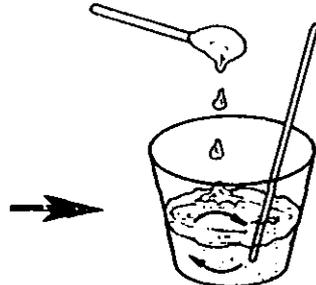
2. Preparar una solución de goma arábica al 40% en agua caliente (4 cucharadas rasas de goma molida por 5 cucharadas de agua).

El día de la siembra:

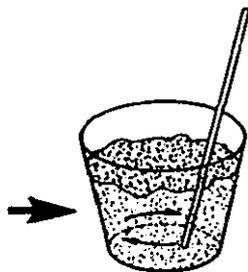
3. INOCULACION



Poner en un balde limpio 50 g de inoculante por kg de la semilla que se inoculará

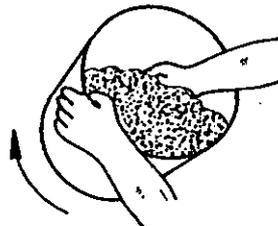


Agregar aproximadamente 30 ml (3 cucharadas soperas) de solución de goma por cada 50 g de inoculante, y mezclar bien



Agregar las semillas limpias y mezclar bien hasta que empiece a secar la goma (las semillas se despegan una de la otra)

4. PELETIZACION



Adicionar 300-400 g de roca fosfórica, o 100-150 kg de carbón vegetal molido, a la semilla, y mezclar muy suavemente con la mano, rotando el balde para recubrir bien las semillas.

5. SIEMBRA



Extender las semillas a la sombra para que sequen durante 15 a 20 minutos

Sembrar lo más pronto posible (antes de 24 horas) evitando que las semillas se calienten

Figura 19.4. Inoculación de semillas de leguminosas forrajeras.

.1 Preparación de la semilla

Las semillas con testa dura deben escarificarse antes de la inoculación. Cuando las semillas han sido tratadas con fungicidas, se deben lavar con agua abundante y secar al aire (por ej., encima de una toalla de papel) antes de inocularlas.

.2 Preparación de la goma

Preparar una solución de goma arábiga por lo menos un día antes de la siembra, así: se agregan 40 g de goma a 100 ml de agua limpia (8 cucharadas rasas de goma por 10 de agua) y se deja aparte la mezcla durante 12 horas hasta que se disuelva la goma; ésta se disolverá más rápidamente en agua caliente. Esta solución es perecedera y se debe guardar en el refrigerador; si no es posible hacerlo, se prepara nuevamente antes de cada siembra. Además, debe esterilizarse si se pretende hacer recuentos en cajas Petri.

.3 Inoculación

El día de la siembra, o la noche anterior, poner 50 g de inoculante por kilogramo de semilla que se inocular, en un balde o recipiente similar.¹ Es importante que estos recipientes estén bien limpios. Si se inocula con mezclas de cepas, los paquetes de inoculante de cada cepa se deben mantener separados hasta el momento de hacer la inoculación; se toman entonces cantidades iguales de cada cepa para completar, en total, 50 g de inoculante por kg semilla. Al inoculante depositado en el balde se agregan aproximadamente 30 ml (3 cucharadas soperas) de la solución de goma arábiga por cada 50 g de inoculante (de 12 a 14 gotas de goma arábiga por gramo de inoculante); se mezcla bien, y se agregan luego las semillas, revolviendo hasta que éstas empiecen a despegarse una de otra.

1. Si las semillas son grandes (Leucaena, soya, frijol, etc.) se puede reducir la tasa de inoculación (5 a 30 g de inoculante/kg de semilla).

.4 Peletización

A las semillas inoculadas se les agrega inmediatamente, y en una sola adición, de 300 a 400 g de roca fosfórica --o de 100 a 150 g de carbón vegetal molido-- por kg de semilla; esta cantidad depende del tamaño de las semillas, pero debe ser suficiente para que las recubra todas y quede además un sobrante en el fondo del recipiente. También se puede usar una mezcla de roca fosfórica con MoO_3 (3:1) o 500 g de CaCO_3 por kg de semilla. Peletizando semillas de Stylosanthes spp. se han detectado efectos negativos del fósforo en la respuesta a la inoculación, causados probablemente por la inhibición de las micorrizas; para estas especies, por tanto, debe preferirse el carbón vegetal.

Hacer girar el recipiente muy suavemente, hasta que se forme una capa firme de recubrimiento sobre cada semilla. Una semilla bien peletizada se ve completamente cubierta por la capa de roca fosfórica, de carbón vegetal o de cal. Después de peletizadas, las semillas se dejan extendidas a la sombra durante 20 minutos para que los peletes sequen y se endurezcan; este paso es importante para evitar que los peletes se descascaren más tarde.

.5 Siembra

Se debe evitar que las semillas peletizadas permanezcan guardadas durante más de 12 horas antes de la siembra, pues los rizobios pueden perder su efectividad por efecto de las toxinas producidas por la semilla y del desecamiento de las células. Se debe impedir también que las semillas se calienten y, si es posible, no sembrar en días muy calientes. Se deben tapar con un poco de tierra después de la siembra, y compactarlas con el pie o algún implemento.

.6 Recuento de los rizobios en las semillas inoculadas

Si no es posible hacer este recuento puede omitirse. Sin embargo, es recomendable hacerlo para lograr una mejor interpretación de los datos. El día de la siembra del ensayo se toma una muestra de las semillas inoculadas y se hace un recuento de rizobios según las instrucciones dadas en el Capítulo 11. Es preferible usar inoculantes con soporte estéril para poder aplicar el método de recuentos en cajas Petri, que es más sencillo que el método del NMP (ver Capítulo 10). Si se usan cajas Petri, es necesario hacer la inoculación en recipientes estériles, o en vasos desechables nuevos para cada parcela. Se debe esterilizar la goma arábica y la roca fosfórica, que pueden contener muchos hongos. Se puede también solicitar turba estéril al CIAT.

19.3.2 Uso del inoculante granulado

Para la inoculación de la tierra, se utilizan inoculantes líquidos (19.3.4), o se preparan inoculantes 'granulados'. Estos se pueden preparar utilizando turba u otro soporte molido y tamizado en malla 40, o mezclando inoculante en un soporte de partículas finas (malla 100) con aserrín. Se recomienda la inoculación de la tierra cuando las semillas hayan sido tratadas con pesticidas, cuando se deseen tasas altas de aplicación del inoculante, como en casos en que haya grandes poblaciones nativas de rizobios, y cuando se están sembrando muchas líneas de la misma especie.

El inoculante se esparce en el surco a una tasa de 0.1 a 1 g por metro de surco; para las tasas menores de inoculación, se puede mezclar el inoculante con aserrín u otro soporte inerte para facilitar la operación. Las semillas se colocan en el surco, y se cubren inmediatamente con un poco de suelo. Con este método se aplican fácilmente 10^8 rizobios por metro de surco, lo que representa un nivel alto de inoculación. Si el fertilizante se

aplica en el momento de sembrar, se puede colocar en el mismo surco cubriéndolo con un poco de suelo antes de colocar el inoculante; también se puede aplicar en banda al lado del surco. Si se siembran las semillas en huecos y no en surcos (tal como se hace con el frijol voluble), se coloca de 0.5 a 1 g de inoculante, junto con la semilla, en cada hueco.

Los inoculantes que contengan más de una cepa se deben mezclar inmediatamente antes de la siembra y, como se hace con todos los inoculantes, se deben tomar muestras para evaluar su calidad. Cuando sea posible, los inoculantes granulados se almacenan en el refrigerador, y la inoculación se hace durante las horas menos cálidas del día; por lo demás, no se requieren instrucciones especiales para su utilización.

19.3.3 Uso de los inoculantes liofilizados enviados por el CIAT

Cuando no haya en una localidad condiciones adecuadas para la preparación de los inoculantes, se pueden solicitar inoculantes liofilizados al CIAT. Estos pueden usarse de tres modos:

- reconstituidos en turba estéril y peletizando las semillas;
- suspendidos en aceite mineral;
- suspendidos en agua.

En los ensayos de evaluación de cepas y en los ensayos regionales, se recomienda usar un inoculante reconstituido en turba estéril, y utilizarlo como se indicó en los puntos 19.3.1 y 19.3.2, hasta que se haya investigado más detalladamente el uso de los inoculantes suspendidos en aceite mineral.

