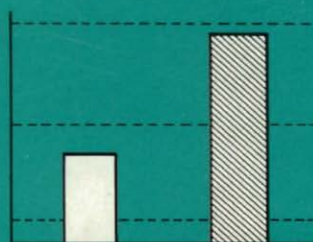


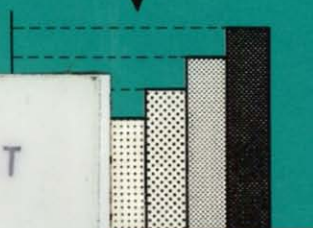


CIAT
Centro Internacional
de Agricultura Tropical

Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, Selección y Manejo



Selección de leguminosas



Selección de cepas



Combinación
efectiva

CIAT
AV
SB
317
.L43
S5
Guía

Guía de estudio

Para ser usada como complemento de la
Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema

El CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical, es una institución de investigación y capacitación agrícolas, sin ánimo de lucro, dedicada a incrementar la producción de alimentos en las regiones tropicales en desarrollo. El CIAT es uno de los 13 centros internacionales de investigación agrícola bajo los auspicios del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR).

El presupuesto básico del CIAT es financiado por un grupo de donantes. En 1987 tales donantes son: Bélgica, Canadá, España, Estados Unidos de América, Francia, Holanda, Italia, Japón, Noruega, el Reino Unido, la República Federal de Alemania, la República Popular de China, Suecia y Suiza. Las siguientes organizaciones son también donantes del CIAT en 1987: el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), el Banco Internacional para Reconstrucción y Fomento (BIRF), el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), la Comunidad Económica Europea (CEE), el Fondo Internacional para el Desarrollo Agrícola (FIDA), la Fundación Ford, la Fundación Rockefeller, y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

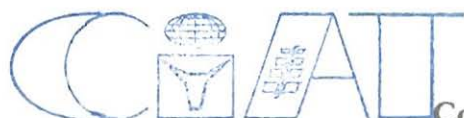
La información y las conclusiones contenidas en esta publicación no reflejan, necesariamente, el punto de vista de las entidades mencionadas anteriormente.

Esta unidad audiotutorial fue producida con el apoyo financiero del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Proyecto Especial sobre Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-Rizobio (Proyecto GLO/004/84).

Serie: 04SL-01.03
Diciembre, 1987



Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, Selección y Manejo



BIBLIOTECA

26 ABR. 1988
63879

Contenido Científico:

Rosemary Sylvester-Bradley, Ph.D.
Judith A. Kipe-Nolt, Ph.D.
David J. Harris, Ph.D.

Producción:

Carlos A. Valencia, Ing. Agr.

1098

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)
Apartado Aéreo 6713
Cali, Colombia, S.A.

Cita Bibliográfica:

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1987. Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, Selección y Manejo; Guía de Estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido científico: Rosemary Sylvester-Bradley; Judith A. Kipe-Nolt; David J. Harris. Producción: Carlos A. Valencia. Cali, Colombia. CIAT, 73 p. (Serie: 04SL-01.03)

Las personas o entidades interesadas en reproducir parcial o totalmente, por cualquier medio o método, la Guía de Estudio o cualquiera de los otros componentes de esta Unidad Audiotutorial, deberán tener autorización escrita del CIAT.

Contenido

	Pág.
Objetivos	5
Introducción	7
La fijación simbiótica de nitrógeno	8
Importancia de la fijación de nitrógeno	9
Organismos que fijan nitrógeno	10
La enzima nitrogenasa	10
Simbiosis leguminosa-rizobio	11
Familia Leguminosae	11
Familia Rhizobiaceae	12
Ciclo de vida de los rizobios y nodulación	14
Características de los nódulos	18
Terminología descriptiva de la simbiosis	19
Evaluación de la simbiosis	19
Preguntas de estudio	23
Manejo de los rizobios	26
Recolección y manejo de cepas de rizobios	26
Recolección y preservación de nódulos	26
Aislamiento, caracterización y autenticación de rizobios	28
Efectividad potencial	31
Preservación y reconstitución de cepas	31
Preparación y manejo de inoculantes	33
Función de los inoculantes	33
Preparación de los inoculantes	34
Evaluación de la calidad de los inoculantes	35
Inoculación	38
Objetivo de la inoculación	38

Inoculación de las semillas	40
Inoculación del suelo	40
Preguntas de estudio	42
Evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio	45
Objetivos, tratamientos y parámetros para la evaluación agronómica	45
Etapas de la evaluación	47
Evaluación de la efectividad de las cepas nativas (Etapa I _L)	49
Evaluación de la efectividad de la simbiosis incluyendo el uso de inoculantes (Etapa II)	51
Necesidad de seleccionar cepas	52
Selección de cepas efectivas.	53
Mejoramiento genético de leguminosas	57
Evaluación de la interacción entre la simbiosis y los factores de manejo agronómico (Etapa III)	57
Selecciones posteriores y liberación de los materiales	59
Montaje y manejo de los ensayos	60
Selección del sitio	61
Invernadero vs. campo	61
Control de la disponibilidad de N mineral	61
Precauciones para evitar contaminación	63
Muestreos para evaluar nodulación y rendimiento de nitrógeno	64
Análisis de los resultados	65
Preguntas de estudio	67
Respuestas a las preguntas de estudio	69
Bibliografía y lecturas complementarias	71

Objetivos

El objetivo de esta unidad es presentar la metodología necesaria para realizar la evaluación de la fijación de nitrógeno en los programas de selección de leguminosas. Para ello se definen los objetivos, las diferentes etapas, los tipos de ensayos y los tratamientos requeridos para la evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio, y se describen los procedimientos necesarios para preparar, evaluar y utilizar los inoculantes y para realizar los ensayos agronómicos de evaluación de la simbiosis.

Se espera que al finalizar el estudio de esta unidad audiotutorial, el interesado esté en capacidad de:

- Explicar la importancia de la fijación biológica de nitrógeno en la agricultura.
- Describir la reacción de fijación de nitrógeno y explicar los factores que intervienen en ella.
- Mencionar los géneros de rizobios y establecer las principales diferencias entre ellos.
- Describir el ciclo de vida de los rizobios y las principales características de los nódulos radicales.
- Explicar los principales términos usados para describir la interacción entre las leguminosas y los rizobios.
- Enunciar y describir brevemente los procedimientos necesarios para recolectar, aislar, autenticar y preservar las cepas de rizobios.
- Enunciar y describir brevemente los procedimientos necesarios para preparar, evaluar y utilizar los inoculantes.

- Definir el objetivo general de la evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio.
- Enunciar las etapas de la evaluación, los tipos de ensayo requeridos en cada etapa con sus respectivos tratamientos, y el resultado esperado al final de cada etapa.
- Explicar la relación entre la disponibilidad de N mineral en el suelo y la fijación de nitrógeno, y los procedimientos para controlar los niveles de N mineral.
- Mencionar las precauciones necesarias para evitar la contaminación entre tratamientos, tanto en el invernadero como en el campo.
- Describir los parámetros utilizados para la evaluación agronómica de la simbiosis y explicar su significado.

Introducción

La capacidad de las leguminosas para fijar nitrógeno atmosférico se conoce desde 1888 (Burns y Hardy, 1975), aunque desde antes se sabía que las leguminosas tenían la propiedad de enriquecer el suelo.

La fijación de nitrógeno ocurre por la asociación simbiótica que establece la planta con algunas bacterias de la familia Rhizobiaceae; estas bacterias infectan las raíces de la planta e inducen la formación de nódulos radicales, en el interior de los cuales se realiza la fijación, con la intervención de la enzima nitrogenasa, localizada en el interior de los rizobios. Las bacterias le ceden el nitrógeno fijado a la planta y a su vez, ésta le suministra al nódulo los carbohidratos que proveen la energía necesaria para el proceso de fijación.

Por ser un proceso en el cual intervienen dos organismos diferentes —una planta (leguminosa) y una bacteria (rizobio)— el estudio y manejo de esta asociación simbiótica requiere del trabajo integrado de agrónomos y microbiólogos.

En esta Guía de Estudio, que hace parte de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema, se presentan los conceptos y criterios básicos para el manejo de esta asociación simbiótica, tendientes a maximizar la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

La fijación simbiótica de nitrógeno

El ciclo bioquímico del nitrógeno comprende una serie de procesos microbiológicos, químicos y físicos, en el cual ocurren varias transformaciones simultáneas y en diverso sentido, en las que participan componentes orgánicos, inorgánicos y volátiles. La Figura 1 resume el ciclo en forma esquemática.

En el proceso de fijación, el nitrógeno atmosférico (que se encuentra en forma molecular, N_2) se reduce a la forma amoniacal por la intervención de ciertos microorganismos del suelo, ya sean simbióticos o de vida libre. Este proceso de fijación constituye un aporte importante de nitrógeno al suelo.

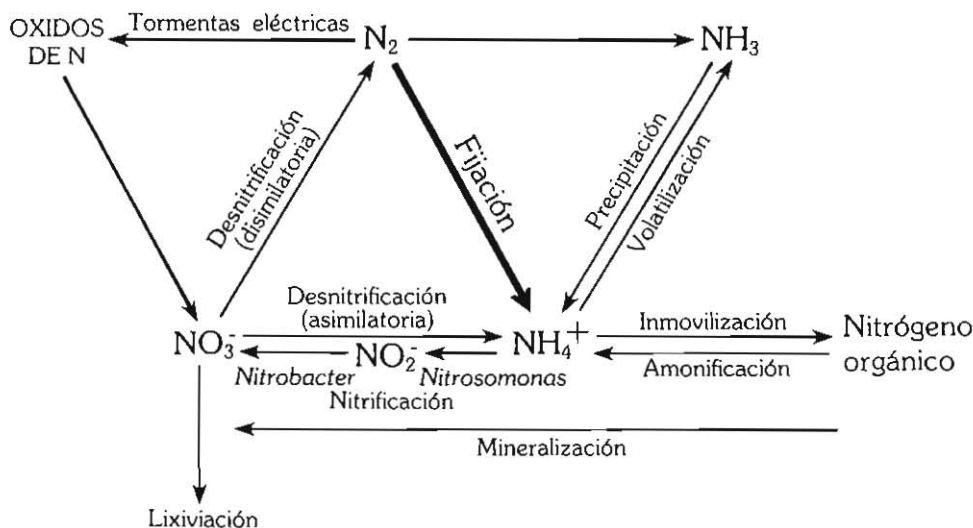


FIGURA 1. Ciclo bioquímico del nitrógeno.

Importancia de la fijación de nitrógeno

El nitrógeno está presente en los tejidos verdes de las plantas en concentraciones relativamente altas (entre 1 y 4%), y en algunas semillas en concentraciones aún mayores, por lo cual se le considera un macronutriente primario, junto con el fósforo y el potasio. Aunque, en general, los suelos minerales tienen contenidos totales de nitrógeno muy superiores a los de los requerimientos de los cultivos, casi todo este elemento se encuentra en la materia orgánica, y anualmente sólo se mineraliza una pequeña fracción (1 a 3% del nitrógeno total, Bartholomew, 1965). Debido a esta liberación lenta del nitrógeno orgánico, el nitrógeno frecuentemente se convierte en un elemento limitativo para la producción de cultivos.

Los fertilizantes nitrogenados se utilizan ampliamente para corregir la deficiencia de nitrógeno y elevar los rendimientos de las cosechas. Sin embargo, debido a los altos precios que han alcanzado los recursos energéticos utilizados para la elaboración de los fertilizantes nitrogenados, ha surgido la necesidad de encontrar alternativas para obtener rendimientos adecuados, especialmente en las zonas agrícolas marginales.

La conversión de N_2 a la forma reducida tiene una elevada demanda de energía, debido a la estabilidad del enlace triple de la molécula de N_2 . Esta energía se requiere como energía de activación, ya que la reacción completa libera energía. La reducción del N_2 ocurre de dos maneras: a nivel industrial, mediante el proceso de fabricación de fertilizantes, o a nivel biológico, por la fijación de nitrógeno atmosférico.

El proceso industrial utilizado para la fabricación de fertilizantes nitrogenados, denominado proceso de Haber-Bosch, tiene una alta demanda de energía debido a los requerimientos de hidrógeno, alta temperatura y presión. Por ejemplo, el requerimiento para producir una tonelada de amonio es de aproximadamente 1000 m³ de gas natural o aproximadamente una tonelada de petróleo (7 barriles) (IFDC/UNIDO, 1979).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que también implica una alta demanda de energía, pero en este caso se obtiene de la radiación solar en condiciones ambientales de temperatura y presión. Esto es posible debido a la presencia de la enzima nitrogenasa, catalizadora de la reacción. De aquí se origina la importancia que tiene el proceso de la fijación biológica de nitrógeno

para la agricultura, y la necesidad de desarrollar una tecnología adecuada para maximizar el aprovechamiento de este recurso.

Organismos que fijan nitrógeno

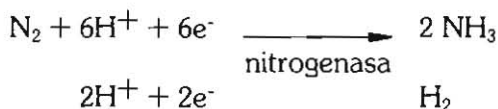
Los diferentes microorganismos capaces de fijar N_2 obtienen la energía que requieren a partir de la fotosíntesis, bien sea directamente, como en el caso de las cianobacterias, o indirectamente, de los carbohidratos producidos por otros organismos fotosintéticos. En este último caso, los microorganismos obtienen los carbohidratos gracias a su localización dentro de la planta, en la rizosfera, o a partir de sustratos orgánicos presentes en el suelo, el agua, etc. Quispel (1974) presenta una descripción detallada de todos los microorganismos que fijan nitrógeno.

De los microorganismos que forman asociaciones simbióticas con plantas superiores, hongos o helechos, es de interés particular la asociación que forman las leguminosas con bacterias de la familia Rhizobiaceae, la cual da lugar a la formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno.

La enzima nitrogenasa

La nitrogenasa, enzima que cataliza la reducción de N_2 a NH_3 , se localiza en el interior de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta enzima tiene dos componentes principales: la proteína ferrosa y la proteína molibdeno-ferrosa. La presencia de molibdeno en esta enzima, al igual que en la enzima nitrato reductasa, explica el requerimiento de molibdeno para la asimilación de N_2 y NO_3^- .

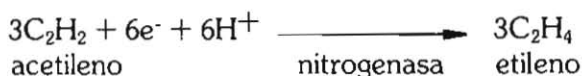
En condiciones óptimas, la reacción de la nitrogenasa puede expresarse de la siguiente manera:



La liberación de H_2 reduce la eficiencia de la nitrogenasa y, en parte, explica, la gran demanda de energía para sostener su actividad. La cantidad de

hidrógeno liberado por los diferentes organismos fijadores de nitrógeno varía ampliamente; algunas cepas (denominadas Hup^+) poseen un mecanismo de reciclaje de hidrógeno por intermedio de una enzima del tipo hidrogenasa, la cual oxida parcial o totalmente el H_2 producido, disminuyendo así el gasto de energía.

Además de la acción sobre el N_2 y el $2H^+$, la nitrogenasa cataliza la reducción de otros sustratos; uno de ellos, el acetileno (C_2H_2), es reducido a etileno (C_2H_4). Esta reacción constituye la base del método de reducción de acetileno, utilizado para estimar la actividad de la fijación de nitrógeno, y se expresa en la siguiente forma:



La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, razón por la cual los organismos fijadores de nitrógeno son anaeróbicos o han desarrollado adaptaciones específicas para proveerse de oxígeno, a la vez que protegen a la enzima del oxígeno libre; por ejemplo, los nódulos de las leguminosas contienen leghemoglobina, la cual cumple esta función.