.1 Reconstitución en turba

Las células liofilizadas vienen en ampollas (0.1 ml de células) o en frascos como los utilizados para envasar vacunas (1 ml de células). En una ampolla debe haber suficientes células de rizobios (10^9) para reconstituir 7.5 g de inoculante; la cantidad

de células en los frascos (10^{10}) debe ser suficiente para reconstituir 75 g de inoculante. Se enviarán cantidades apropiadas de células según la cantidad de semillas que se siembre; se enviará además turba estéril, empacada en bolsas de 5 o 50 g, y jeringas estériles. El usuario debe proveerse de agua esterilizada. El Cuadro 19.1 resume el procedimiento de la reconstitución.

Si se trabaja con turba estéril, y se emplea técnica estéril (agua, jeringas, y otros elementos esterilizados) para mezclar las células con la turba --es decir, mezclando directamente en la bolsa mediante inyección, para evitar que se introduzcan hongos-- la calidad del inoculante mejora si se mantiene a temperatura ambiental (25-30 °C) durante una o dos semanas, puesto que hay crecimiento de los rizobios en la turba. Este inoculante se puede guardar en el refrigerador (4 °C) durante seis meses.

.2 Suspensión en aceite mineral

El inoculante suspendido en aceite mineral se distribuye en frascos pequeños como los utilizados para envasar vacunas. Los frascos contienen también dos perlas de vidrio. Para usarlo, se agita bien, y se aplica su contenido a 1 kg de semillas pequeñas, o a 10 kg de semillas grandes. Se mezcla bien, y se siembran las semillas lo más pronto posible.

.3 Suspensión en agua

Se pueden suspender los inoculantes liofilizados en agua para aplicarlos por aspersion (ver 19.3.4).

19.3.4 Uso de inoculantes líquidos

El inoculante líquido puede utilizarse para inocular el suelo antes o después de la siembra, y para inocular el material vegetativo. Este procedimiento no es tan efectivo como la

Cuadro 19.1 Reconstitución de los inoculantes a partir de células liofilizadas de rizobios.

Células en ampollas de 0.1 ml	Células en frascos de 1 ml
1. Esterilizar agua destilada (o agua corriente) en un frasco con tapa de rosca o tapado con papel de aluminio, en un autoclave u olla de presión, y enfriarla*	1. Esterilizar agua destilada (o agua corriente) en un frasco con tapa de rosca o tapado con papel de aluminio, en un autoclave u olla de presión, y enfriarla*
2. Romper la ampolla hacia la mitad del espacio ocupado por el tapón de algodón, usando una lima.	2. Limpiar tanto la superficie de una bolsa de turba estéril de 50 g como la tapa del frasco, con alcohol. Inyectar 20 ml agua estéril en la bolsa de turba con una jeringa estéril de aguja larga.
3. Inyectar 0.5 ml de agua hervida (a temperatura ambiental) a la ampolla, usando una jeringa de 5 ml estéril, con aguja larga. Se usa una jeringa diferente para cada cepa.	3. Inyectar aire al frasco, con una jeringa diferente para cada cepa.
4. Mezclar las células con el agua, y retirar la suspensión con la jeringa.	4. Inyectar 2 ml de agua estéril (a temperatura ambiental) al frasco usando la misma jeringa estéril.
5. Introducir más agua hervida en la jeringa hasta completar un volumen de 2.5 ml.	5. Mezclar las células con el agua, y retirar en suspensión empleando la jeringa.
6. Limpiar la superficie de una bolsa de turba de 5 g con alcohol. Inyectar la suspensión de células.	6. Inyectar las células en la bolsa de turba por el mismo hueco hecho para inyectar el agua.
7. Manipular la bolsa hasta asegurarse de que haya una buena homogeneización de las células con la turba. Marcar la bolsa con el número de la cepa y con la fecha. Tapar el hueco dejado por la jeringa con cinta pegante, después de una semana.	7. Manipular la bolsa hasta asegurarse de que haya una buena homogeneización de las células con la turba. Marcar la bolsa con el número de la cepa y con la fecha. Tapar el hueco dejado por la jeringa con cinta pegante después de una semana.
8. Guardar en el refrigerador a 4 °C. Puede usarse hasta seis meses después de la preparación.	8. Guardar en el refrigerador a 4 °C. Puede usarse hasta seis meses después de la preparación.

* Se puede usar también agua hervida durante media hora en un recipiente tapado, aunque esta operación no esterilice el agua. En este caso se debe usar el inoculante inmediatamente.

inoculación de las semillas, por lo cual se recomienda una dosis de, al menos, 10^6 células de rizobios por metro de surco.

Para inocular una hectárea en que la distancia entre surcos es de 0.75 m, se suspende ya sea el contenido de diez frascos de 1 ml del inoculante liofilizado o ya 1000 g del inoculante en turba, en un volumen grande de agua sin cloro (100 a 150 litros/ha). Utilizando una bomba de espalda, se asperjan los surcos con la suspensión antes de la siembra o después de la emergencia de las plántulas. Para un área de 0.1 ha, se usa un frasco de inoculante liofilizado (1 ml) o 100 g de inoculante en turba.

Para la siembra del material vegetativo (por ejemplo, el de Arachis pintoi), se utilizan aproximadamente 150 plantas o estolones por 100 m lineales, y 0.05 g de inoculante por estolón. Se puede inocular así: se mezclan 1000 g del inoculante en turba con 600 ml de goma arábiga, y se agrega suficiente agua sin cloro (aproximadamente, 20 litros) para asperjar con la mezcla el material vegetativo calculado para sembrar una hectárea (con surcos distantes entre sí 0.75 m). Para facilitar la operación, se inoculan cantidades menores de material; por ejemplo, para 500 m lineales se necesitan 37.5 g (medio paquete de 75 g) de inoculante, 20 ml (2 cucharadas) de goma arábiga, y 0.75 l (5 pocillos) de agua. Se revuelve el inoculante con el material vegetativo, para que quede bien distribuido, inmediatamente antes de la siembra.

19.4 Cepas recomendadas

En el Apéndice C, Cuadro C-1, se enumeran cepas de rizobios aptas para varias especies de leguminosas forrajeras; son cepas serológicamente diferentes, y han sido probadas como efectivas en el suelo de Carimagua, Llanos Orientales de Colombia. En el Cuadro C-2 se enumeran las cepas de Rhizobium leguminosarum biovar. phaseoli que han sido probadas como efectivas en suelos ácidos, en climas fríos y cálidos, para el frijol. Los Cuadros C-3 y C-4

contienen las cepas recomendadas por el CIAT para los ensayos regionales de pastos tropicales. En el Cuadro C-5 se enumeran algunas cepas recomendadas por otras instituciones.

Las cepas marcadas (ser. =) son serológicamente iguales. Se sugiere que en los ensayos de inoculación se incluya una cepa recomendada para la leguminosa que se estudia (Cuadros C-3, C-4 y C-5) y, si es posible, dos cepas de las enumeradas en los Cuadros C-1 y C -2, que sean serológicamente diferentes.

Estos listados de cepas se revisan cada año. Si se pretende montar un ensayo de evaluación de cepas, se sugiere solicitar información actualizada al CIAT sobre ese punto.

Después de haber seleccionado las combinaciones leguminosa-rizobio que muestren los mayores rendimientos en las Etapas 1 y 2, es necesario evaluar, en los genotipos seleccionados bajo las condiciones de los agricultores, su respuesta a la inoculación, o su rendimiento, o ambas cosas (Etapa 3). Se hacen estos ensayos paralelamente a las últimas etapas de selección de las leguminosas. Cuando el mejoramiento en la simbiosis no se expresa en las condiciones de la finca, es necesario hacer ensayos para explicar los efectos observados, y hacer recomendaciones más relevantes. Algunas de esas condiciones pueden influir en la mineralización del nitrógeno, dificultando así la interpretación de los resultados de ensayos que estudian las interacciones entre los factores de manejo y las respuestas a la inoculación. Sin embargo, si se mide la mineralización del nitrógeno en los diferentes tratamientos --como se describió en el Capítulo 18-- es posible determinar si las mayores tasas de mineralización del nitrógeno coinciden con las menores respuestas a la inoculación. Se sugiere que, en los ensayos donde se espera que los factores estudiados modifiquen los niveles de nitrógeno mineral, se incluya siempre un testigo en que se procure minimizar la tasa de mineralización del nitrógeno, con inoculación y sin ella.

20.1 Técnicas de inoculación

Las diferentes técnicas de inoculación no afectan, probablemente, los niveles de nitrógeno mineral en el suelo.

En los ensayos sobre técnicas de inoculación, se emplean testigos sin inocular y fertilizados con nitrógeno, y tratamientos en que hay una misma cepa y diferentes técnicas de inoculación. Por ejemplo:

- Inoculación al suelo e inoculación a la semilla

- Tipos de inoculantes:

. Liofilizado

. Convencional, con diferentes soportes (carbón, suelo, cáscara de arroz o de algodón)

- Efecto de fungicidas en la respuesta a la inoculación

Es necesario determinar, al momento de la siembra, el número de rizobios inoculados en cada tratamiento, para poder interpretar correctamente los resultados.

20.2 Sistemas de labranza y monocultivo vs. cultivo asociado

Los sistemas de labranza y de siembra afectan probablemente la tasa de mineralización y la disponibilidad del nitrógeno y, por consiguiente, las respuestas a la inoculación que se observen.

Se sugiere hacer, con cepas que hayan demostrado ser efectivas bajo las condiciones de mínima disponibilidad de nitrógeno mineral impuestas en la Etapa 2, ensayos en que se comparen los diferentes sistemas de siembra empleados por los agricultores de la región. Estos sistemas se establecen como parcelas, y los tratamientos --con inoculación y sin ella-- como subparcelas. Sylvester-Bradley y Mosquera (1985) describen un ensayo de este tipo en que se observó que la respuesta a la inoculación fue más notoria cuando se empleó la labranza reducida para establecer las leguminosas.

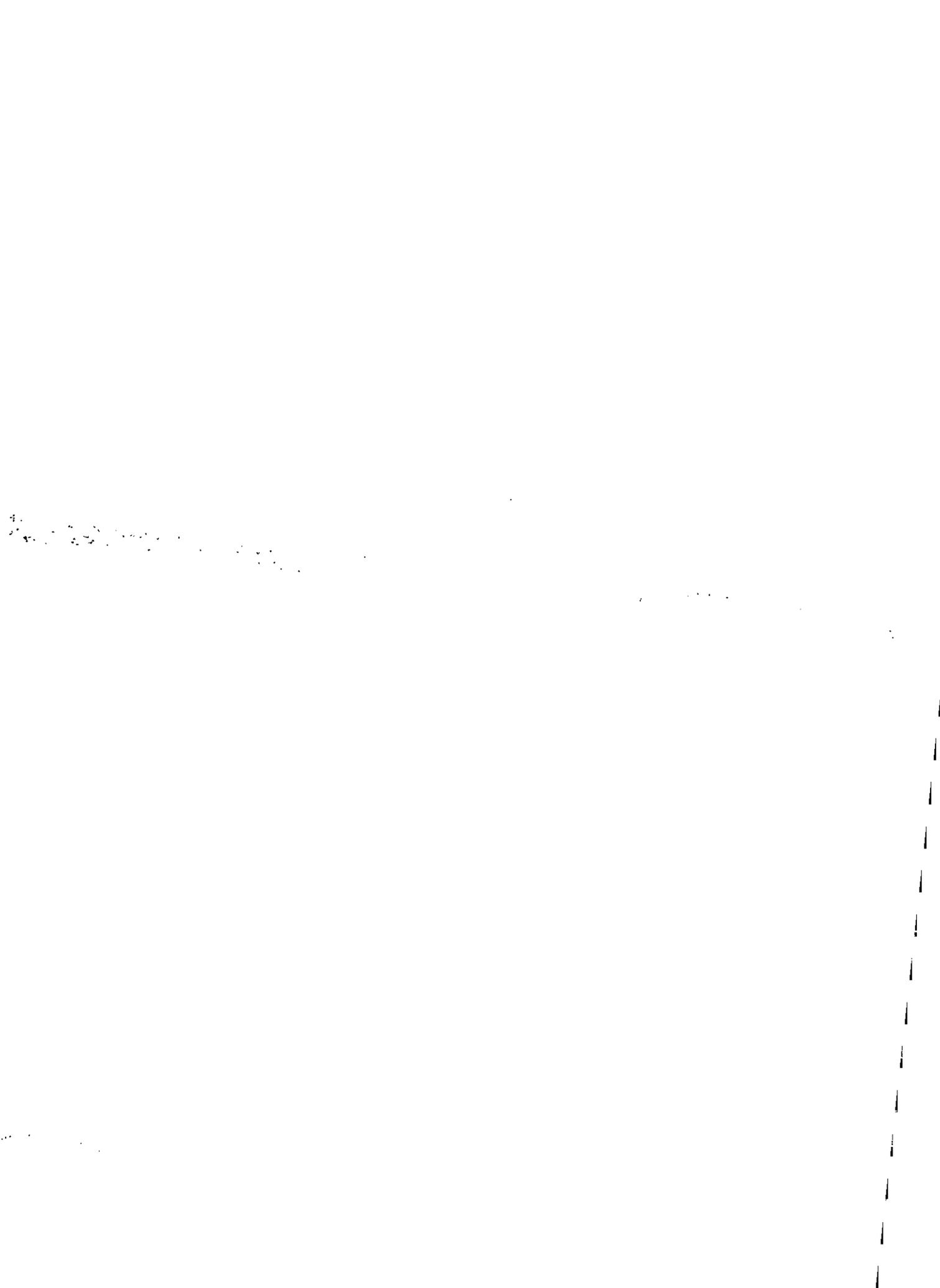
20.3 Niveles de fertilidad

Se sabe ya que los niveles de fertilidad en los suelos tropicales, especialmente los de fósforo y de molibdeno, como también los niveles de pH afectan la fijación del nitrógeno en leguminosas. Los niveles de fertilización que aplican los agricultores son, con frecuencia, bajos. Por eso es importante conocer la interacción entre la respuesta a la inoculación y los niveles de fertilización comúnmente empleadas por los agricultores.

Para evaluar el efecto de tres nutrimentos en doce tratamientos solamente, se ha desarrollado el diseño San Cristóbal (Salinas y Goedert, en impresión). Con este diseño se evalúan dos niveles de cada nutrimento en un arreglo factorial de 8 tratamientos, y en 4 tratamientos adicionales se estudian algunas combinaciones de dos niveles adicionales de cada nutrimento. Un ejemplo se muestra en el siguiente cuadro:

Tratamiento no.	Nivel del nutrimentos:		
	P	K	Mo
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	0	0	1
5	1	1	0
6	1	0	1
7	0	1	1
8	1	1	1
9	0.5	0.5	0.5
10	1.5	0.5	0.5
11	0.5	1.5	0.5
12	0.5	0.5	1.5

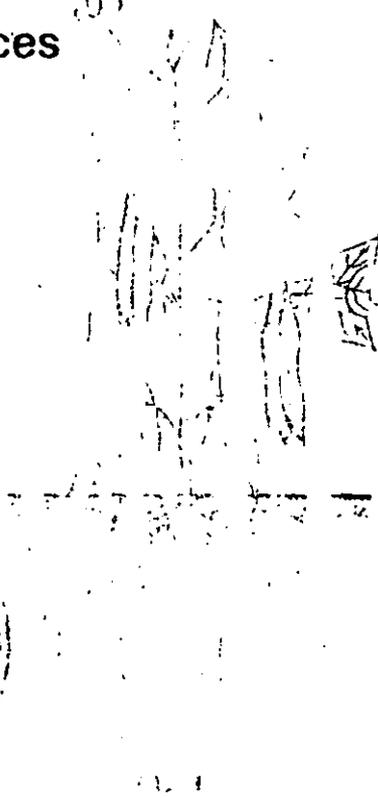
Se sugiere que se inoculen los doce tratamientos con una cepa recomendada. Para incluir en el mismo ensayo tratamientos adicionales, en que se evalúan interacciones con la inoculación, se escogerían además cuatro tratamientos para establecerlos sin inoculación, por ejemplo, los nos. 3, 5, 7 y 8, para estudiar la interacción entre fósforo, molibdeno e inoculación. En total, habría 16 tratamientos por leguminosa. Sería necesario entonces aumentar el tamaño de las parcelas para que haya un número de plantas suficientes que permita evaluar la nodulación, y ampliar además las calles entre las parcelas para evitar la contaminación.