La presencia de algunos compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno inhibe la fijación de N_2 . Esta inhibición puede ser de tres niveles: en el primero, se inhibe la actividad de la enzima nitrogenasa presente; en el segundo se inhibe la síntesis de nueva enzima por el producto final de la reacción, el NH_3 , y por otros compuestos nitrogenados; y, en el caso de la simbiosis con las leguminosas, ocurre un tercer nivel de inhibición, ya que la presencia de N mineral inhibe la formación de los nódulos radicales.

Una descripción breve y comprensible de los procesos bioquímicos involucrados en la fijación de nitrógeno se encuentra en el texto de Sprent (1979).

Simbiosis leguminosa-rizobio

Familia Leguminosae

La familia Leguminosae es muy amplia, con alrededor de 750 géneros y unas 20,000 especies, incluyendo plantas cultivadas, numerosos árboles, plantas herbáceas y arbustos, las cuales desempeñan una función importante en

diversos ecosistemas. Las leguminosas tienen una importancia particular en la alimentación humana (granos) y animal (forrajes), al igual que en la economía del nitrógeno del suelo, ya que la mineralización de sus residuos constituye un aporte de nitrógeno disponible.

Las leguminosas se caracterizan por tener hojas compuestas (aunque algunas solamente las tienen en su estado juvenil, como *Acacia koa*, *Clitoria* spp.), frutos en forma de vaina y, la mayoría de ellas, nódulos radicales fijadores de nitrógeno.

Según la clasificación de Purseglove (1968), la familia Leguminosae consta de tres subfamilias:

Papilionoideae, con aproximadamente 400 géneros y 14,000 especies, entre las cuales se encuentran casi todas las leguminosas de importancia agrícola. Son plantas herbáceas, raramente arbustos o árboles, y la mayoría de ellas forman nódulos fijadores de nitrógeno. Entre sus géneros están: *Lupinus*, *Lotus*, *Arachis*, *Pisum*, *Phaseolus*, *Vigna*, *Glycine*, *Centrosema*, *Pueraria*, *Stylosanthes*.

Mimosoideae, con más de 50 géneros y 2900 especies, adaptadas a las regiones tropicales. La mayoría son arbustos y árboles, con muy pocas plantas herbáceas. Casi todas las especies de esta subfamilia forman nódulos. Entre los géneros con mayor número de especies están: *Inga*, *Albizia*, *Acacia*, *Mimosa*.

Caesalpinoideae, con alrededor de 100 géneros y 1800 especies adaptadas a las regiones tropicales. La mayoría son árboles y arbustos. Pocas de las especies estudiadas forman nódulos (alrededor de un 30%). Entre los géneros más conocidos de esta subfamilia están: *Copaifera*, *Cassia*, *Caesalpinia*, *Tamarindus*.

Familia Rhizobiaceae

Los rizobios son bacterias del suelo, caracterizadas por su habilidad para infectar las leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de N_2 en las raíces, aunque en algunos casos los nódulos se forman en el tallo (como en *Sesbania* y *Aeschynomene*).

Hasta hace poco se consideró que la familia Rhizobiaceae incluía dos géneros:

Rhizobium y *Agrobacterium*. Sin embargo, en la 8a. edición del manual de Bergey (Jordan, 1984), el género *Rhizobium* se subdividió en dos grupos, teniendo en cuenta la tasa de crecimiento y la producción de acidez o alcalinidad en medio de cultivo levadura-manitol (LM), la disposición de los flagelos, la composición de la base del ADN y los géneros de plantas hospedantes con los cuales establecen simbiosis. En el género *Bradyrhizobium*, se ubicaron las bacterias de crecimiento lento, que producen alcalinidad en medio LM. Las bacterias de crecimiento rápido, que producen acidez en medio de cultivo LM, se clasificaron en el género *Rhizobium* (véase el Cuadro 1). En adelante, se denominará con el nombre común de "rizobios" a las bacterias pertenecientes a los dos géneros.

CUADRO 1. Principales diferencias entre *Rhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp.

Género	Reacción	Forma de las colonias	Tamaño de las colonias	Sustratos carbónicos más importantes
----- LMA a 28°C -----				
<i>Rhizobium</i>	Ácida	Circulares, convexas, semitraslúcidas, mucilaginosas	más de 3 mm de diámetro en los primeros 3 a 5 días de incubación	Manitol Sucrosa
<i>Bradyrhizobium</i>	Alcalina	Circulares, convexas, opacas o traslúcidas, de textura variable	1 a 5 mm de diámetro en los primeros 5 a 20 días de incubación	Manitol Glicerol

Los rizobios de ambos géneros son bastones de 0.5 a 0.9 μm por 1.2 a 3.0 μm , pero se tornan pleomórficos en ciertas condiciones de crecimiento. Son bacterias móviles, aeróbicas, Gram negativas y no forman esporas (Figura 2). La temperatura y pH óptimos para su crecimiento varían entre 25 a 30°C y 6 a 7, respectivamente, aunque existen cepas adaptadas a condiciones más extremas.

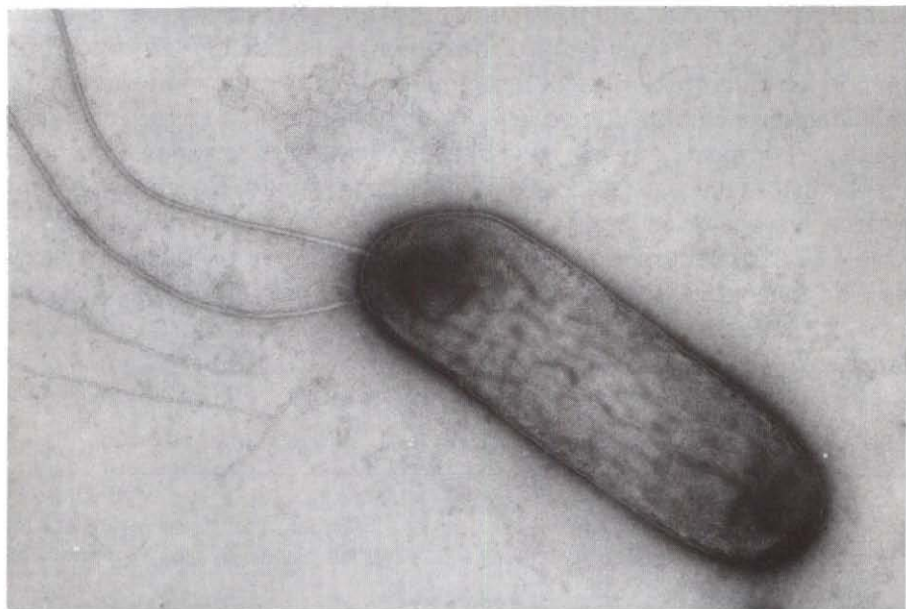


FIGURA 2. Microfotografía de una célula de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*, ampliada 30,000 veces.

Existe cierta especificidad en la simbiosis entre los rizobios y las plantas hospedantes. El Cuadro 2 presenta las especies actualmente reconocidas de rizobios de los dos géneros, junto con sus plantas hospedantes más comunes. Se han registrado varios casos de leguminosas que nodulan con cepas de ambos géneros, como en el caso de *Glycine soja* (Keyser and Cregan, 1984).

Ciclo de vida de los rizobios y nodulación

La asociación entre los rizobios y la leguminosa consta de varias etapas, las cuales se describen a continuación:

Vida libre y multiplicación en la rizosfera

Los rizobios son capaces de vivir heterotróficamente en el suelo; en estas condiciones, las cepas de rizobios varían en su tolerancia al calor, a la deficiencia de humedad y a los niveles extremos de pH, lo cual afecta la habilidad de las cepas individuales para sobrevivir y persistir en el suelo en

CUADRO 2. Especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y sus géneros hospedantes.

Bacteria	Géneros hospedantes
1. DE CRECIMIENTO RAPIDO	
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> :	
biovar. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium,</i>
biovar. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris,</i>
biovar. <i>viceae</i>	<i>Pisum, Lathyrus,</i>
	<i>Lens, Vicia</i>
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lupinus, Lotus, Anthyllis, Ornithopus,</i>
	<i>Leucaena</i>
2. DE CRECIMIENTO LENTO	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium</i> spp.:	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Vigna</i>)	<i>Vigna</i> , leguminosas forrajeras tropicales y muchos otros
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>)	<i>Lotus pedunculatus,</i>
	<i>Lupinus</i> sp.

Fuente: Jordan, 1984.

ausencia de su leguminosa hospedante. Aunque se sabe que algunas cepas de rizobios son capaces de fijar nitrógeno fuera del nódulo, aún no se ha determinado la importancia ecológica de este fenómeno.

Una vez que una leguminosa inicia el crecimiento, en su rizosfera se crean condiciones favorables para la multiplicación de los rizobios. De esta manera se inicia el proceso que conduce a la simbiosis.

Infección y formación de los nódulos

Por lo general, el proceso de infección ocurre por los pelos radicales (el maní es una excepción). Los rizobios se multiplican sobre la superficie de la raíz, y el pelo radical se curva. Los rizobios penetran, entonces, a través de un hilo de infección; el hilo de infección crece dentro de la corteza de la raíz, lo cual permite que los rizobios penetren en las células corticales. Estas células, junto



con los rizobios, empiezan a multiplicarse para formar el nódulo (Figura 3).

Un nódulo completamente formado puede ser de dos tipos, dependiendo de la especie hospedante: determinados e indeterminados. Los nódulos determinados tienen un meristema de vida corta y son de forma esférica (Figura 4), en tanto que los nódulos indeterminados tienen un meristema persistente y son de forma alargada, y pueden ser ramificados (Sprent, 1979). Los rizobios presentes en los nódulos son pleomórficos y se conocen como bacteroides, los cuales contienen la nitrogenasa; en una membrana peribacteroide pueden haber incluidos de 1 a 8 bacteroides. La leghemoglobina se localiza afuera de las células bacteroides, y desde allí cumple la función de suministrar oxígeno a estos organismos aeróbicos, a la vez que mantiene al oxígeno libre en niveles bajos (Appleby, 1974).

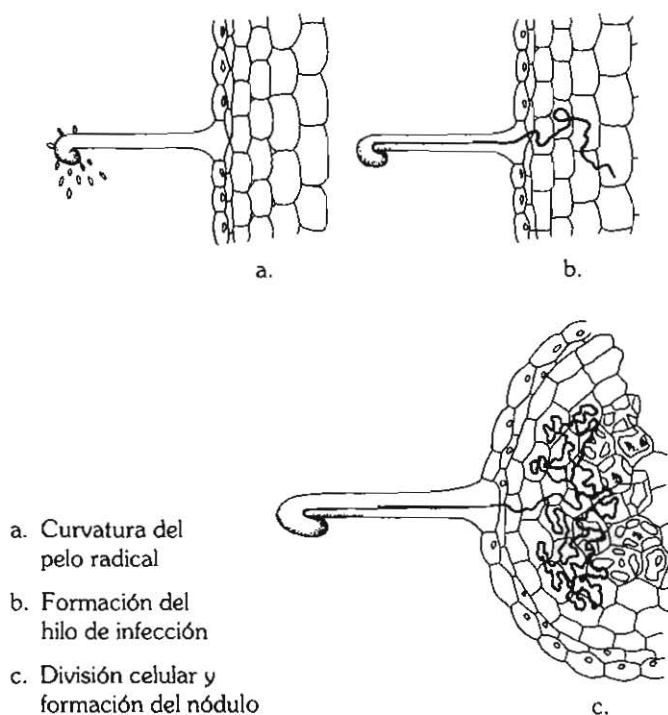


FIGURA 3. Proceso de infección de la raíz y formación del nódulo.

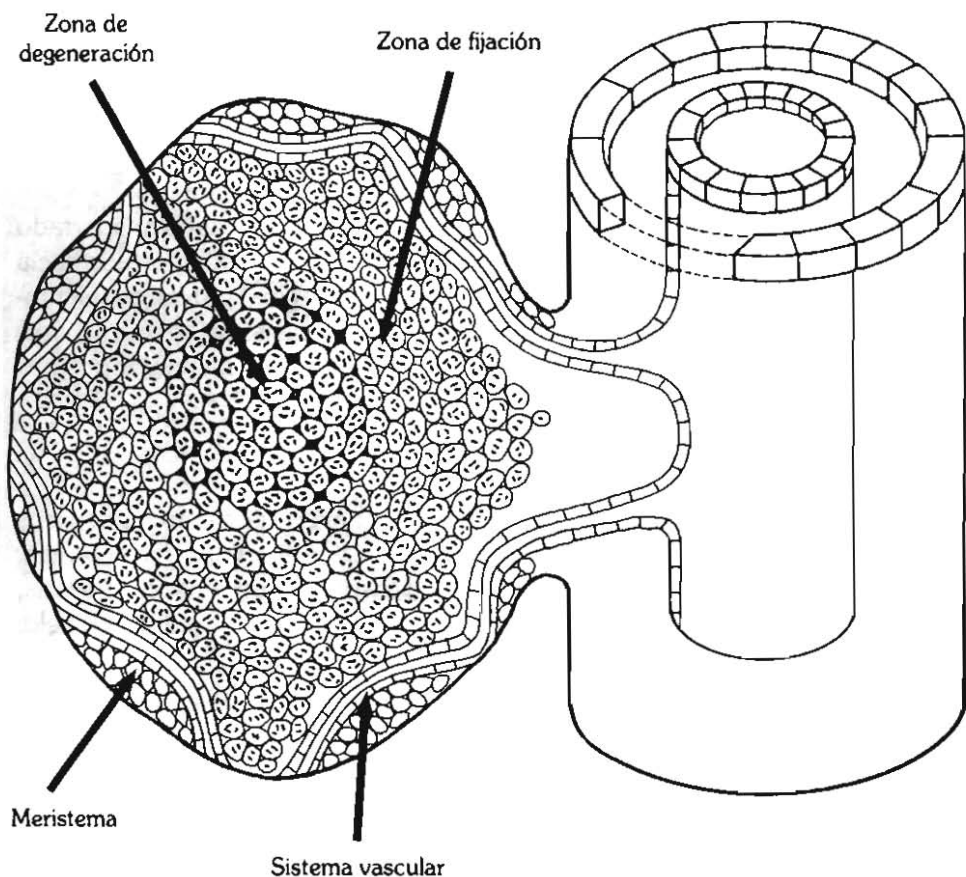


FIGURA 4. Corte esquemático de un nódulo determinado.

Función de los nódulos

Además de la energía requerida para la formación y el mantenimiento del nódulo, la actividad de fijación de nitrógeno también depende de un suministro adecuado de carbohidratos por parte de la planta. El suministro de los carbohidratos varía con el ciclo de vida de la planta. Durante la fase vegetativa, la actividad de fijación de nitrógeno alcanza un nivel máximo y luego declina al iniciarse la competencia por carbohidratos para la producción de

semillas. Los cambios en la tasa de fotosíntesis causados por varios factores, tales como luz, temperatura, humedad, etc., también afectan la fijación de nitrógeno. Las mediciones de las tasas de fijación de nitrógeno realizadas en un determinado momento tienen, por lo tanto, escaso valor para evaluar la cantidad total de nitrógeno fijado.