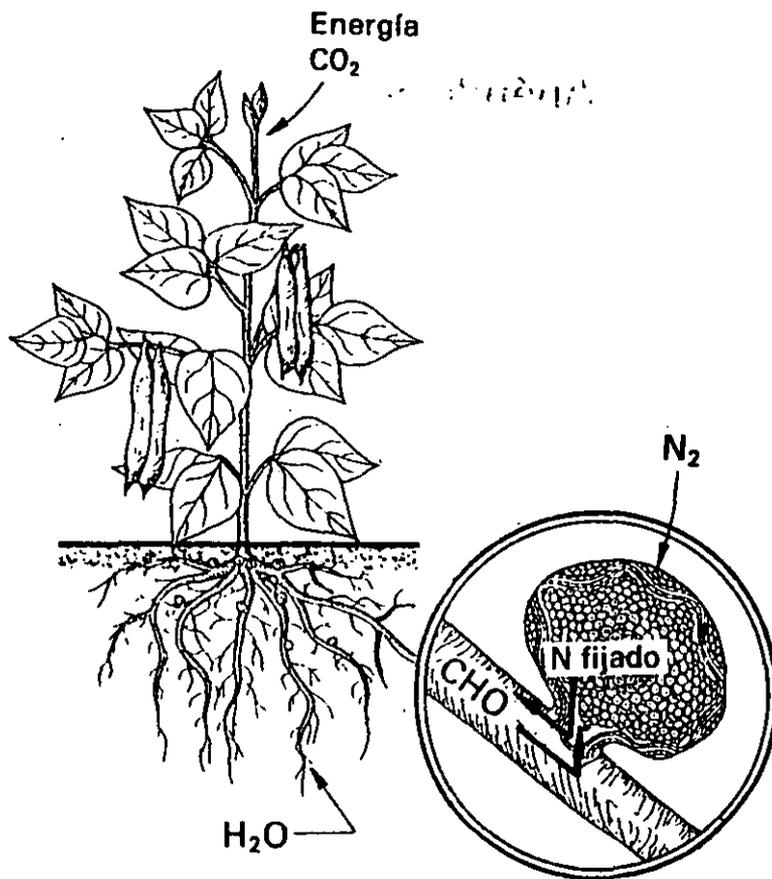


010101

01

Apéndices





Apéndice A

CONSTRUCCION DE UNA CAMARA ESTERIL (según diseño de NIFTAL)

La cámara estéril es una alternativa menos costosa que una cámara de flujo laminar, y más efectiva que las cámaras de siembra con luz ultravioleta comúnmente usadas en los laboratorios de microbiología, en las cuales un flujo de aire no estéril pasa por la cámara mientras se trabaja. Norris y Date (1976) y Somasegaran y Hoben (1985) describen dos modelos para este tipo de cámara. En la cámara aquí descrita, el mechero Bunsen esteriliza el aire que, entrando por el mismo orificio que contiene el mechero y saliendo por la abertura delantera (Figura A-1), circula a través de la cámara. Para evitar el peligro de una explosión, se debe desconectar completamente el gas mientras la cámara no esté en funcionamiento.

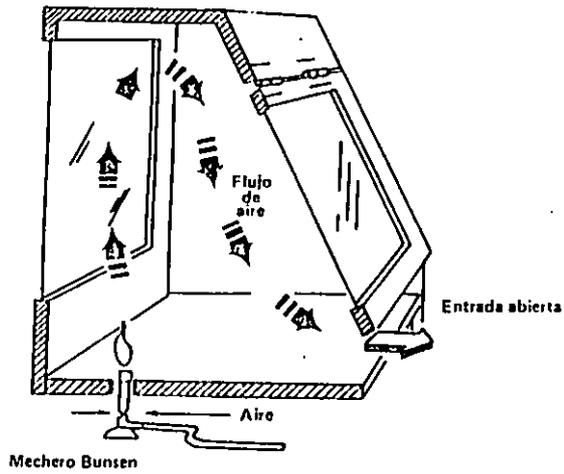
La altura de la cámara se ajusta para facilitar el manejo cómodo de las pipetas; debe reposar, por tanto, sobre una mesa alta.

Componentes de la cámara

- 1) Fondo de triplex (madera terciada, de láminas prensadas), y marco hecho de madera y cristal de 0.12 a 0.5 cm de espesor (Figura A-2).
- 2) Piso: de triplex de superficie lisa, o recubierto de fórmica.
- 3) Techo: de triplex.
- 4) Refuerzo de triplex o madera para sujetar la puerta.
- 5) Puerta de cristal, o de cristal plástico, con marco de madera, fijada con bisagras al componente 4).
- 6) Dos lados de triplex.

- 7) Ocho molduras de madera (de 90 y 44 cm de largo) para sostener el cristal de la puerta.
- 8) Ocho molduras de madera (de 90 y 51 cm de largo) para sostener el cristal de la ventana de atrás.
- 9) Cuatro patas de 10 cm de altura.

El triplex deberá tener de 1.5 a 2.0 cm de grosor, y la superficie de ambas caras será lisa o estará recubierta con fórmica.



Corte Transversal de la Cámara.

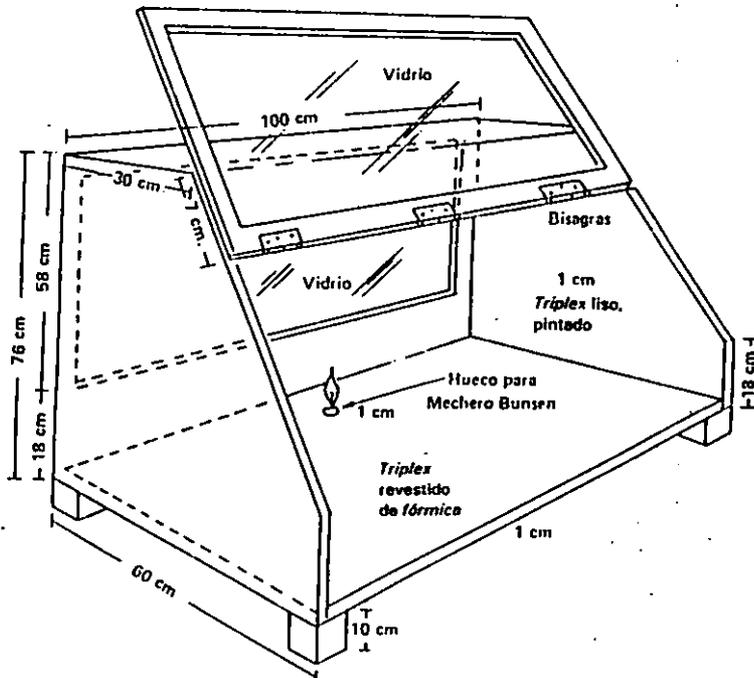


Figura A-1. Modelo sencillo de una cámara estéril (diseño de NIFTAL).

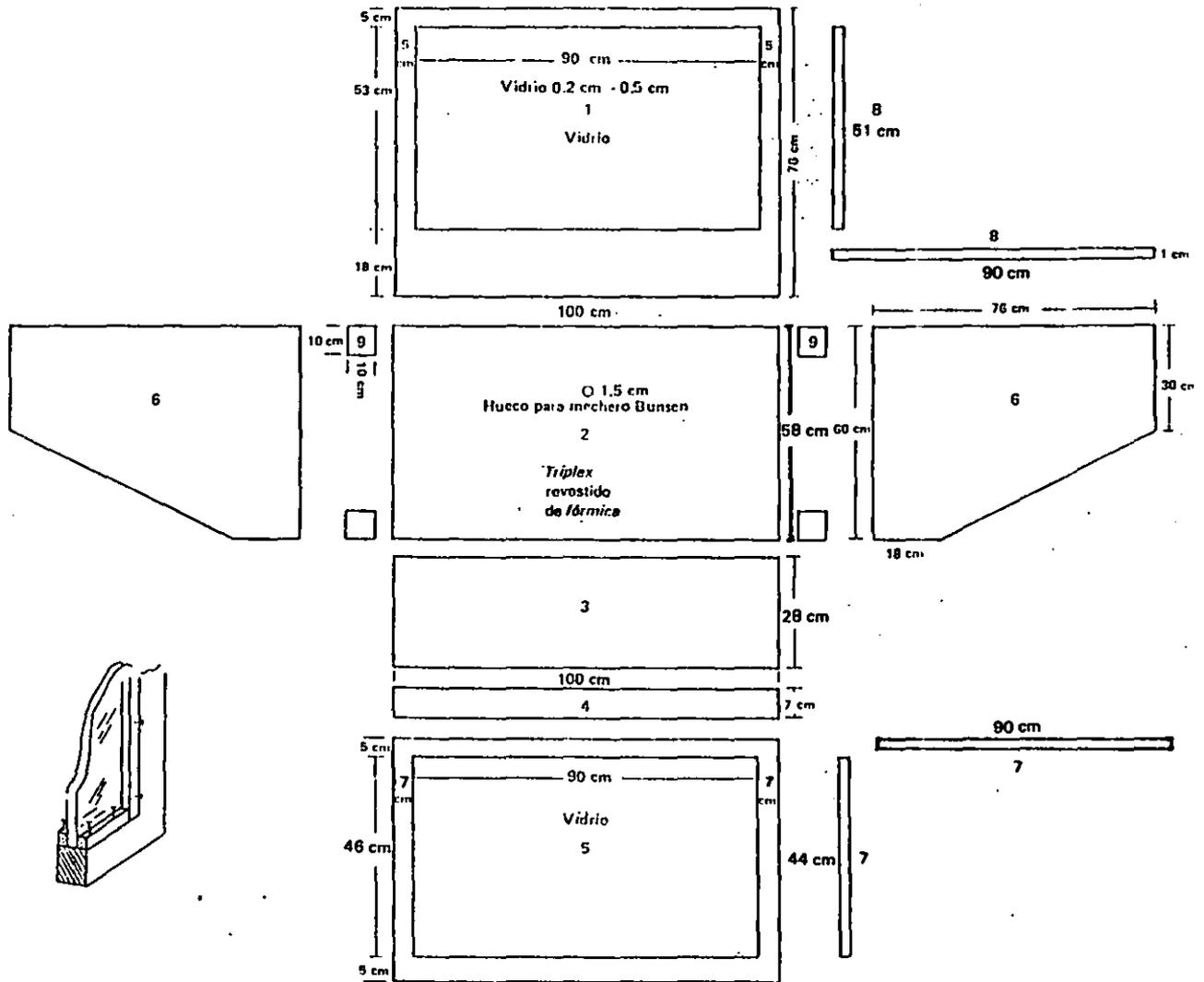
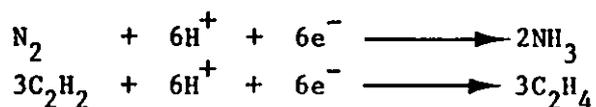


Figura A-2. Plano con especificaciones para la construcción de una cámara estéril (diseño de NifTAL).

Apéndice B

METODO DE LA REDUCCION DEL ACETILENO

Este método ha sido usado desde 1968 para evaluar la fijación del N_2 por diferentes sistemas simbióticos y asimbióticos. Se basa en el hecho de que la enzima nitrogenasa reduce no sólo N_2 sino también C_2H_2 (acetileno), N_2O , CH_3NC y otros sustratos. La reducción de C_2H_2 a C_2H_4 (etileno) es fácil de medir utilizando un cromatógrafo de gas provisto de un detector de ionización de llama. El acetileno es un sustrato preferido por la enzima y, en consecuencia, la reducción de N_2 a NH_4^+ resulta inhibida en su presencia. Teóricamente, se reducen tres moléculas de C_2H_2 por cada molécula de N_2 fijada:



En la realidad sin embargo, esta relación (3:1) varía ampliamente; por ello se considera que este método no debe emplearse para hacer estimaciones cuantitativas de la fijación de N_2 (Minchin et al., 1983). Por lo demás, puede usarse para hacer estimaciones relativas de la actividad de la nitrogenasa, que serán complementadas por otras observaciones (nodulación, rendimiento, etc.).

Procedimiento

Se utiliza un cromatógrafo de gas con detector de ionización de llama. Para separar etileno y acetileno, se puede usar una columna de 2 m con Porapak N (Malla 80-100), con N_2 como gas de arrastre (flujo 30 ml/min), y una temperatura del horno de 50 a 100 °C.

1. El acetileno puede producirse a partir del carburo de calcio (CaC_2 , Figura B-1) o se extrae de un cilindro a presión. En este último caso se debe guardar en un neumático provisto de un tubo de caucho; las muestras de gas se sacan siempre de este tubo para evitar dañar el neumático. Algunas fuentes de acetileno comerciales tienen contaminantes, y sólo se deben utilizar después de purificadas.

2. Revisar el cromatógrafo para asegurarse de que esté funcionando bien y que haya suficiente gas para todo el ensayo.
3. Preparar con anticipación frascos de tamaño adecuado para colocar en ellos las raíces de la leguminosa. Estos frascos pueden ser de mermelada, de mayonesa, o de otros productos; las tapas deben tener un sello especial para inyecciones, o un forro de caucho, para permitir la toma de muestras con una jeringa a través de ellas; se puede usar la tapa metálica adaptándole un empaque de caucho de neumático cortado exactamente por el diámetro interno de la tapa, y perforando la tapa en dos o tres sitios para introducir la jeringa (Figura B-2). Para sellar mejor la tapa se puede aplicar grasa o vaselina en el borde del frasco. El tamaño del frasco es importante: ni tan pequeño que las raíces queden demasiado apretadas, ni tan grande que se diluya mucho el C_2H_4 .
4. Cosechar las plantas, una a una, durante las primeras horas del día (entre las 6 y las 10 a.m.) para evitar las más cálidas. Es aconsejable cosechar sólo una repetición por día si el ensayo es grande.
5. Colocar las raíces de las plantas en los frascos inmediatamente después de cosechadas y sin lavarlas, ya que el agua puede inhibir el intercambio de los gases; para mantener la humedad de las raíces sin mojarlas, se puede colocar una toalla de papel húmeda dentro del frasco. Conviene asegurarse de que el frasco queda bien cerrado para evitar el escape o difusión de los gases durante el procedimiento.
6. Inyectar aproximadamente un 10% del volumen del frasco --la medida ha de ser exacta-- con acetileno¹; por ejemplo, a un frasco de 240 ml se le inyectan 24 ml de C_2H_2). La jeringa se bombea tres veces y luego se retiran 24 ml de gas del frasco para dejar la presión en

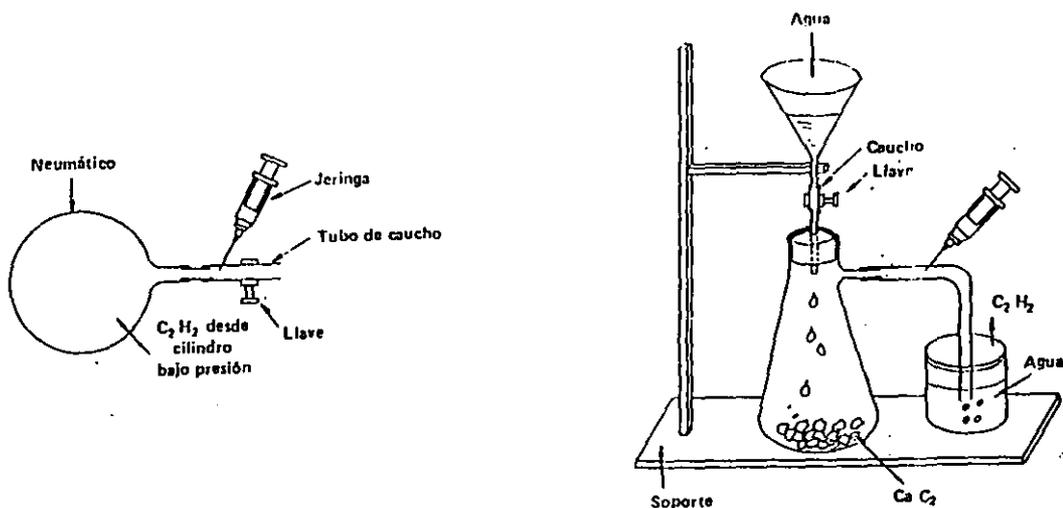


Figura B-1. Dos alternativas para establecer una fuente de C_2H_2 .



Figura B-2. Incubación de las raíces noduladas.

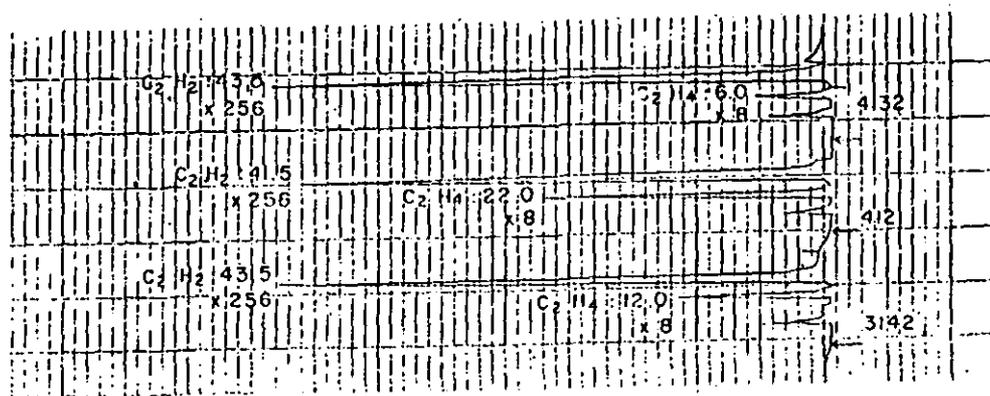


Figura B-3. Ejemplos de picos de etileno y acetileno formados por tres muestras de gas en el cromatógrafo. El primer pico formado después de la inyección (\leftarrow) no se toma en cuenta.

su interior igual a la presión ambiental, y evitar así el escape de gases. Otro método consiste en remover más o menos 30 ml de aire del frasco y luego agregar los 24 ml de acetileno. Equilibrar luego la presión insertando una aguja momentáneamente. Se debe anotar la hora exacta de la inyección; y utilizar jeringas plásticas desechables (50 ml) con agujas delgadas.