Debido a su toxicidad para las plantas, el amonio no puede ser transportado en la savia del xilema. La mayoría del amonio producido es transportado hacia la parte aérea en forma de amidas (glutamina, asparagina) o ureidos (alantoina y ácido alantóico). Algunas especies de plantas transportan una proporción más alta de amidas, en tanto que otras transportan una mayor proporción en forma de ureidos (Sprent, 1979).

Muerte del nódulo y liberación de rizobios al suelo

La muerte de los nódulos ocurre por la senescencia de la planta o por otros factores adversos que afectan su crecimiento vegetativo tales como sequía, inundación, deficiencias nutricionales y, en el caso de leguminosas forrajeras, cortes o pastoreo fuerte. Los rizobios mueren o son liberados al suelo, completando así su ciclo de vida.

Características de los nódulos

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

Los nódulos varían en su forma (redondos, alargados o ramificados) y tamaño (Figura 5, páginas centrales). Algunas leguminosas forman nódulos muy pequeños (ej: *Stylosanthes*, *Zornia*, *Desmodium*), en tanto que otras forman nódulos grandes (*Phaseolus*, *Centrosema*, *Pueraria*). Sin embargo, dentro de una misma especie, el tamaño de los nódulos depende de la cepa de rizobio y de las condiciones ambientales.

El color interno de los nódulos efectivos es rojo o rosado debido a la presencia de leghemoglobina (Figura 6, páginas centrales). Si el color interno del nódulo aparece blanco o verde, generalmente es inefectivo. Sin embargo, aunque la presencia de nódulos grandes, abundantes y de color interno rojo puede

indicar alta fijación de N_2 , éstos no son parámetros definitivos para evaluar la fijación de N_2 ; los nódulos rojos y abundantes también pueden ser inefectivos.

A medida que los nódulos se vuelven viejos y senescentes, la leghemoglobina se convierte en legcholeglobina, de color verde. Un solo nódulo efectivo puede mostrar, simultáneamente, zonas blancas, rojas y verdes, las cuales indican áreas de crecimiento del nódulo, áreas de fijación activa de nitrógeno y áreas de senescencia, respectivamente. Un nódulo muerto es de consistencia blanda y pierde su estructura rápidamente.

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

Terminología descriptiva de la simbiosis leguminosa-rizobio

La habilidad de las cepas para formar nódulos se denomina **infectividad**; en cambio, la habilidad de los nódulos para fijar nitrógeno se denomina **efectividad**. Las evaluaciones de **efectividad potencial** de las cepas de rizobios se realizan en condiciones óptimas de crecimiento y sin la competencia de otros microorganismos (Date, 1977).

Ciertas especies de leguminosas sólo forman nódulos con un rango limitado de cepas de rizobios; estas leguminosas se denominan **específicas**. Otras leguminosas forman nódulos con un rango amplio de rizobios, aislados de diferentes especies de leguminosas, y se denominan **promiscuas** (Figura 7).

En esta Guía de Estudio, las cepas de rizobios presentes en el suelo se denominan **cepas nativas**. Aunque las **cepas inoculadas** pueden originarse en el mismo ambiente, y también podrían considerarse como cepas nativas, aquí solamente se utiliza este término para la población nativa del suelo, que no ha sido modificada por la inoculación.

Evaluación de la simbiosis

Una evaluación rigurosa de la simbiosis leguminosa-rizobio debe basarse en la cuantificación del nitrógeno fijado, bien sea por el método del ^{15}N o por el método de reducción de acetileno u otros (Bergersen, 1980). Sin embargo, estas evaluaciones son dispendiosas y costosas, por lo cual se pueden utilizar

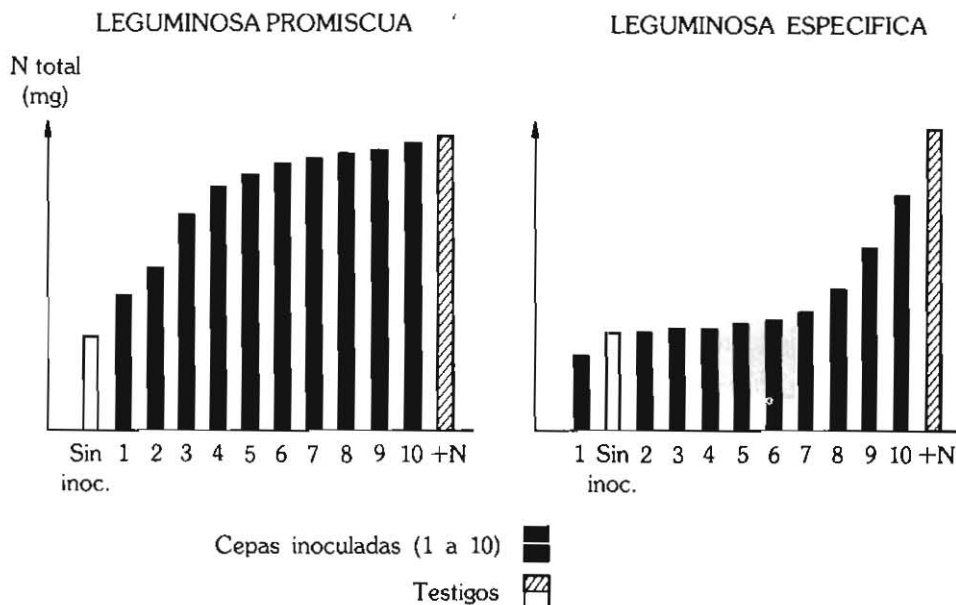


FIGURA 7. Las leguminosas específicas nodulan sólo con una o unas pocas cepas de rizobios; las leguminosas promiscuas nodulan con un amplio rango de cepas.

las evaluaciones de la nodulación y del rendimiento de N de la planta en condiciones de crecimiento definidas; si bien estas evaluaciones no cuantifican la fijación, permiten evaluar la simbiosis desde el punto de vista agronómico.

Evaluación de la nodulación

Aunque las características de la nodulación no están directamente relacionadas con la fijación de nitrógeno, y para cada combinación leguminosa-rizobio el nivel óptimo de nodulación es diferente, estas evaluaciones son muy útiles cuando se analizan conjuntamente con el rendimiento de nitrógeno de la planta.

Los parámetros que se tienen en cuenta en la evaluación de la nodulación son:

- abundancia
- tamaño

- distribución
- color interno

Abundancia y tamaño

Estos dos parámetros se complementan, ya que pocos nódulos grandes o muchos nódulos pequeños pueden tener la misma cantidad de tejido nodular activo.

Distribución

Los nódulos en corona son los primeros en formarse, y tienen mayor probabilidad de provenir de las cepas inoculadas. Generalmente son más efectivos por estar más cercanos a la fuente de carbohidratos.

Color interno

El color interno de los nódulos vivos puede ser rojo, rosado, verde, blanco, negro o marrón. Debe recalcarse que un solo nódulo puede presentar dos colores. El color interno de un nódulo efectivo generalmente es rojo o rosado, por la presencia de leghemoglobina. Sin embargo, algunas cepas inefectivas también pueden formar nódulos rojos. Los nódulos verdes y blancos generalmente son inefectivos. También existen algunas cepas que forman nódulos negros.

Determinación del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal

La determinación del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal es importante para determinar la efectividad de la simbiosis. Aunque el rendimiento de materia seca puede dar una indicación del contenido de nitrógeno, la relación entre los dos parámetros no necesariamente es lineal (Haydock *et al.*, 1980). Así, es necesario obtener datos de la concentración de nitrógeno en el tejido vegetal, empleando el rendimiento de nitrógeno (en mg/planta o kg/ha) como parámetro principal de la evaluación. En estos ensayos es importante controlar el nivel de nitrógeno mineral disponible para el crecimiento de la planta, ya que, solamente en el caso de que el nivel de nitrógeno mineral disponible sea bajo, la mayor parte del nitrógeno que contiene la planta proviene de la fijación simbiótica.

Además, cuando se evalúa la simbiosis en suelos representativos de una región, es necesario establecer tratamientos con inoculantes y sin ellos, para poder evaluar la efectividad de las cepas nativas e inoculadas. En el Capítulo 2 se describe el manejo de los rizobios para producir los inoculantes para este tipo de ensayo. En el Capítulo 3 se discute en detalle el montaje y manejo de los ensayos agronómicos para evaluar la simbiosis, empleando la nodulación y el rendimiento de nitrógeno como parámetros de evaluación.

Preguntas de estudio

En las preguntas 1 a 8 complete los enunciados, llenando los espacios en blanco:

1. La enzima que cataliza la reacción que convierte el nitrógeno molecular en amonio es la _____.
2. Las bacterias de la familia Rhizobiaceae se clasifican en dos géneros, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Complete el siguiente cuadro con sus principales características en medio de levadura-manitol:

Género	Reacción	Tasa de crecimiento	Ejemplo
<i>Rhizobium</i>	_____	_____	_____
<i>Bradyrhizobium</i>	_____	_____	_____

3. Enuncie las cuatro etapas del ciclo de vida de los rizobios:

1. _____	2. _____
3. _____	4. _____
4. Hay cuatro parámetros que se utilizan para evaluar la nodulación en las leguminosas en el campo; estos son:

1. _____	2. _____
3. _____	4. _____
5. Defina brevemente la función de la leghemoglobina:

6. Es conocido que los altos niveles de N mineral en el suelo inhiben la fijación de nitrógeno. En el caso de la simbiosis leguminosa-rizobio, esta inhibición pueden darse en los siguientes tres niveles:

1. _____

2. _____
3. _____

7. Defina brevemente los siguientes conceptos sobre la simbiosis leguminosa-rizobio:

Infectividad _____

Efectividad _____

8. La conversión de N molecular a NH_3 es un proceso que requiere alta energía debido a _____

Frente a cada uno de los enunciados que sigue a continuación, coloque una (C) si considera que la afirmación es cierta, una (F) en caso contrario.

9. La mayoría del N del suelo se encuentra en forma orgánica, no aprovechable para las plantas. ()
10. Las estructuras responsables de la multiplicación de los rizobios son las esporas. ()
11. En los ensayos de campo se puede usar el rendimiento de nitrógeno de una leguminosa para cuantificar el N fijado. ()
12. La distribución de los nódulos entre las raíces secundarias y primarias depende de la especie de leguminosa. ()
13. El nitrógeno cedido por los nódulos a las leguminosas es transportado por el xilema en forma de amonio. ()
14. La nitrogenasa también cataliza la reacción que convierte el acetileno en etileno. ()
15. La enzima nitrogenasa es muy sensible al oxígeno. ()

En las siguientes preguntas, marque la alternativa que complementa correctamente el enunciado.

16. La infección de los rizobios a las raíces ocurre generalmente a través de:
- a. las raíces secundarias
 - b. los pelos radicales
 - c. las células corticales
 - d. los puntos de crecimiento
 - e. todos los anteriores

17. El tamaño de los nódulos radicales es determinado principalmente por:
- la cepa de rizobio
 - la leguminosa
 - las condiciones de manejo
 - las condiciones ambientales
 - todas las anteriores
18. El máximo suministro de energía (carbohidratos) de la leguminosa hacia los nódulos ocurre en:
- la fase vegetativa
 - durante la formación de los nódulos
 - la fase reproductiva
 - la madurez
 - es constante
19. El color interno rojo de los nódulos activos se debe a:
- la nitrogenasa
 - los bacterioides
 - la leghemoglobina
 - el oxígeno
 - ninguna de las anteriores
20. La mayoría de las leguminosas de importancia económica pertenece a la subfamilia
- Mimosoideae
 - Papilionoideae
 - Caesalpinoideae
 - a y b
 - b y c

Manejo de los rizobios

Para lograr una combinación leguminosa-rizobio efectiva, es posible intervenir para cambiar uno u otro de los simbioses bien sea seleccionando leguminosas que nodulen efectivamente con las cepas nativas locales, o modificando la población de cepas nativas mediante la inoculación con cepas seleccionadas.

La preparación y evaluación de los inoculantes constituye una parte muy importante en los trabajos de evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio, y requiere de un laboratorio dotado de ciertos equipos para realizar los procedimientos de aislamiento, autenticación, evaluación y preservación de las cepas de rizobio, al igual que para preparar los inoculantes necesarios para los ensayos y evaluar su calidad. Sin embargo, la mayor parte del trabajo requerido se puede realizar en un laboratorio de fitopatología o de bacteriología animal; el laboratorio no tiene que ser dotado especialmente para trabajos de rizobiología.

Los inoculantes inicialmente se producen a partir de cepas de rizobios aislados de nódulos activos. El aislamiento puede ser realizado directamente por el interesado o por otra persona o institución que pueda suministrar las cepas para las pruebas agronómicas. De cualquier manera, es necesario tener conocimiento sobre el manejo y la preservación de rizobios para trabajar con inoculantes.

Recolección y manejo de cepas de rizobios

Recolección y preservación de los nódulos

El propósito de la recolección de nódulos es disponer de un rango amplio de germoplasma de rizobios provenientes de diferentes ambientes y diferentes ecotipos de leguminosas, para tener mayor probabilidad de encontrar cepas con buen potencial como inoculantes. Si en la localidad no existen las condiciones apropiadas para realizar el aislamiento de las cepas, los nódulos pueden enviarse a un laboratorio que reúna las condiciones necesarias.

Una vez colectados, los nódulos se descomponen rápidamente si no se conservan en tubos que contengan un desecante. Estos tubos, previamente preparados, deben llevarse durante los viajes de colección para poner los nódulos dentro de ellos inmediatamente después de recolectados (Figura 8).

La época más adecuada para la recolección de nódulos es durante la fase de crecimiento vegetativo de las plantas. Si se buscan durante otra estación y no se encuentran nódulos en las plantas, se puede recolectar un poco de suelo de los alrededores de las raíces, y posteriormente inocular una planta con esta muestra para que se formen nódulos con los rizobios procedentes del sitio de origen de la planta.

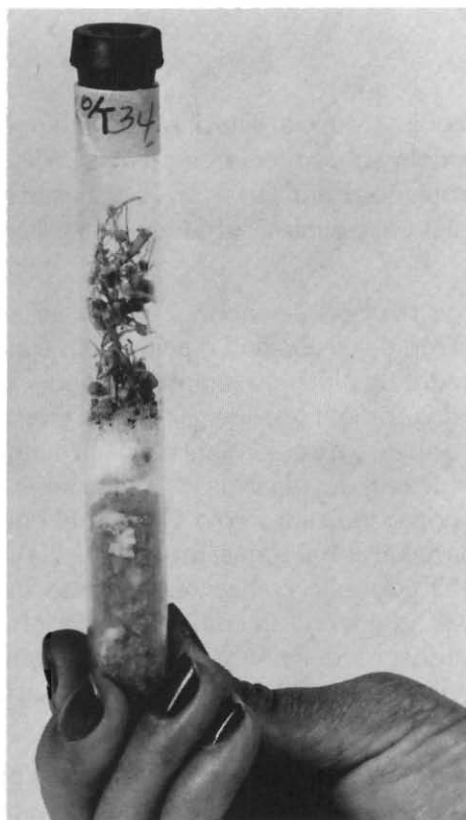


FIGURA 8. Tubo con desecante, empleado para preservar los nódulos colectados.