7. Pasados 30, 60 y 90 minutos después de la inyección, mezclar bien, bombeando con una jeringa desechable de 1 ml, sacar una muestra de 0.5 ml, e inyectarla en el cromatógrafo. Si no es posible leer las muestras inmediatamente, se pueden inyectar 7 o 10 ml en 'Vacutainers' (tubos de ensayo especiales para conservar muestras de sangre) y guardarlas durante varios días. No obstante, es preferible inyectar las muestras inmediatamente para evitar escapes de los gases.
8. Medir la altura del pico dibujado por ambos gases (C_2H_2 y C_2H_4), cambiando la atenuación en el cromatógrafo después de que aparezca el pico del C_2H_4 , para poder leer el pico del C_2H_2 . Por ejemplo, en el cromatógrafo Perkin Elmer del CIAT se lee el etileno en x8, x16 o x32, y el acetileno en x128 o x256 (Figura B-3). Si la altura del pico del C_2H_2 es baja en comparación con la de las otras muestras, se debe inyectar de nuevo la muestra para comprobar si ha ocurrido escape de gases durante la inyección o en el frasco de incubación; en este último caso, los valores de reducción del acetileno no son confiables y esa muestra se debe considerar como parcela perdida.
9. Calibración del cromatógrafo:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol de gas (20 } ^\circ\text{C y 760 mm)} &= 10^6 \text{ } \mu\text{mol} \\ &= 24 \times 10^3 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$1 \text{ ml de gas} = \frac{10^6 \text{ } \mu\text{mol}}{24 \times 10^3 \text{ ml}} = 41.7 \text{ } \mu\text{moles}$$

Para obtener la curva de calibración, se toma un patrón de C_2H_4 a 995 ppm y se calcula el promedio de altura (a una atenuación x8) de los picos de cinco inyecciones de 0.5 ml del gas.

$$\text{volumen de } C_2H_4 \text{ inyectado} = 0.5 \text{ ml} \times \frac{995}{10^6}$$

$$\mu\text{moles de } C_2H_4 = 0.5 \text{ ml} \times \frac{995}{10^6} \times 41.7 \mu\text{mol/ml}$$

$$= 20,746 \times 10^{-6} \mu\text{mol de } C_2H_4$$

Si estos $20,746 \times 10^{-6} \mu\text{mol}$ de C_2H_4 producen un pico de altura de 10 unidades del cromatógrafo de gas (UCG) con una atenuación x8, el factor de calibración (F) es igual a

$$F = 2074.6 \times 10^{-6} \mu\text{mol } C_2H_4/\text{UCG}$$

en esta atenuación (x8). Entonces, en atenuación x1,

$$F = \frac{1}{8} \times 2074.6 \times 10^6 \mu\text{mol } C_2H_4/\text{UCG}$$

$$= 259.3 \times 10^{-6} \mu\text{mol } C_2H_4/\text{UCG}$$

Es importante calibrar el cromatógrafo varias veces durante el ensayo, porque su sensibilidad puede variar durante el día.

10. Para calcular $\mu\text{moles } C_2H_4/\text{planta}$ por hora, se procede así:

$$\frac{240(v)}{0.5(i)} \times \frac{\text{UCG} \times F}{h \times \text{plantas (no.)}} = \mu\text{moles } C_2H_4/\text{planta por hora}$$

Donde:

v = volumen de botella de incubación (ml)

i = volumen inyectado al cromatógrafo (ml)

UCG = altura del pico corregido a la atenuación x1
 F = factor de calibración ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{UCG}$)
 h = horas de incubación
 plantas (no.) = número de plantas en el frasco

Ejemplo: $F = 259 \times 10^{-6}$ μmoles

Pico: 48 UCG en atenuación x8 = 384 UCG en atenuación x1

Incubación = 1 h, con dos plantas por botella

Por tanto:

$$\frac{240}{0.5} \times \frac{384 \times 259 \times 10^{-6}}{1 \times 2} = 23.9 \mu\text{moles/planta por hora}$$

Apéndice C

CEPAS RECOMENDADAS

Cuadro C-1 Cepas de rizobios para leguminosas forrajeras tropicales, efectivas en el suelo de Carimagua (mayo, 1987)

Género legum.	Cepa CIAT No.	Efectiva en:		Origen de la cepa
		Especie leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	
<u>Desmodium</u>				
	46	<u>D. ovalifolium</u>	(350)	SU 462 (Australia)
	2335	<u>D. ovalifolium</u>	(350, 3666, 3784, 3788)	<u>D. ovalifolium</u> , suelo Belem CPATU, Brasil
	2372	<u>D. incanum</u>	(13032)	<u>D. incanum</u> , Carimagua Colombia
	2434	<u>D. ovalifolium</u>	(3776, 3788, 3794)	<u>Macroptilium atropurpureum</u> con suelo de kudzú, km 60 Manaus, Brasil.
	2469	<u>D. heterophyllum</u> <u>D. ovalifolium</u>	(349) (3666, 3784)	<u>D. heterophyllum</u> , Carimagua, Colombia
	3030	<u>D. incanum</u>	(13032)	<u>D. incanum</u> , Carimagua Colombia
	3101	<u>D. ovalifolium</u>	(3776, 3788)	<u>Centrosema plumieri</u> S. Nevada, Colombia.
	3418	<u>D. ovalifolium</u>	(3666, 3784, 3776, 3788, 3794, 13089)	<u>D. ovalifolium</u> , Thailandia
		<u>D. heterocarpon</u>	(365)	
	4099	<u>D. ovalifolium</u>	(13089)	CB 2085 (Australia)
<u>Centrosema</u>				
	49	<u>C. pubescens</u> <u>C. acutifolium</u>	(438) (5112, 5277, 5568)	CB 1923 (Australia) CI01A
		<u>C. macrocarpum</u>	(5434, 5744, 5887)	

(Continúa)

Cuadro C-1 (Continuación)

Género legum.	Cepa CIAT No.	Efectiva en:		Origen de la cepa
		Especie leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	
	590 (ser. = 1670)	<u>C. pubescens</u> <u>C. macrocarpum</u> <u>C. acutifolium</u>	(5050) (5065, 5744) (5112, 5277, 5568)	<u>C. sp.</u> México (= TAL 1146)
	1670	<u>C. pubescens</u> <u>C. brasilianum</u> <u>C. macrocarpum</u> <u>C. acutifolium</u>	(438, 5052) (5234) (5065, 5744, 5434, 5713, 5452) (5112, 5568)	<u>C. pubescens</u> , 20 km Cárdenas-Coatzacoal México RAD 87/03
	1780	<u>C. pubescens</u> <u>C. acutifolium</u> <u>C. macrocarpum</u>	(438) (5112, 5568) (5065, 5434, 5713, 5737, 5744, 5887) 5452	<u>C. pubescens</u> , Pucallpa Perú RAD 179, USM 102
	2290 (ser. = 1670)	<u>C. acutifolium</u> <u>C. macrocarpum</u>	(5112, 5568) (5065, 5737, 5744)	<u>C. sp.</u> Guamal, Meta, Colombia
	2348 (ser. = 1670)	<u>C. macrocarpum</u>	(5065, 5744, 5887)	<u>C. pubescens</u> 5052 Carimagua
	3101	<u>C. macrocarpum</u> <u>C. acutifolium</u>	(5065, 5062, 5713, 5744, 5887, 5434, 5452) 5568	<u>C. macrocarpum</u> Santa Marta, Colombia
	3111	<u>C. macrocarpum</u>	(5062, 5744, 5713, 5452)	<u>C. macrocarpum</u> Brasil
	3196	<u>C. macrocarpum</u>	(5065, 5062, 5744, 5887)	<u>C. macrocarpum</u> ERA, Paragominas, Brasil
	3334 (ser. = 1670)	<u>C. brasilianum</u> <u>C. acutifolium</u> <u>C. macrocarpum</u>	(5234) (5112) (5065, 5744)	<u>C. macrocarpum</u> 5393 (Invernadero CIAT)