Es importante incluir, junto con los nódulos, toda la información acerca de su origen; además, si se envían a otro país para que aislen de ellos los rizobios, deben enviarse junto con los certificados fitosanitarios correspondientes.

Aislamiento, caracterización y autenticación de rizobios

El proceso de aislamiento de rizobios de los nódulos incluye varios pasos para separarlos de los contaminantes presentes. Además, es necesario realizar una serie de pruebas para caracterizar y autenticar los rizobios aislados. Una vez autenticados, se puede evaluar su efectividad potencial (su capacidad de fijar N_2 con las leguminosas en condiciones óptimas), aunque este último paso no es un requisito para proceder con las evaluaciones agronómicas posteriores.

Aislamiento

El aislamiento del rizobio se inicia esterilizando la superficie del nódulo, aplastándolo y estriándolo sobre medio de cultivo LMA (levadura-manitol-agar) con un pH apropiado. Para purificar es necesario sembrarla varias veces a partir de colonias individuales, estriando o rastrillando en la superficie del agar (Figura 9).

Las colonias típicas de rizobios se reconocen por su apariencia, tasa de crecimiento y producción de alcalinidad o acidez. En el medio de cultivo se puede incluir un indicador de pH; por ejemplo, en medio LMA con pH inicial 6.8, se incluye el azul de bromotimol, el cual torna el medio de color amarillo con la producción de acidez, y de color azul con la producción de alcalinidad (Figura 10, páginas centrales). En lugar de los indicadores de pH, al medio se le puede incorporar como indicador rojo Congo, el cual puede ayudar a diferenciar los rizobios de otras bacterias. En general, las colonias de rizobios presentan tinción débil con este colorante, en tanto que las colonias de muchas otras bacterias adquieren un color rojo más intenso; sin embargo, ésta no es una característica definitiva, ya que su expresión varía con la concentración de reactivo, la edad del cultivo y la exposición de las cajas a la luz.

La tasa de crecimiento también ayuda a reconocer las colonias de rizobios, especialmente las del género *Bradyrhizobium*, debido a que muchos contaminantes crecen más rápidamente que ellas (en 1 ó 2 días) y pueden ser eliminados.

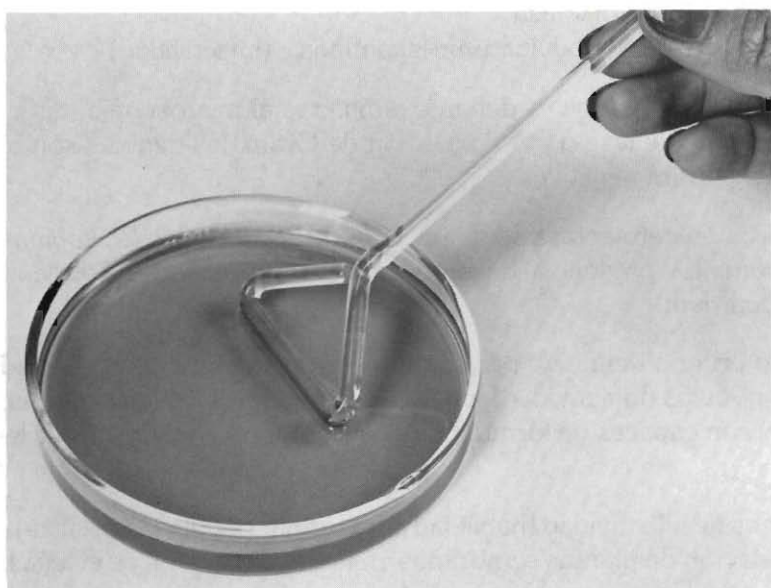
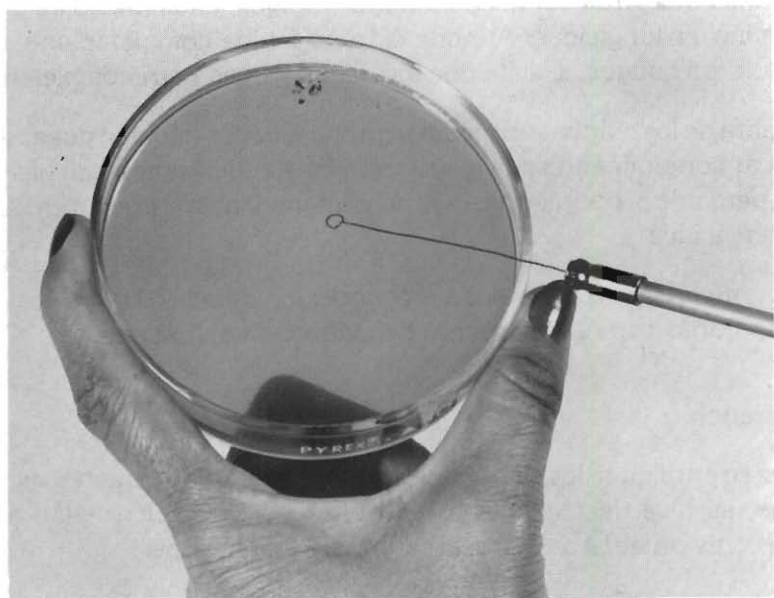


FIGURA 9. Métodos de estriado y rastrillado para la siembra de cultivos de rizobios.

Cuando las muestras contienen muchos hongos, en el medio de cultivo se pueden incluir fungicidas. Aunque ésto no inhibe completamente el crecimiento de los hongos, sí evita que invadan las cajas Petri completamente.

La siembra de los cultivos en medio peptona-glucosa también puede ayudar a identificar contaminantes. La mayoría de los rizobios no crecen bien en este medio, pero una proporción grande de contaminantes sí crecen en 24 horas y producen acidez.

El mejor método para aprender a reconocer las colonias de rizobios consiste en compararlas con el crecimiento de cultivos ya autenticados.

Autenticación

Una vez se purifiquen los aislamientos y se describan las características de las colonias, su tasa de crecimiento y la producción de alcalinidad o acidez, existen otras pruebas que se realizan para autenticarlos:

- a. Reacción de Gram
- b. Prueba de cetolactasa
- c. Habilidad para nodular una leguminosa (infectividad)

Todos los cultivos típicos deben examinarse al microscopio, directamente por contraste de fase o por coloración de Gram; los rizobios son bastones, móviles, y Gram negativos.

La prueba de cetolactasa se utiliza para distinguir entre *Rhizobium* y *Agrobacterium*. La presencia de cetolactasa confirma que el aislamiento es *Agrobacterium*.

El único criterio definitivo para autenticar los rizobios, es su habilidad para formar nódulos (infectividad), pues sólo los rizobios (y *Agrobacterium tumefaciens*) son capaces de formar nódulos (tumores) en las raíces de leguminosas.

La prueba de infectividad (habilidad para formar nódulos) se realiza mediante la inoculación de plantas sembradas en un medio estéril; se evalúa la formación de nódulos, siempre haciendo comparaciones con un testigo no inoculado. El sistema de crecimiento depende del tamaño de la planta escogida para la prueba. Puede hacerse en tubos de ensayo, en bolsas de crecimiento o

en jarras de Leonard (Figura 11). En estas pruebas no es necesario evaluar el rendimiento de las plantas, sino solamente la presencia o ausencia de nódulos.

Efectividad potencial

Las pruebas de efectividad potencial se realizan para evaluar la habilidad que tengan las cepas de rizobios para fijar nitrógeno con una determinada leguminosa en condiciones óptimas de crecimiento. El objetivo es medir el potencial genético de la simbiosis para fijar nitrógeno; por eso, es importante eliminar todos los factores limitantes del crecimiento de la planta (excepto el nitrógeno). Las jarras de Leonard fueron diseñadas con este propósito; sin embargo, aún usando jarras de Leonard, es necesario optimizar la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes, etc. Además, en esta prueba sí es necesario evaluar la producción vegetal.

Las pruebas de efectividad potencial no son un requisito para realizar las pruebas agronómicas que se describen en el Capítulo 3, y no deben emplearse como método de preselección de cepas, ya que es más relevante la evaluación de las cepas en suelo que en medio estéril.

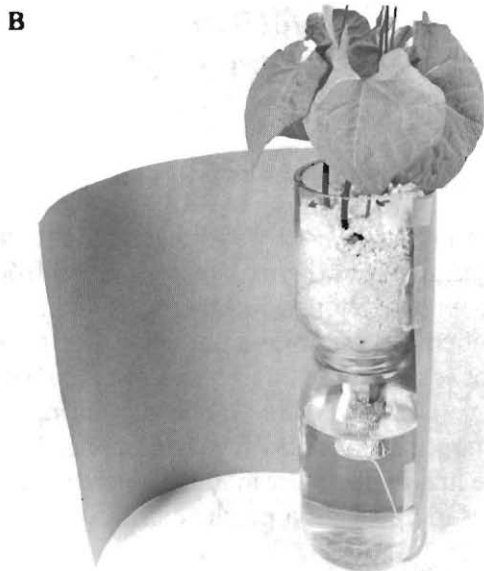
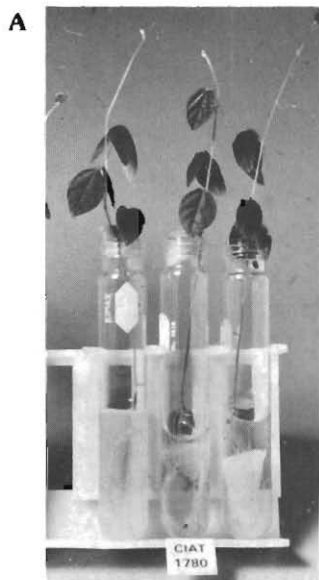
Preservación y reconstitución de cepas

Después de que las cepas de rizobios hayan sido aisladas y autenticadas, es necesario preservarlas adecuadamente para conservar su viabilidad y estabilidad genética. Las cepas se pueden preservar durante dos a tres meses en tubos con LMA inclinado, manteniéndolas en condiciones refrigeradas. No obstante, se debe tener en cuenta que algunas cepas tropicales pueden ser sensibles a las temperaturas bajas, y que los cultivos repetidos de una cepa pueden provocar cambios genéticos en los rizobios.

Si se desea almacenar cepas durante períodos de seis meses o más, la mejor manera de mantener los cultivos de rizobios en condiciones genéticamente estables es mediante una desecación adecuada.

Liofilización

La liofilización o desecado en frío es un método ampliamente utilizado para la preservación de microorganismos. Consiste en un enfriamiento rápido de las



- A - Tubo de ensayo
- B - Jarra de Leonard
- C - Bolsa de crecimiento

FIGURA 11. Dispositivos para evaluar la infectividad de las cepas de rizobios.

cepas hasta temperaturas muy bajas, seguido por una deshidratación rápida mediante sublimación por alto vacío. Se deben usar cultivos puros de bacterias, y es conveniente obtenerlos de cajas Petri con medio de cultivo donde se pueda distinguir fácilmente si hay o no contaminación. El medio comúnmente usado para suspender las cepas es peptona al 5% y sucrosa al 10%.

Las cepas liofilizadas se conservan al vacío en ampollas de vidrio. Para reconstituirlas, se rompe la ampolla, se suspenden las células en el medio de cultivo, y se resiembran en medio LMA; estos cultivos pueden demorarse más en crecer que los cultivos frescos. Los cultivos liofilizados pueden permanecer viables durante varios años.

Preservación en fragmentos de porcelana

En esta técnica se utilizan perlas de porcelana no vitrificadas, del tipo utilizado para los aisladores eléctricos. El cultivo que se desea preservar se hace crecer en medio LM líquido y se le agrega maltosa al 10%. Las perlas de porcelana esterilizadas se impregnan de este caldo y se guardan en un frasco esterilizado que contiene un desecante. Cuando se necesita obtener un cultivo, se extrae una perla y se resiembran en medio LMA o LM líquido. El frasco de existencias puede utilizarse varias veces hasta que se hayan agotado todas las perlas. Las perlas se conservan mejor en el refrigerador y se deben renovar cada tres años.

Preservación en aceite mineral

Esta técnica es una alternativa menos segura que las anteriores. Consiste en hacer crecer las cepas que se desea preservar, en tubos que contengan LMA inclinado, y luego cubrirlas con una capa de aceite mineral esterilizado para favorecer la conservación. Mediante esta técnica pueden preservarse hasta seis meses a la temperatura de un refrigerador.

Preparación y manejo de inoculantes

Función de los inoculantes

Se le llama inoculante a la mezcla de un cultivo de una cepa de rizobio con un soporte. El soporte más utilizado es la turba (suelo con alto contenido de material orgánico). La función del inoculante es permitir la supervivencia y la fácil manipulación de los rizobios para asociarlos con la leguminosa deseada.

Preparación de los inoculantes

Multiplicación en medio líquido o en una superficie de agar

Para producir cantidades grandes de inoculantes, es necesario multiplicar las cepas en un medio de cultivo líquido. Existen fermentadores de diferentes tamaños y diseños, los cuales se pueden utilizar para este propósito. Para cantidades pequeñas, se pueden multiplicar en una superficie de agar y luego suspenderlas en el caldo. Esto tiene la ventaja de permitir que la pureza del cultivo se pueda verificar fácilmente en forma visual, en tanto que en un medio líquido es necesario tomar otras medidas para asegurarla (pH final, examen al microscopio y cultivo en medio peptona-glucosa).

Para los ensayos de invernadero, en los que no es necesario almacenar los inoculantes, se pueden usar caldos o suspensiones de rizobios para inocular directamente las plántulas.

Preparación, empaque, maduración y almacenamiento del inoculante

Para preparar un inoculante con base en turba, se mezcla directamente el caldo o la suspensión de células con la turba. Factores como el pH y la humedad final de la turba afectan la sobrevivencia de los rizobios. Si se está utilizando turba esterilizada, se puede inyectar el caldo directamente a las bolsas plásticas previamente empacadas, tomando las precauciones necesarias para evitar la contaminación (Figura 12, páginas centrales). Para preparar inoculantes con base en turba no estéril, se mezcla el caldo con la turba y luego se empaqueta en bolsas de polietileno delgado que permitan el intercambio de gases con el ambiente.

Una vez se hayan mezclado las células con la turba, se incuban los inoculantes frescos a temperaturas de 25-30°C durante una semana, para permitir la multiplicación de los rizobios. Este proceso se llama “maduración” del inoculante.

El inóculo es un producto biológico y, por lo tanto, no puede almacenarse y manipularse de la misma forma que un fertilizante inerte, sino que es necesario tomar precauciones para su preservación y uso adecuados. Cuando el inóculo está preparado con base en turba estéril, se puede almacenar a temperatura ambiente durante seis meses, siempre y cuando ésta no sea superior a 30°C. La conservación del inóculo preparado con base en turba no

estéril generalmente es mejor a temperaturas bajas, con lo cual se inhibe el crecimiento de contaminantes. Algunas cepas tropicales no toleran temperaturas bajas (por ejemplo TAL 182 y TAL 1000; NifTAL, 1984) y no deben almacenarse en refrigerador, lo cual reduce el tiempo de almacenamiento.