(Continúa)

Cuadro C-1 (Continuación)

Género legum.	Cepa CIAT No.	Efectiva en:		Origen de la cepa
		Especie leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	
	3694	<u>C. acutifolium</u> <u>C. macrocarpum</u>	(5112, 5568) (5744, 5877, 5713, 5452)	<u>C. bifidum</u> 15087 S. Rita, Vichada, Colombia
<u>Stylosanthes</u>	71	<u>S. guianensis</u>		<u>Stylosanthes</u> sp. Huila, Colombia (= TAL 658)
	870	<u>S. capitata</u>	10280	CB 2898, Australia
	995	<u>S. capitata</u>	10280	<u>S. capitata</u> , Venezuela RAD 446/01
	2138	<u>S. capitata</u> ,	10280	<u>S. capitata</u> , Nopolis Goias, Brasil, RAD 330/14
<u>Pueraria</u>	643	<u>P. phaseoloides</u>	9900	<u>P. phaseoloides</u> Chinchiná, Colombia
	2434	<u>P. phaseoloides</u>	9900, 4600	<u>Macroptilium</u> <u>atropurpureum</u> con suelo de kudzú, Km 60 Manaus, Brasil
	3287	<u>P. phaseoloides</u>	9900	<u>P. phaseoloides</u> Introducciones II, Carimagua, Colombia
	3648 3649	<u>P. phaseoloides</u>	9900	<u>P. phaseoloides</u> El Refugio, Villavicencio, Colombia
	3796	<u>P. phaseoloides</u>	9900	<u>P. phaseoloides</u> Itabela, Brasil
	3850	<u>P. phaseoloides</u>	9900	<u>P. phaseoloides</u> Thailandia
	3918	<u>P. phaseoloides</u>	9900	TAL 647, UMKL 56

(Continúa)

Cuadro C-1 (Continuación)

Género legum.	Cepa CIAT No.	Efectiva en:		Origen de la cepa
		Especie leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	
<u>Arachis</u>	2138	<u>A. pintoi</u>	17434	<u>S. capitata</u> , Nopolis Goiás, Brasil RAD 330/14
	2335	<u>A. pintoi</u>	"	<u>D. ovalifolium</u> , suelo Belem, CPATU, Brasil
	3101	<u>A. pintoi</u>	"	<u>C. macrocarpum</u> S. Marta, Colombia
	3144	<u>A. pintoi</u>	"	<u>A. pintoi</u> , Carimagua Pista, Colombia
	3806	<u>A. pintoi</u>	"	<u>A. pintoi</u> , Guayabal Meta, Colombia
	3810	<u>A. pintoi</u>	"	<u>A. pintoi</u> , Pista, Carimagua, Colombia
<u>Calopogonium</u>	453	<u>C. mucunoides</u>		<u>C. mucunoides</u> , Granada, Meta, Colombia.
	454			
	3115	"		<u>C. caeruleum</u> , Quilichao
<u>Flemmingia</u>	4203	<u>F. macrophylla</u>	17403	<u>F. macrophylla</u> Quilichao, Colombia
	4215			

Cuadro C-2 Cepas efectivas en ensayos con Phaseolus vulgaris (mayo, 1987)

Condiciones ambientales	Número CIAT	Origen
Suelos ácidos		
	899	(M-188) Carmen de Viboral, Colombia
	144	(Z-119) Antioquia, Colombia
	639	(Z-644) La Buitrera, Colombia
	876	El Guarne, Colombia
	652	(Z-629) Palmira, Colombia
Climas cálidos		
	45	(F-310) Brasil
	166	(Z-151) Buga, Colombia
	348	(Z-305) Palmira, Colombia
	640	(Z-640) La Buitrera, Colombia
	899	(M-188) Carmen de Viboral, Colombia
Climas fríos		
	5	(G-327) El Chuzo, Caldas, Colombia
	323	(95-R10) Canada
	613	(Z-621) Chinchiná, Colombia
	7001	(IpiHy-10) Ipiiales, Colombia
	7002	(IpiHy-14) Ipiiales, Colombia
Generales		
	144	(Z-119) Antioquia, Colombia
	632	(# 21) Guatemala
	652	(Z 629) Palmira, Colombia
	899	(M-188) Carmen de Viboral, Colombia

Cuadro C-3 Cepas de rizobios recomendadas para la inoculación de leguminosas forrajeras en sabana bien drenada Isohípertermica (mayo, 1987)

Espece de leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	Cepa recomendada
<u>Arachis pintoí</u>	17434	3101
<u>Centrosema brasilianum</u>	5234	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5065	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5744	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5887	3101
<u>Centrosema sp.</u>	5112	3101
<u>Centrosema sp.</u>	5277	3101
<u>Centrosema sp.</u>	5568	3101
<u>Desmodium heterocarpon</u>	3787	3418
<u>Pueraria phaseoloides</u>	9900	2434
<u>Stylosanthes capitata</u>	1019	870 + 995 + 2138
<u>Stylosanthes capitata</u>	1441	870 + 995 + 2138
<u>Stylosanthes capitata</u>	2044	870 + 995 + 2138
<u>Stylosanthes capitata</u>	10280	870 + 995 + 2138
<u>Stylosanthes guianensis</u> (tardío)	2031	71 ¹
<u>Stylosanthes guianensis</u> (tardío)	2362	71 ¹
<u>Stylosanthes guianensis</u> (tardío)	10136	71 ¹
<u>Stylosanthes macrocephala</u>	1643	n.d. ¹
<u>Stylosanthes macrocephala</u>	2133	n.d. ¹
<u>Stylosanthes macrocephala</u>	2286	n.d. ¹
<u>Stylosanthes macrocephala</u>	2756	n.d. ¹
<u>Zornia glabra</u>	7847	71 ¹

1. En los Llanos Orientales de Colombia, estas leguminosas no requieren inoculación.

n.d. = no determinado

Cuadro C-4 Cepas de rizobios recomendadas para inoculación de leguminosas forrajeras en el bosque tropical lluvioso (mayo, 1987)

Especie de leguminosa	Ecotipo (CIAT No.)	Cepa recomendada
<u>Centrosema brasilianum</u>	5234	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5065	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5713	3101
<u>Centrosema macrocarpum</u>	5744	3101
<u>Centrosema pubescens</u>	438	1670
<u>Centrosema pubescens</u>	442	1670
<u>Centrosema pubescens</u>	5189	1670
<u>Centrosema sp.</u>	5112	3101
<u>Centrosema sp.</u>	5277	3101
<u>Centrosema sp.</u>	5568	3101
<u>Desmodium heterophyllum</u>	349	3418
<u>Desmodium heterophyllum</u>	3782	3418
<u>Desmodium ovalifolium</u>	350	3418
<u>Leucaena leucocephala</u>		1967
<u>Pueraria phaseoloides</u>	9900	2434
<u>Stylosanthes capitata</u>	10280	870 + 995 + 2138
<u>Stylosanthes guianensis</u>	64	71
<u>Stylosanthes guianensis</u>	136	71
<u>Stylosanthes guianensis</u>	184	71
<u>Stylosanthes guianensis</u> (tardío)	1280	71
<u>Stylosanthes guianensis</u> (tardío)	10136	71
<u>Zornia glabra</u>	7847	71
<u>Zornia glabra</u>	8283	71
<u>Zornia latifolia</u>	728	71