Evaluación de la calidad de los inoculantes

Aunque un inoculante supuestamente contiene cepas efectivas de rizobios, existe la posibilidad de que el medio de cultivo esté contaminado o que haya ocurrido una alta mortalidad de células de rizobio; por esta razón, se recomienda realizar recuentos de rizobios tanto en el inoculante como en las semillas inoculadas. Cuando se presenta una falta de respuesta a la inoculación en el campo, ésto ayuda a definir sus causas.

Se considera que 2×10^7 rizobios/g de inoculante ó 300 rizobios/semilla son las cantidades mínimas de rizobios requeridas para obtener una nodulación adecuada. Sin embargo, son aconsejables niveles mayores (10^4 - 10^6 rizobios/semilla), especialmente cuando existe competencia con cepas nativas.

Para hacer recuentos de rizobios en los inoculantes o en las semillas inoculadas, en general existen dos métodos: el recuento de colonias de rizobios en cajas Petri y un recuento basado en la formación de nódulos en plantas de leguminosas. Debido al amplio rango que puede existir en las muestras en lo que respecta al número de rizobios (entre 0 y 10^{10} /g), es necesario hacer previamente una serie de diluciones para efectuar los recuentos.

Recuentos en cajas Petri

Los recuentos en cajas Petri sólo se pueden realizar si la muestra está libre de contaminantes, porque si crecen muchos contaminantes, es muy difícil reconocer las colonias de rizobios. Este método supone que cada colonia se origina a partir de una sola célula de rizobio. Para realizar el recuento, se distribuyen alícuotas de las diluciones preparadas en medio LMA en cajas Petri, y se hace un recuento en la dilución en la cual las colonias crezcan bien separadas (30 a 300 por caja).

Recuento en plantas (número más probable, NMP)

El método del número más probable (NMP) permite estimar la población de un microorganismo sin hacer un recuento real de células o colonias. En el



FIGURA 5. Los nódulos fijadores de nitrógeno tienen formas y tamaños variados.

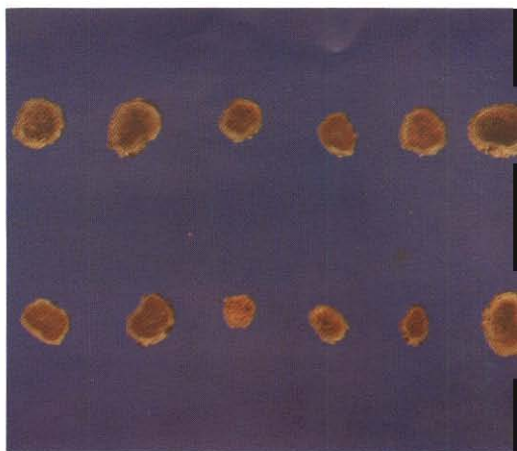


FIGURA 6. El color interno de los nódulos efectivos es rojo o rosado.

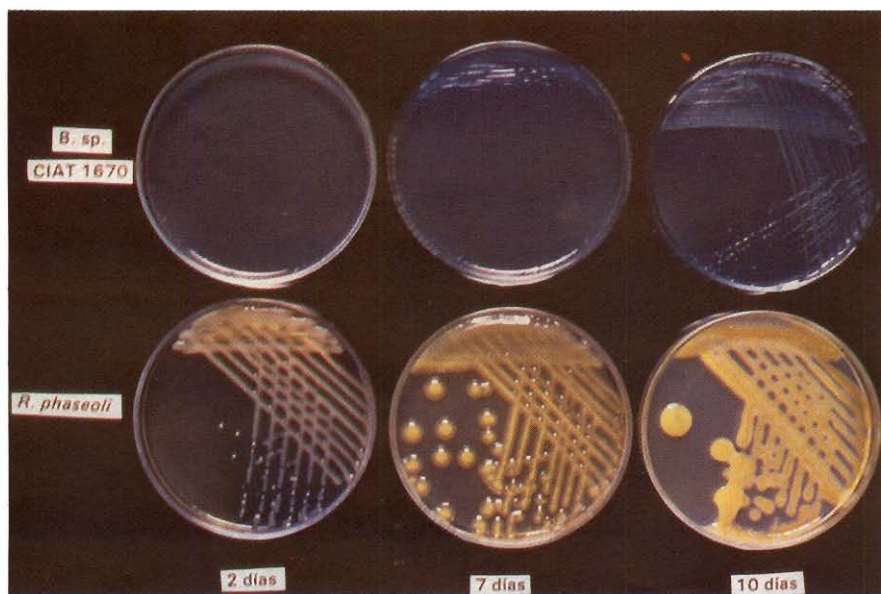


FIGURA 10. Colonias de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium phaseoli*. Nótese la diferencia en la tasa de crecimiento y el pH del medio, indicado por los cambios en su coloración.



FIGURA 12. Mezcla de la suspensión de rizobios con la turba estéril.

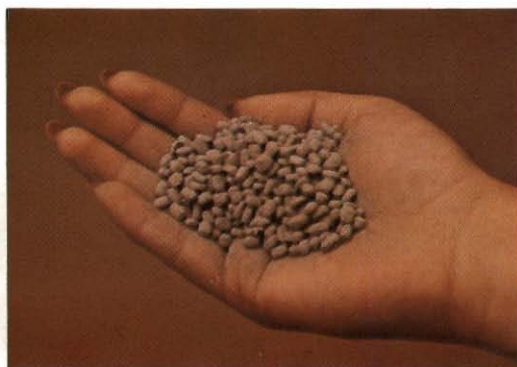


FIGURA 14. Semillas inoculadas recubiertas con roca fosfórica.



FIGURA 17. Etapa I. Tratamientos para evaluar las cepas nativas.



FIGURA 20. Etapa II, caso A. No es necesario inocular.

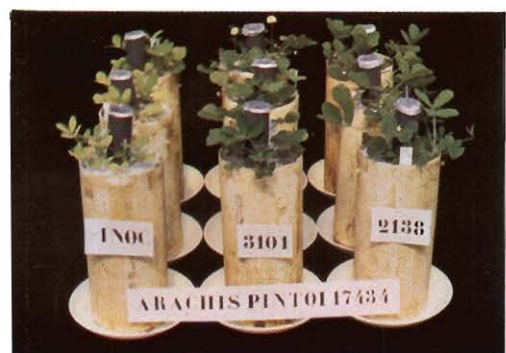


FIGURA 21. Etapa II, caso B. La cepa evaluada es efectiva.



FIGURA 22. Etapa II, caso C. Es necesario seleccionar cepas.

caso de rizobios, la técnica del NMP se basa en la formación de nódulos en plantas inoculadas con alícuotas de las diluciones sucesivas de la muestra. En las condiciones establecidas para este método, se debe formar un nódulo en la planta hospedante si una célula de rizobio está presente en la alícuota.

El método del NMP para plantas se puede realizar en tubos de ensayo o en bolsas de crecimiento (growth pouches), dependiendo del tamaño de la planta hospedante. La leguminosa que se usa con más frecuencia para los recuentos del grupo de rizobios que nodula con leguminosas forrajeras tropicales es *Macroptilium atropurpureum* cv. "Siratro". Esto se debe a su habilidad para nodular con un rango amplio de cepas de rizobios de crecimiento lento y a que es más fácil hacerla crecer en tubos de ensayo por ser una planta de porte pequeño. Cuando se trabaja con frijol o leguminosas de grano que tienen semillas de mayor tamaño, se deben utilizar bolsas de crecimiento.

Para realizar cada recuento, se inoculan cuatro tubos o bolsas de crecimiento, con cada una de seis o más diluciones de la muestra; después de tres a cuatro semanas de crecimiento, se hace la evaluación de la nodulación (presencia o ausencia de nódulos en cada tubo o bolsa). Con base en la teoría de la probabilidad, y utilizando las tablas de conversión desarrolladas para este propósito (véase "Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo"), es posible calcular el número más probable de rizobios en la muestra a partir del número de plantas con o sin nódulos que reciben cierta cantidad del inóculo.

Inoculación

En casi todos los suelos se encuentran poblaciones nativas de rizobios. Sin embargo, estas poblaciones varían en cantidad, especificidad y efectividad (Figura 13).

Objetivo de la Inoculación

El objetivo de la inoculación es modificar la población de rizobios en el suelo, mediante la introducción de cepas efectivas. Es más probable que una leguminosa específica responda a la inoculación en el campo que una leguminosa

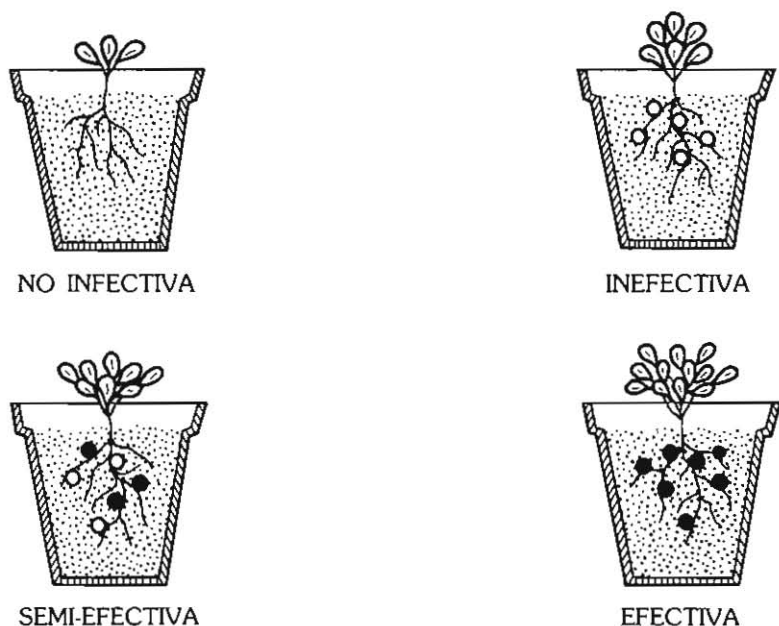


FIGURA 13. Las cepas no infectivas no forman nódulos con la leguminosa hospedante. Las cepas infectivas pueden establecer una simbiosis inefectiva, semiefectiva o efectiva con la leguminosa hospedante.

promiscua, debido a la escasez de cepas nativas en el suelo que nodulen con las leguminosas específicas.

Sin embargo, aún en el caso de que una leguminosa promiscua forme nódulos abundantes con las cepas nativas, varios factores afectan la efectividad de la simbiosis en el campo: 1) la mezcla de cepas nativas en el suelo puede incluir pocas cepas efectivas; 2) las cepas inefectivas pueden ser más competitivas e inhibir la nodulación por las cepas efectivas; 3) las condiciones de estrés pueden bajar la efectividad de la simbiosis. En consecuencia, es común observar que las leguminosas promiscuas presenten nodulación “semiefectiva” con las cepas en el campo (nodulan, pero fijan una cantidad reducida de N_2 que no les permite alcanzar su potencial de rendimiento). Como resultado, aún una leguminosa clasificada como promiscua puede requerir inoculación en condiciones de campo, al igual que una leguminosa específica.

En el caso de leguminosas que forman una simbiosis semiefectiva con las cepas nativas, es necesario que las cepas presentes en el inoculante sean capaces de competir con las cepas nativas por los sitios de nodulación. Por otra parte, una posible falla del inoculante no tiene consecuencias muy graves puesto que las cepas nativas fijan algún nitrógeno, aunque no sea una cantidad muy alta. Cuando se inoculan leguminosas específicas que no nodulan con las cepas nativas en el suelo, no hay problema de competencia entre las cepas nativas y las inoculadas. Pero si el inoculante falla por algún motivo, la planta sufriría deficiencia aguda de N.

Inoculación de las semillas

La semilla se puede inocular mediante la simple mezcla del inoculante turboso con agua, y agregándolo a la semilla. Sin embargo, el número de rizobios por semilla y su supervivencia es mucho mayor si el inoculante se pega a la semilla con un adhesivo y si la semilla inoculada se cubre con un material protector como roca fosfórica o cal (Figura 14, páginas centrales). Los pegantes más frecuentemente utilizados son la goma arábiga, la metilcelulosa, la leche y el azúcar. Los resultados publicados generalmente muestran que la goma arábiga es el pegante que permite una mayor supervivencia del rizobio en la semilla.

La supervivencia de los rizobios en las semillas puede ser baja debido al desecamiento de las células, lo cual causa su muerte. Por esta razón, no debe haber demora entre la inoculación y la siembra. Para los ensayos de campo, es aconsejable hacer la inoculación en las primeras horas de la mañana, con el fin de poder hacer los recuentos y la siembra en el transcurso del mismo día.

Inoculación del suelo

El suelo se inocula cuando las semillas han sido tratadas con elementos tóxicos para los rizobios o cuando se requiere un mayor número de rizobios que no se le puede aplicar a las semillas. En situaciones en las que hay mucha competencia con las cepas nativas, este método de inoculación aumenta la probabilidad de que las cepas inoculadas formen una alta proporción de nódulos.

Se aplica hasta un gramo de inoculante por metro de surco, lo cual equivale a

10-20 kg de inoculante/ha. Estas grandes cantidades de inoculante generalmente no son recomendables para ser usadas por agricultores, pero son útiles en ensayos preliminares en los que se pretende eliminar la competencia con cepas nativas o en los que se considera factible que los agricultores usen este tipo de inoculante, como por ejemplo, en pequeñas áreas en las que cultivan productos de alto valor.

Preguntas de estudio

Enuncie brevemente el propósito de cada uno de los siguientes procedimientos:

1. Recolección de nódulos: _____

2. Aislamiento de los rizobios de los nódulos: _____

3. Autenticación de los rizobios: _____

4. Evaluación de la efectividad potencial de los rizobios: _____

5. Preservación de cepas de rizobios: _____

6. Inoculación: _____

7. Maduración de inoculantes: _____

8. Evaluación de la calidad de los inoculantes: _____

En las siguientes preguntas, complete los enunciados llenando los espacios en blanco:

9. Tres de los principales parámetros para reconocer las colonias típicas de rizobios son:
 1. _____
 2. _____
 3. _____

10. Existen varias pruebas que permiten autenticar los rizobios. Las principales son:

1. _____
2. _____
3. _____

¿Cuál es la más concluyente? _____

11. Existen varios métodos para preservar las cepas de rizobios. Tres de ellos son:

1. _____
2. _____
3. _____

¿Cuál es el más eficaz? _____

12. Explique brevemente el procedimiento que seguiría para aislar rizobios, si la planta que a usted le interesa no presenta nódulos en el momento de la recolección.

Frente a cada uno de los enunciados que siguen a continuación, coloque una (C) si considera que la afirmación es cierta, o una (F) en caso contrario.

13. El Rojo Congo es un indicador que ayuda a distinguir los rizobios de otras bacterias. ()
14. Las leguminosas promiscuas nunca requieren inoculación en el campo. ()
15. Para que un inoculante se considere de buena calidad debe contener por lo menos 300 células de rizobio/g. ()
16. Los tubos que se preparan para preservar los nódulos colectados en el campo deben contener un desecante. ()
17. La mejor época para coleccionar nódulos activos es durante la fase reproductiva de las leguminosas. ()
18. La prueba de cetolactasa se emplea para diferenciar los rizobios de *Agrobacterium tumefaciens*. ()
19. La excesiva demora en sembrar las semillas inoculadas puede causar la muerte de los rizobios debida a desecación ()

- 20. La esterilización superficial asegura la eliminación de los contaminantes de las cepas aisladas de los nódulos. ()
- 21. En la inoculación de semillas, la inclusión de un adherente contribuye a la supervivencia de los rizobios. ()
- 22. Para la evaluación de los inoculantes preparados con base en turba estéril, se recomienda el método del número más probable (NMP). ()
- 23. Para que la inoculación de una leguminosa promiscua tenga éxito, las cepas utilizadas deben ser competitivas. ()
- 24. En el medio peptona-glucosa se observa buen crecimiento de rizobios. ()
- 25. Se recomienda la inoculación del suelo cuando las semillas están tratadas con fungicidas. ()

Evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio

El proceso de fijación de nitrógeno y su eficiencia son el resultado de una compleja interacción, genéticamente controlada, entre los dos organismos involucrados (planta y rizobios) y el ambiente.

Es importante decidir en qué momento y de qué manera incluir la evaluación y el mejoramiento de la fijación simbiótica de nitrógeno en el proceso de selección de leguminosas, según las necesidades del programa. Las evaluaciones de fijación de nitrógeno deben complementar las evaluaciones de otras características deseables, para poder seleccionar las leguminosas con la mejor combinación de todas las características.

Objetivos, tratamientos y parámetros para la evaluación agronómica

La evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-rizobio tiene como objetivo seleccionar germoplasma de leguminosas que tenga un elevado potencial para fijar nitrógeno atmosférico en condiciones locales determinadas.

Para alcanzar este objetivo, no siempre será necesario inocular las leguminosas seleccionadas, ya que, en algunos casos, éstas establecen una simbiosis efectiva con las cepas nativas de rizobios. Cuando las cepas nativas no son efectivas, es necesario seleccionar tanto las leguminosas como las cepas de rizobios para lograr una adecuada combinación de los dos simbiotes.

Para caracterizar las leguminosas según la efectividad de la simbiosis que establecen con las cepas nativas o inoculadas, es necesario seleccionar los

tratamientos apropiados; dichos tratamientos dependen de la etapa de selección en la cual se encuentran las leguminosas. Existen tres tratamientos principales, de los cuales se usan combinaciones para evaluar la fijación de nitrógeno. Estos tratamientos son los siguientes:

- Bajo nivel de disponibilidad de nitrógeno, sin inocular (= sin inocular).
- Bajo nivel de disponibilidad de nitrógeno, con inoculación (= inoculado).
- Alto nivel de disponibilidad de nitrógeno, sin inocular (= alto N).

La aplicación de estos tratamientos o de sus combinaciones permite caracterizar agrónomicamente la simbiosis en suelos representativos, en relación con los siguientes aspectos: 1) efectividad relativa de las cepas nativas; 2) rendimiento potencial de las leguminosas cuando no tienen limitación en el suministro de nitrógeno; 3) efecto de los inoculantes en el rendimiento y 4) necesidad de realizar mejoramiento genético, en el caso de que existan limitaciones en la capacidad de la planta para fijar nitrógeno.

Es necesario establecer condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno mineral para poder observar el potencial de rendimiento de la planta cuando el suministro de nitrógeno depende casi totalmente de la fijación simbiótica. Esto se debe al hecho de que el nitrógeno mineral inhibe tanto la nodulación como la actividad de los nódulos, ya que es absorbido preferentemente por la planta y enmascara la efectividad de la simbiosis. Cuando se quiere determinar el rendimiento potencial de la planta que crece sin limitación en el suministro de nitrógeno, se utilizan altos niveles de nitrógeno disponible.

Los parámetros que se utilizan para evaluar la simbiosis dependen de los tratamientos aplicados. En los tratamientos que se establecen con baja disponibilidad de nitrógeno mineral, con o sin la aplicación de inoculantes, se evalúan la nodulación (ya que se necesita evaluar la infectividad y efectividad de las cepas nativas o inoculadas) y el rendimiento de nitrógeno de la planta para estimar la cantidad de nitrógeno fijado.

En los tratamientos que se establecen con alta disponibilidad de nitrógeno mineral (fertilizado con N), sólo se evalúa el rendimiento de nitrógeno, ya que en este caso la nodulación queda inhibida o es muy restringida, y lo que se busca es conocer el rendimiento potencial de la planta en condiciones de suministro adecuado de nitrógeno.

Estas evaluaciones no dan una medida exacta de la fijación de nitrógeno, pero son adecuadas para obtener estimaciones relativas, y se pueden emplear cuando se trabaja con grandes cantidades de accesiones.

La información obtenida permite realizar selecciones de germoplasma con alto potencial de fijación de nitrógeno. Es importante resaltar el hecho de que, aunque no se establezcan tratamientos definidos en cuanto a los niveles de nitrógeno disponible y al uso de inoculantes durante un programa de selección de leguminosas, las condiciones que se utilicen necesariamente afectarán el rendimiento relativo de las plantas. Como consecuencia, el usar el rendimiento como criterio de selección puede llevar a seleccionar leguminosas con bajo potencial de fijación de nitrógeno, o por el contrario, a descartar material potencialmente valioso por su capacidad simbiótica.

Etapas de la evaluación

Los programas de selección normalmente se realizan por etapas sucesivas. Las tres etapas generales del proceso de evaluación y selección de combinaciones leguminosa-rizobio se resumen en la Figura 15.

La Etapa I_R corresponde a los trabajos preliminares con rizobios que se describieron en el Capítulo 2. En la Etapa I_L se evalúa un alto número de accesiones de leguminosas en ensayos denominados “necesidad de inocular”, los cuales permiten identificar las leguminosas que nodulan efectivamente con las cepas nativas y las que necesitan inoculación o mejoramiento genético. En esta etapa no se requiere el uso de inoculantes.

Las leguminosas que han sido identificadas por establecer una simbiosis inefectiva con las cepas nativas pasan a la Etapa II, en la cual se realizan los ensayos denominados “necesidad de seleccionar cepas”, en los cuales se evalúan junto con las cepas recomendadas disponibles; si estas cepas no demuestran ser efectivas con el germoplasma evaluado, es necesario un paso posterior de selección de cepas efectivas, hasta lograr identificar las mejores combinaciones leguminosa-suelo-cepa. En ambas etapas (I y II) pueden detectarse leguminosas que tienen una capacidad de fijación de nitrógeno deficiente; en estos casos, si es necesario se debe realizar mejoramiento genético con base en estas características.

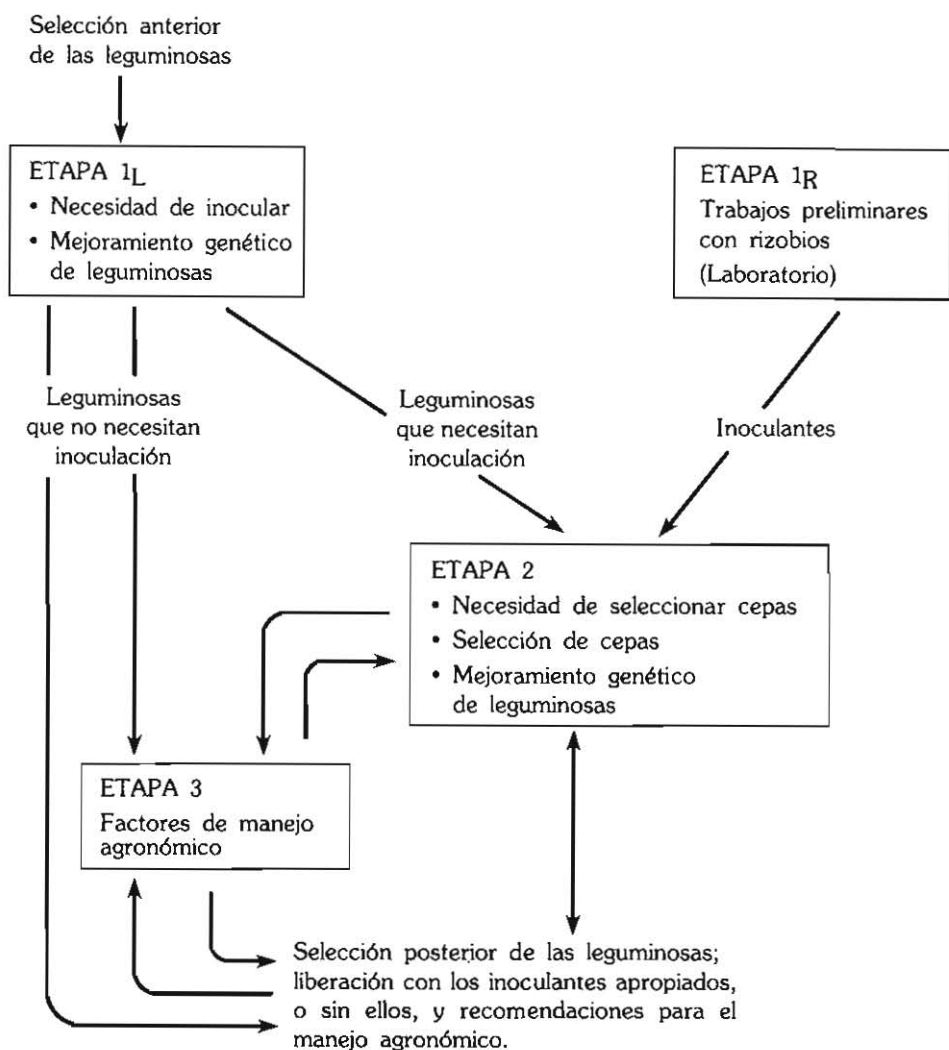


FIGURA 15. Diagrama de flujo del germoplasma por las distintas etapas de investigación para aumentar la fijación de nitrógeno mediante el manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio.

En la Etapa III se evalúan los efectos de las prácticas de manejo agronómico sobre las combinaciones leguminosa-rizobio (nativo o inoculado) seleccionados en las Etapas I y II. El propósito de esta evaluación es establecer las pautas de manejo que permitan optimizar la fijación de N_2 .

En la siguiente parte de este capítulo se describe en detalle cada uno de los ensayos requeridos en las diferentes etapas de evaluación. La parte final se ocupa de las recomendaciones sobre el montaje y manejo de los ensayos.

Evaluación de la efectividad de las cepas nativas (Etapa II)

En este tipo de evaluación se compara un amplio número de leguminosas, o genotipos de una leguminosa, con el fin de caracterizarlas según su habilidad para establecer una simbiosis efectiva con las cepas nativas; esto ayuda a identificar las leguminosas que requieren inoculación y evitar que sean eliminadas en las selecciones preliminares por falta de vigor.

Es necesario establecer dos tratamientos: sin inoculación (con baja disponibilidad de N mineral) y fertilizado con nitrógeno, considerados como el tratamiento “no inoculado”, y el testigo con fertilización nitrogenada respectivamente. Este ensayo se denomina “evaluación de la necesidad de inocular”.

El rendimiento de N en los dos tratamientos, junto con la evaluación de la nodulación en el tratamiento de baja disponibilidad de N, permite evaluar la efectividad de la simbiosis con las cepas nativas (Figura 16, y Figura 17, páginas centrales). Las leguminosas que nodulan efectivamente con las cepas nativas (A) son aquellas que nodulan bien en condiciones de bajo nivel de N, tienen un rendimiento adecuado y no responden a la fertilización con N; estas leguminosas no requieren inoculación, en el suelo en el cual se están evaluando. Sin embargo, es necesario pasar a la Etapa III para evaluar el efecto de los factores de manejo agronómico en la necesidad de inocular.

En el caso de la leguminosa B de la Figura 16, las plantas del tratamiento bajo en N presentan nódulos, rendimiento moderado o bajo y respuesta al N. Esta respuesta indica una simbiosis semiefectiva o inefectiva con las cepas nativas. En el caso de la leguminosa C, las plantas que crecen con bajo nivel de N pueden tener nódulos o no y exhiben una fuerte respuesta al N, lo cual indica que no se establece una simbiosis efectiva con las cepas nativas. Las plantas que se comportan como en los casos B y C requieren inoculación y se seleccionan para la Etapa II.

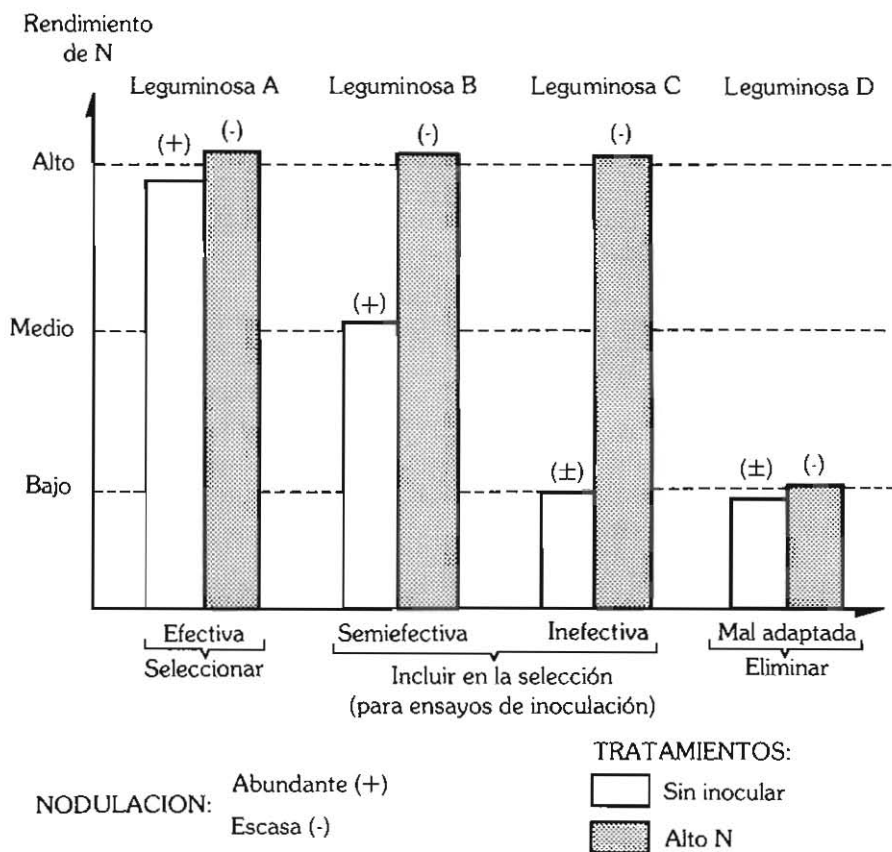


FIGURA 16. Efectividad de la simbiosis de diferentes especies o líneas de leguminosas con las cepas nativas en una localidad (dos tratamientos).

Por último, hay leguminosas mal adaptadas a las condiciones locales o que no tienen capacidad de respuesta a la fertilización nitrogenada (leguminosas D), como lo demuestra el bajo rendimiento en ambos tratamientos. Estas plantas se descartan de la selección, pero si se duda sobre su capacidad para absorber N mineral, se podrían continuar evaluando en las etapas siguientes, en las cuales se incluyen tratamientos inoculados.

Si se presenta el caso de una región en la que es imposible utilizar la tecnología de inoculantes y el germoplasma no establece simbiosis efectiva con las cepas

nativas, se deberá recurrir al mejoramiento genético para aumentar la habilidad para nodular con las cepas nativas.