Cuadro C-5 Cepas recomendadas por otras instituciones¹

Cepa CIAT No.	Efectiva para:	Sinónimos (nomenclatura de otros laboratorios)
904	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Semia 487
903	<u>Phaseolus vulgaris</u>	TAL 182
-	<u>Phaseolus vulgaris</u>	TAL 1376
7004	<u>Phaseolus vulgaris</u>	DF V23
7003	<u>Phaseolus vulgaris</u>	CO5
4477	<u>Calopogonium mucunoides</u>	Semia 6152, BR1602
4461, 4481	<u>Crotalaria, Canavalia,</u>	CPAC F2 (1J), Semia 6156
4462, 4483	<u>Stizolobium, Cajanus</u>	CPAC C2 (42), Semia 6158
4102	Varias leguminosas	CB 756
4465	<u>Neonotonia wightii</u>	Semia 656
3872	<u>P. phaseoloides</u>	DFQ1
4473	<u>Centrosema spp.</u>	Semia 6146, BR 1808, C 106
3894	<u>C. pubescens</u>	UMKL 44, TAL 651
3895	<u>C. pubescens</u>	UMKL 09, TAL 655
860	<u>Stylosanthes spp.</u>	CB 1650
4463, 4479	<u>Stylosanthes spp</u>	Semia 6154 (BR 446)
4464, 4480	<u>Stylosanthes spp.</u>	Semia 6155 (BR 502)
4100	<u>Stylosanthes spp.</u>	CB 2229
4103	<u>Stylosanthes spp</u>	TAL 1023 (CB82)
4471	<u>D. incanum</u>	Semia 6028, TAL 569
109	<u>D. intortum</u>	CB 627
2329	<u>Leucaena spp.</u>	Semia 6070, DF 15
2328	<u>Leucaena spp.</u>	Semia 6069, DF 10
4478	<u>Leucaena spp.</u>	Semia 6153, BR 827
1961	<u>Leucaena spp.</u>	TAL 82
1967	<u>Leucaena spp.</u>	TAL 1145, ST 71
3556, 843	<u>Leucaena spp.</u>	CB 81, TAL 582
42	<u>Leucaena spp.</u>	NGR 8

1. Cepas de otras instituciones que ya han sido comprobadas como efectivas en ensayos en el CIAT están incluidas en los Cuadros C-1 y C-2. Solicitamos a las instituciones que recomiendan cepas no incluidas en esta lista, que envíen la información respectiva y, de ser posible, también la cepa.

Referencias

- Allen, S. E.; Terman, G. L. y Clements, L. B. 1976. Greenhouse techniques for soil-plant fertilizer research. National Fertilizer Development Center, Tennessee Valley Authority, Bulletin No. Y-104. 57 p.
- American Society of Agronomy. 1982. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison, Wisconsin, USA.
- Bergersen, F. J. 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Wiley, New York. 702 p.
- Brockwell, J. 1982. Inoculation methods for field experiments and farmers. En: Vincent, J. M. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. 211-227.
- _____ ; Diatloff, A.; Roughley, R. J. y Date, R. A. 1982. Selection of rhizobia for inoculants. En: Vincent, J. M. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. p. 173-191.
- Burton, J. C. 1976. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. En: Nutman P. S. (ed.). Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press. p. 175-189.
- Cataldo, D. A.; Haroon, M; Schrader, L. E. y Youngs, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Science and Plant Analysis. 6:71-80.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1981. Informe Anual del Programa de Pastos Tropicales 1980. p. 57-68.
- _____. 1985. Informe Anual del Programa de Pastos Tropicales 1984. p. 156-159.

- _____. 1982a. Manual para la evaluación agronómica. Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales. Toledo, J. M. (ed.). Cali, Colombia. 168 p.
- _____. 1982; 1983; 1984. Informe Anual del Programa de Pastos Tropicales 1981; 1982; 1983. Cali, Colombia.
- _____. 1979-1985. Informe Anual del Programa de Frijol [1978 hasta 1984]. Cali, Colombia.
- _____. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. van Schoonhoven, A. y Pastor-Corrales, M. A. (compos.). Cali, Colombia. 56 p.
- Cochrane, T. T.; Salinas, J. G. y Sánchez, P. A. 1980. An equation for liming acid mineral soils to compensate crop aluminium tolerance. Trop. Agric. 57:133-140.
- Chapman, H. D. y Pratt, P. F. 1961. Methods of analysis for soils, plants and waters. Division of Ag. Sci., Univ. of California, Riverside. 309 p.
- Daniel, R. M.; Limmer, R. W.; Steele, K. W. y Smith, I. M. 1982. Anaerobic growth nitrate reduction and denitrification in 46 Rhizobium strains. J. Gen. Microbiol. 128:1811-1815.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1985. Manual técnico sobre la fijación simbiótica de nitrógeno leguminosa-rizobio. Roma.
- Faria, S. M. de; Polli, H. de y Franco, A. A. 1985. Adesivos para inoculação e revestimento de sementes de leguminosas. Pesq. Agropec. Bras. (Brasilia) 20:169-176.

FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias). 1982.

Aspectos biológicos, agronómicos y tecnológicos de la rizobiología.

L. B. Ayala (ed.). Serie Especial, no. 2-02. Maracay, Venezuela. 78 p.

IAEA (International Atomic Energy Agency). 1983. A guide to the use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition: calculations and interpretation of data. IAEA TECDOC-288. Vienna, Austria.

Jones, J. B. y Steyn, W. J. A. 1973. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. En: Walsh, L. M. y Beaton, J. D. (eds.). Soil testing and plant analysis. Soil Sci. Soc. Amer., Madison, Wisconsin. p. 249-270.

Jordan, D. C. 1984. En: Krieg, N. R. y Holl, J. G. (eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 234-254.

Keeney D. R. y Nelson D. W. Nitrogen inorganic forms. En: Page, A. L.; Miller, R. H. y Keeney, D. L. 1982. Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA. 643 p.

Kerridge, P. C., Cook, B. G. y Everett, M. L. 1973. Application of molybdenum trioxide in the seed pellet for sub-tropical pasture legumes. Tropical Grasslands 7:229-232.

Keyser, H. M. 1978. Ph.D. Thesis. Univ. of California, Davis.

_____ y Munns, D. N. 1979. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium and phosphate. Soil Sci. Soc. Amer. J. 43:519-523.

Leonard, L. T. 1943. A simple assembly for use in the testing of cultures of rhizobia. J. Bact. 45:523-525.

- Maier, R. J.; Campbell, N. E. R.; Hanus, F. J.; Simpson, F. B.; Russel, S. A. y Evans, H. J. 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living Rhizobium japonicum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 75:3258-3262.
- Minchin, F. R.; Witty, J. F.; Sheehy J. E. y Müller, M. 1983. A major error in the acetylene reduction assay: Decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot. 34:641-649.
- Norris, D. O. y Date, R. A. 1976. Legume Bacteriology. En: Tropical pasture research principles and methods. C.A.B. Bull. 51, Comm. Bureau of Pastures and Field Crops. p. 134-174.
- Roughley, R. J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil, 32:675-701.
- Salinas, J. G. y García, R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Programa de Pastos Tropicales, CIAT, Cali, Colombia. 83 p.
- _____ y Goedert, W. J. 1987. Ensayos de ajuste de fertilización para establecer pasturas tropicales. En: CIAT. Investigaciones de apoyo para la evaluación de pasturas. Tercera Reunión del Comité Asesor de la RIEPT, CIAT, octubre 1985. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 196 p.
- Sandman W. P. L. 1970. Practical aspects of Rhizobium bacteriology. Rhodesian Ministry of Agriculture. 185 p.
- Seiffert, M. F. y Miranda, C. M. B. 1983. Recomendações para inoculação e peletização de sementes de leguminosas forrageiras tropicais. CNPCC, Campo Grande, Brasil. Comunicado Técnico No. 17.

Sinclair, M. J. e Eaglesham, A. R. J. 1984. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 16:247-251.

Somasegaran, P. y Hoben J. H. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology*. NifTAL Project and MIRCEN, Paia, Hawaii. 367 p.

Steyn W. J. A. 1959. Leaf analysis; errors involved in the preparative phase. *J. Agr. Food Chem.* 7:344-348.

Sylvester-Bradley, R.; Ayarza, M. A.; Méndez, J. E. y Moriones, R. 1983. Use of undisturbed soil cores for evaluation of Rhizobium strains and methods for inoculation of tropical forage legumes in a Colombian Oxisol. *Plant and Soil* 74:237-247.

_____ y Mosquera, D. 1985. Nitrification and responses to Rhizobium inoculation in a tropical savanna as affected by land preparation. En: Kang, B. T. y Van der Heide, J. (eds.). *Nitrogen management in farming systems in humid and subhumid tropics*. Institute for Soil Fertility (IB), Haren, The Netherlands.

Vincent, J. M. 1975. *Manual práctico de rizobiología*. Edit. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 200 p.

Zablotwicz, R. M.; Eskew, D. L. y Focht, D. D. 1978. Denitrification in Rhizobium. *Can. J. Microbiol.* 24:757-760.

Publicación del CIAT
Programa de Pastos Tropicales,
Programa de Frijol y
Programa de Capacitación y Comunicaciones
Unidad de Publicación

Edición técnica: Rosemary Sylvester-Bradley
y Judy Kipe-Nolt

Edición de producción: Francisco Motta

Impresión: Artes Gráficas del CIAT