Este tipo de ensayo demuestra que, cuando se usan dos tratamientos en las etapas preliminares de la selección en lugar de uno solo, se obtiene suficiente información para incluir en el próximo paso de selección, un rango de germoplasma más amplio en cuanto a su potencial de rendimiento. Es necesario tener en cuenta que, debido a que las cepas de rizobios varían en cantidad y calidad de un sitio a otro, la selección puede ser muy específica para cada localidad. Por esta razón, se recomienda evaluar las leguminosas en diferentes sitios representativos (Figura 18). Esto es muy importante, especialmente en áreas donde existen diferencias grandes en el suelo, en distancias pequeñas; por ejemplo, los suelos erosionados de laderas posiblemente muestren características microbiológicas muy pobres comparadas con los suelos de los valles.

Evaluación de la efectividad de la simbiosis incluyendo el uso de inoculantes (Etapa II)

En esta etapa se estudian las combinaciones leguminosa-suelo identificadas en la etapa anterior (casos B y C), con el fin de optimizar la efectividad de la simbiosis leguminosa-rizobio mediante inoculación. Esto se puede hacer en dos pasos: con ensayos preliminares sobre necesidad de selección de cepas y, posteriormente, con ensayos de selección de cepas, en aquellos casos en los que sea necesario. Además, en los casos en los que las combinaciones de leguminosa-rizobio evaluadas no alcancen niveles adecuados de fijación de nitrógeno, se puede obtener un rango mayor de líneas (mediante cruzamientos) para evaluar su variabilidad genética en cuanto a su capacidad para fijar nitrógeno, con el propósito de seleccionar aquellos materiales que establecen una simbiosis más efectiva con las cepas inoculadas. Las leguminosas identificadas en la Etapa I_L que no requieren inoculación no necesitan pasar por la Etapa II.

En la Etapa II se busca optimizar el uso de inoculantes durante el proceso de selección, con el fin de evitar la eliminación de aquellas leguminosas con características deseables debido a la falta de cepas apropiadas. Es decir la inclusión de inoculantes en las evaluaciones amplía el rango de germoplasma que se puede considerar como adaptado a las condiciones locales. Como

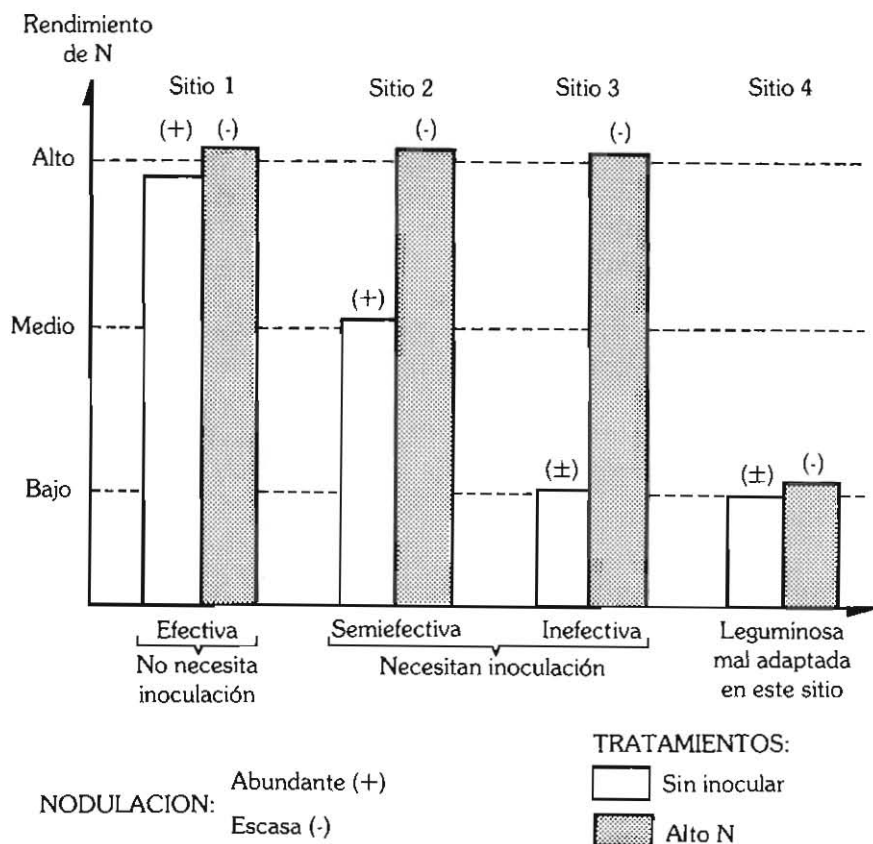


FIGURA 18. Efectividad de la simbiosis de una misma accesión de leguminosa con cepas nativas en suelos diferentes.

testigos se utilizan los mismos dos tratamientos recomendados en la etapa anterior (sin inocular y alto N) y se incluyen tratamientos adicionales, inoculando la leguminosa en estudio con la cepa más promisoría disponible o con un rango de cepas promisorias. En algunos casos se realizan ensayos de la Etapa II, sin haber realizado la Etapa I_L.

Necesidad de seleccionar cepas

Las combinaciones leguminosa-suelo que en la etapa anterior mostraron una simbiosis semiefectiva o inefectiva con las cepas nativas, ahora se evalúan con

inoculantes, utilizando cepas que han mostrado efectividad con las mismas leguminosas en otros sitios o que se consideran probablemente efectivas.

Para el efecto se emplean tres tratamientos:

1. Sin inocular, bajo N
2. Inoculado con una cepa probablemente efectiva
3. Fertilizado con N

Los resultados de este tipo de ensayo se presentan en la Figura 19. En el caso A, la leguminosa nodula efectivamente tanto con las cepas nativas, como con la cepa inoculada, haciendo innecesaria la inoculación (Figura 20, páginas centrales). El caso B muestra que la cepa utilizada nodula efectivamente, lo cual indica que se ha alcanzado el objetivo de seleccionar la cepa apropiada (Figura 21, páginas centrales). En el caso C, la cepa utilizada no es efectiva, razón por la cual el material debe pasar a un ensayo posterior, selección de cepas (Figura 22, páginas centrales). El caso D muestra mala adaptación de la leguminosa, ya que rinde pobremente aún en el tratamiento fertilizado o carece de habilidad para absorber N mineral.

El criterio general es que, si se obtiene una mayor respuesta al N que a la inoculación, se puede concluir que la cepa utilizada no es efectiva para las condiciones locales y se deben llevar a cabo otros ensayos para seleccionar cepas más adaptadas. Sólo se seleccionan cepas para estas leguminosas ya que las demás no necesitan inoculación o la cepa recomendada es efectiva en las condiciones locales. El objetivo de este tipo de ensayo es reducir al mínimo el trabajo de selección de cepas en condiciones locales; es decir, sólo se estudian con más detalle las leguminosas que realmente lo necesitan (Date, 1977).

Si existen diferentes suelos representativos de la región, es necesario confirmar los resultados de los ensayos en varios suelos, para determinar si la efectividad de la simbiosis con cada leguminosa varía de un sitio a otro.

Selección de cepas efectivas

Si hay necesidad de seleccionar cepas para combinaciones de leguminosa-suelo, primero es preciso obtener un rango de cepas "probablemente" efectivas y luego llevar a cabo el ensayo de selección.

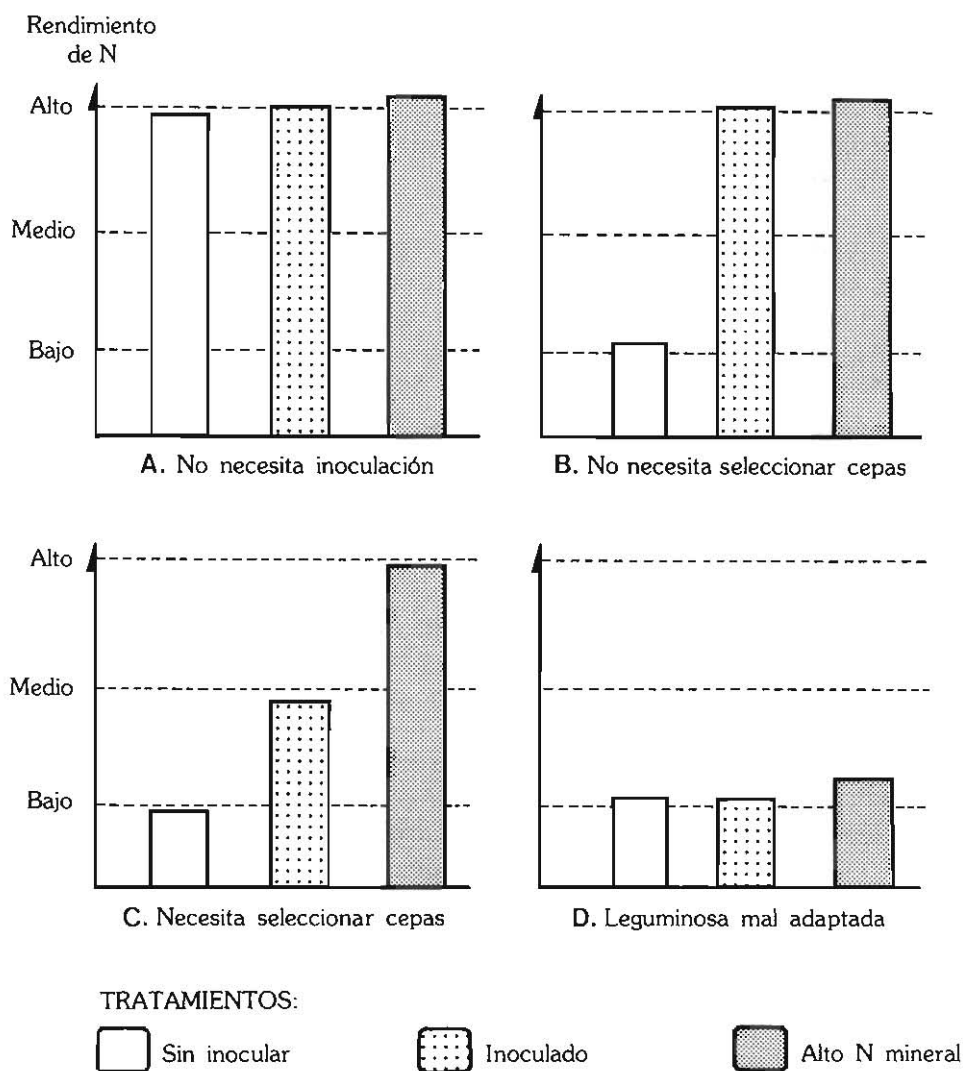


FIGURA 19. Determinación de la necesidad de seleccionar cepas para una leguminosa, basada en la respuesta a 3 tratamientos (sin inocular, inoculado y alto N).

Aunque se puede obtener un rango de cepas probablemente efectivas de otros laboratorios, también es importante aislar cepas a nivel local. Es muy probable que las cepas del mismo genotipo que ha sido cultivado en condiciones locales durante varios años, sean efectivas debido a un proceso lento de selección natural en las condiciones naturales de estrés. Sin embargo, es difícil pronosticar cuáles cepas serán efectivas, ya que una misma planta puede tener nódulos efectivos y no efectivos (Mytton, 1984).

Después de haber obtenido un rango adecuado de cepas, se debe comparar su efectividad en condiciones de invernadero, en suelo con baja disponibilidad de N. Si no hay un invernadero disponible, las cepas se pueden comparar en el campo en condiciones de baja disponibilidad de N (véase más adelante la sección 3.3 sobre Montaje y Manejo de los Ensayos). Posteriormente, es necesario verificar en condiciones de campo, el comportamiento de las cepas seleccionadas en el invernadero.

En este ensayo se incluyen como testigos los mismos dos tratamientos: sin inocular y alto N. Como criterio de selección se emplea el aumento en rendimiento debido a la inoculación, en comparación con el testigo sin inocular (Figura 23). Se ha encontrado que, en la selección de cepas para especies de leguminosas forrajeras tropicales (por ejemplo, usando cepas aisladas del mismo género), en casi todos los casos, por lo menos una de cada 40 cepas es efectiva (CIAT, 1986a). Si se evalúan cepas seleccionadas por ser efectivas en otros laboratorios, la probabilidad de encontrar una respuesta positiva es mucho mayor.

Se recomienda realizar la selección de cepas en suelo y no en arena estéril con solución nutritiva (jarras de Leonard), porque en la mayoría de los suelos tropicales, existen condiciones de estrés que son difíciles de simular en las jarras. También es necesario probar las cepas en suelo no esterilizado para poder seleccionarlas en condiciones de competencia con las cepas nativas. En estas condiciones se seleccionan las cepas que son capaces de competir con las nativas, ya que las no competitivas, aun cuando son efectivas, no producirán aumentos en rendimiento en comparación con el testigo sin inocular.

Antes de hacer la selección definitiva, se deben realizar varios ensayos para comprobar la capacidad de las cepas para incrementar los rendimientos. Algunas cepas son genéticamente inestables y pueden perder su capacidad

mg N en parte aérea

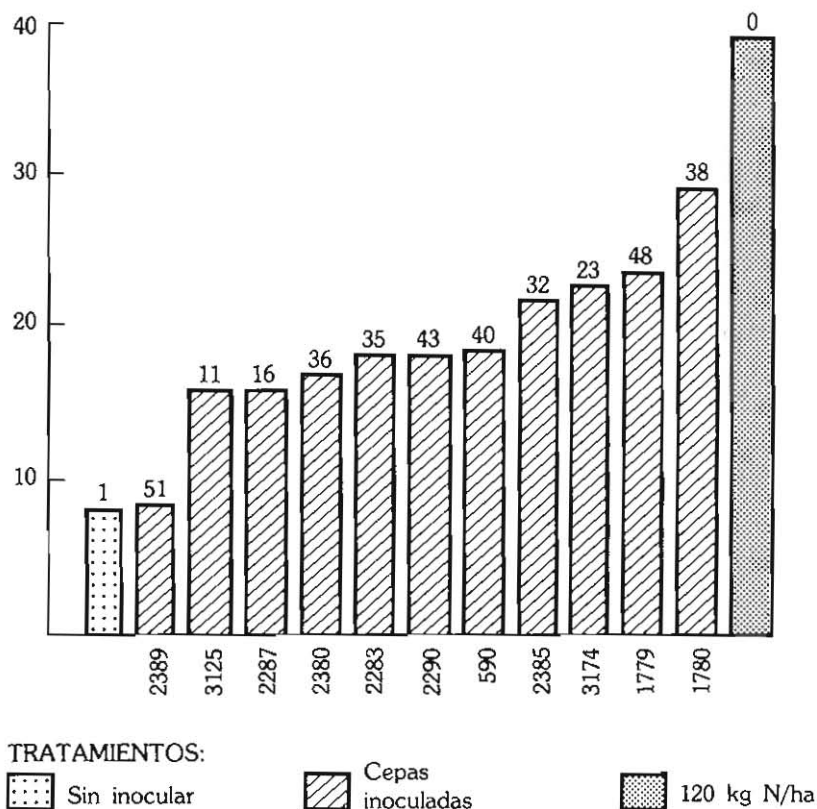


FIGURA 23. Resultados de un ensayo de evaluación de cepas con un ecotipo de *Centro-sema macrocarpum*, que muestra los incrementos en el rendimiento de N debidos al efecto de cada cepa; el número sobre las barras indica el número de nódulos por cilindro de suelo.

para fijar N_2 . Por otra parte, es importante seleccionar cepas con un amplio rango de especificidad; por esta razón, es conveniente probar las mejores cepas con diferentes leguminosas para poder seleccionar la cepa con el espectro más amplio.

En resumen, los criterios importantes para seleccionar las cepas son los siguientes:

- que presenten tolerancia a las condiciones locales;
- que tengan un amplio espectro de efectividad; y
- que tengan estabilidad genética.

Mejoramiento genético de leguminosas

Es posible que después de haber trabajado intensamente en la selección de cepas, se encuentre que exista una deficiencia genética de la planta que afecta su capacidad para fijar nitrógeno, pese a que se inocule con cepas con alta capacidad simbiótica. Si se trata de germoplasma valioso, lo indicado es incorporar un programa de cruzamiento y selección de genotipos para aumentar la capacidad genética de la planta en cuanto a su potencial para fijar nitrógeno. Siguiendo esta estrategia, se seleccionan los materiales con mayor capacidad de rendimiento y nodulación con cepas inoculadas, en un suelo con baja disponibilidad de nitrógeno mineral.

En este tipo de programa, generalmente se evalúa un número muy alto de materiales, lo cual dificulta el uso de varios tratamientos. Por este motivo, lo recomendable es inocular todos los materiales con una mezcla de cepas cuya efectividad haya sido previamente determinada. Si es posible, se incluye un tratamiento adicional fertilizado con nitrógeno, para así evaluar el rendimiento potencial de los nuevos materiales.

Evaluación de la interacción entre la simbiosis y los factores de manejo agronómico (Etapa III)

Las evaluaciones descritas anteriormente se realizan en condiciones agronómicas consideradas como óptimas para la fijación de nitrógeno (en el invernadero o el campo). Esta última etapa tiene el propósito de evaluar los factores de manejo que podrían limitar la efectividad de la simbiosis, con el fin de adaptar las combinaciones leguminosa- rizobio seleccionadas para su utilización por los agricultores.

El manejo agronómico a nivel de campo puede cambiar las condiciones que se utilizaron en los ensayos y, por consiguiente, también puede afectar la necesidad de inocular y, posiblemente, la efectividad de la cepa seleccionada. Para evaluar esta interacción, se pueden establecer tratamientos con o sin inoculación y con o sin fertilización nitrogenada, en combinación con las diferentes prácticas de manejo que utilizan los agricultores, con el fin de ajustar las

recomendaciones de inoculación para los pasos posteriores de selección; estos ensayos se deben realizar en forma paralela a las últimas etapas de evaluación.

En este tipo de ensayo, las diferentes condiciones de manejo se establecen en las parcelas principales, y los tratamientos con y sin inoculación, en las subparcelas.

Algunos factores de manejo agronómico pueden afectar la mineralización del nitrógeno, lo cual dificulta la interpretación de los resultados de los 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, es posible determinar si las mayores tasas de mineralización de nitrógeno coinciden con las menores respuestas a la inoculación. En los ensayos en los cuales se espera que los factores en estudio afecten los niveles de nitrógeno mineral, se sugiere incluir siempre un testigo en el cual se minimice la tasa de mineralización de nitrógeno, con y sin inoculación.

Técnicas de inoculación

Las diferentes técnicas de inoculación quizás no afecten los niveles de nitrógeno mineral en el suelo. En los ensayos sobre técnicas de inoculación, se utilizan testigos sin inocular y fertilizados con nitrógeno, y tratamientos con la misma cepa y diferentes técnicas de inoculación. Por ejemplo:

- Inoculación al suelo vs. inoculación a la semilla
- Tipos de inoculantes:
 - Convencional, con diferentes soportes (carbón, suelo, cáscara de arroz o algodón)
 - Liofilizado
- Efecto de fungicidas en la respuesta a la inoculación

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

Sistemas de labranza; monocultivo vs. cultivos asociados

Los sistemas de labranza y de siembra probablemente afectan la disponibilidad y la tasa de mineralización del nitrógeno y, por lo tanto, las respuestas a la inoculación observadas.

Se sugiere realizar ensayos con cepas que hayan demostrado ser efectivas en condiciones de mínima disponibilidad de nitrógeno mineral, utilizadas en las Etapas I y II. En estos ensayos se comparan los diferentes sistemas de siembra utilizados por los agricultores de la región. Los sistemas de siembra se establecen en las parcelas, y los tratamientos con y sin inoculación, en las subparcelas. Sylvester-Bradley y Mosquera (1985) describen un ensayo de este tipo, que muestra que la respuesta a la inoculación fue mayor cuando se utilizó la labranza mínima para el establecimiento de las leguminosas.

Niveles de fertilidad

La investigación ha demostrado que los niveles de fertilidad de los suelos tropicales, especialmente de fósforo y molibdeno, como también los niveles de pH, afectan la fijación de nitrógeno por las leguminosas. Los niveles de fertilización que aplican los agricultores muchas veces son bajos. Por ello, es importante conocer también la interacción entre la respuesta a la inoculación y los niveles de fertilización comunmente usados por los agricultores.

En este tipo de ensayo, las diferentes condiciones de manejo se establecen en las parcelas principales, y los tratamientos con y sin inoculación en las subparcelas.

Para detectar los factores nutricionales que limitan específicamente la fijación de nitrógeno, se pueden comparar los efectos de varios niveles del factor en estudio, en plantas que crecen con baja disponibilidad de nitrógeno e inoculadas, y plantas fertilizadas con N (sin inocular y alto N) (Figura 24). Aunque no se hacen determinaciones cuantitativas del nitrógeno fijado, se obtienen valores relativos muy útiles para evaluar la simbiosis.

Selecciones posteriores y liberación de los materiales

En las selecciones posteriores a las evaluaciones de la simbiosis leguminosa-rizobio, si es necesario, se inoculan las leguminosas con las cepas de rizobios más adaptadas a la región. Es importante especificar las prácticas de manejo que no limiten la efectividad de la simbiosis con base en los resultados de la Etapa III (evaluación del manejo agronómico).

Cuando en una región ya se hayan seleccionado y comercializado leguminosas sin tener en cuenta la simbiosis, se recomienda realizar por lo menos un

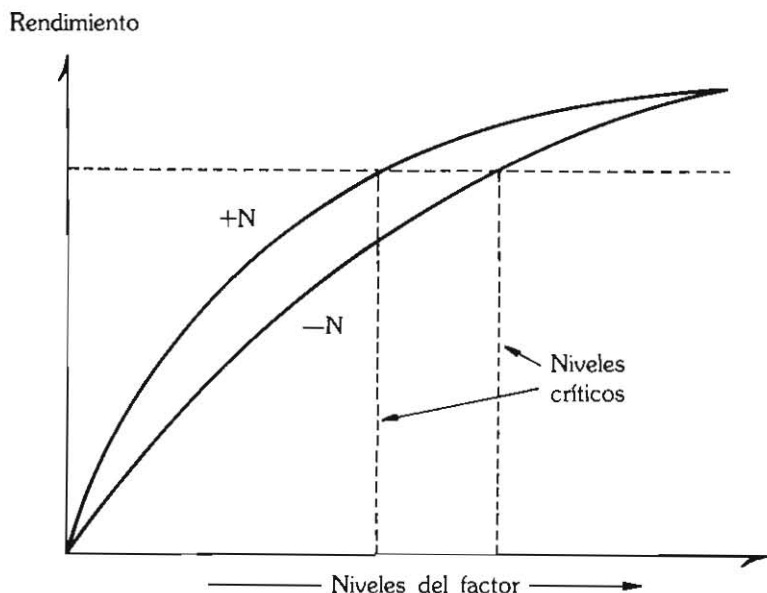


FIGURA 24. Efecto de un factor nutricional en la fijación de nitrógeno.

ensayo del tipo “necesidad de seleccionar cepas”, en suelos representativos, para determinar si la inoculación podría contribuir a aumentar el rendimiento de la leguminosa seleccionada.

De la misma manera, si en la región no existe un mecanismo de producción comercial de inoculantes, esta etapa debe incluir los pasos necesarios para mejorar la disponibilidad de inoculantes para los agricultores.

Montaje y manejo de los ensayos

Con el fin de establecer los tratamientos necesarios para realizar las evaluaciones agronómicas de la fijación de nitrógeno, y para tomar los datos requeridos, se necesita de ciertas técnicas y precauciones especiales. Aquí se presentan ejemplos de montaje y manejo de ensayos diseñados para evaluar la simbiosis en frijol y leguminosas forrajeras tropicales.

Selección del sitio

Se deben escoger suelos representativos de la variabilidad existente en la región (arenosos, arcillosos, erosionados, aluviales, etc.).

Invernadero vs. campo

Los ensayos se pueden establecer en el invernadero o en el campo; la elección depende del número de leguminosas por evaluar, el número de sitios, los tratamientos en estudio y la disponibilidad de invernadero. Con base en los resultados que se obtengan en el invernadero, se pueden eliminar ciertos tratamientos para reducir el volumen de trabajo de campo. No obstante, posteriormente es necesario reconfirmar los resultados en condiciones de campo con algunos tratamientos representativos.

Control de la disponibilidad de nitrógeno mineral

Para establecer los tratamientos de baja y alta disponibilidad de nitrógeno, es necesario considerar los factores que afectan la disponibilidad de nitrógeno mineral.

Factores que afectan la disponibilidad de nitrógeno mineral

La mayor parte del nitrógeno presente en la capa arable del suelo se encuentra en forma orgánica, pero la mayoría de las plantas no tienen la habilidad para absorberla, con excepción de pequeñas cantidades de aminoácidos. El nitrógeno orgánico se convierte en nitrógeno mineral mediante los procesos de mineralización. La tasa de mineralización depende de la relación C:N en el suelo; cuando esta relación es alta (generalmente se citan relaciones mayores que 20:1), da por resultado la inmovilización del nitrógeno en vez de la mineralización. La mineralización del nitrógeno también es estimulada por la labranza y por los cambios en humedad y temperatura del suelo (Bartholemew, 1965; Birch, 1964).

En suelos ácidos, la tasa de mineralización es menor que en suelos de pH neutro, debido a la reducida actividad de las bacterias nitrificantes en medio ácido, pese a que la población de éstas pueda ser apreciable. Adicionalmente, algunas gramíneas (en suelos de sabanas tropicales) inhiben a los microorga-

nismos nitrificantes, posiblemente debido a la habilidad de estas gramíneas para absorber el nitrógeno en forma amoniacal.

Métodos para disminuir o inmovilizar el nitrógeno mineral

En una evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio, se debe asegurar que los niveles de nitrógeno en el suelo sean suficientemente bajos para minimizar la absorción de nitrógeno mineral por las plantas. Hay que tener en cuenta que cuando se escoge un área que no ha sido labrada ni cultivada continuamente, se puede presentar abundante mineralización de nitrógeno al labrar el suelo.

Para asegurar un bajo nivel de nitrógeno en el suelo, puede ser necesario tomar una de las siguientes medidas: 1) Antes de establecer el ensayo, sembrar un cultivo como maíz, para que absorba un alto nivel de nitrógeno, y luego cosecharlo. 2) Sembrar las leguminosas en asociación con una gramínea o un cereal. 3) Establecer el cultivo con labranza mínima, dejando vivo el cespedón. 4) Incorporar un sustrato con alto contenido de carbono (por ejemplo, bagazo de caña, harina de yuca, aserrín o paja de arroz). Esta última práctica puede cambiar mucho las características y la microflora del suelo, por lo cual se debe tener cuidado al extrapolar los resultados.

En el invernadero también es necesario asegurar que los niveles de nitrógeno mineral sean bajos. Al remover, desecar y humedecer el suelo, se estimula la mineralización del nitrógeno, y como en los pots ocurre poca lixiviación, los niveles de nitrógeno mineral pueden ser más altos que en el campo. Este problema se puede evitar utilizando métodos similares a los recomendados para el campo. Para lograr el efecto de labranza reducida, se pueden utilizar cilindros de suelo sin perturbar (Sylvester-Bradley *et al*, 1983). Estos se obtienen introduciendo secciones de tubos de PVC en un área de pasto que no haya sido cultivada recientemente y trayéndolos al invernadero sin perturbar el suelo. En caso de que sea necesario encalar y usar suelo disturbado, se puede sembrar una gramínea en el mismo pote para que compita con la leguminosa por el nitrógeno mineral, o incorporar sustratos con alto contenido de carbono; los pots de suelo también pueden lavarse con abundante agua para lixiviar el nitrógeno.

En general, los ensayos en pots requieren tasas de fertilización de otros nutrientes más altas que en el campo, en razón de que es necesario asegurar

la corrección de probables deficiencias de otros nutrimentos causadas por la restricción de crecimiento radical y la competencia de la gramínea o por la lixiviación de otros nutrientes junto con el nitrógeno.

Precauciones para evitar contaminación

Precauciones con las semillas inoculadas y no inoculadas

Durante el proceso de inoculación, es obvia la necesidad de evitar la contaminación entre las semillas de los tratamientos inoculados y no inoculados. También es importante evitar la contaminación por hongos y otros microorganismos del ambiente que pueden interferir con los recuentos en las cajas de Petri. Para el efecto, es preferible inocular las semillas en el laboratorio u otra área relativamente limpia, antes de llevarlas al campo para efectuar la siembra. Sin embargo, si el viaje hacia el campo es largo, sería preferible hacer la inoculación a la llegada (por ejemplo, es posible hacerlo dentro del vehículo). En este caso, habría que tomar las muestras de semillas inoculadas para los recuentos en el campo, y aplicar las precauciones necesarias para que las bacterias no sufran alteraciones antes de regresar las muestras al laboratorio.

También es necesario tomar precauciones especiales para calcular correctamente las cantidades de semilla para cada parcela, tomando en cuenta el tamaño de la muestra que se remueve antes de la siembra para efectuar los recuentos (que no se realizan con las semillas no inoculadas), y que las semillas inoculadas tienen peso y volumen mayores que los de las semillas no inoculadas.

Precauciones para evitar la contaminación entre tratamientos

En el invernadero es muy útil cubrir la superficie del suelo en las macetas o cilindros con arena parafinada u otro material repelente al agua, dejando sin arena el área donde va colocado el tubo de irrigación. Así se evita que caigan los rizobios del ambiente sobre la superficie del suelo y que penetren al suelo con el agua de riego. Además, esto ayuda a mantener la humedad del suelo.

En el campo, la contaminación entre las parcelas se logra evitar al entrar en ellas con los pies cubiertos con bolsas plásticas, y al lavar y desinfectar los implementos con alcohol u otro producto cuando se pasa de un tratamiento a otro. Se deben hacer zanjas entre las parcelas y dejar calles anchas, las cuales

se pueden dejar con pasto o sembrar con otro cultivo. Aún tomando todas estas precauciones, es difícil evitar la contaminación a largo plazo.

Muestreos para evaluar nodulación y rendimiento de nitrógeno

Evaluación de la nodulación

En los ensayos realizados en invernadero (en potes o en cilindros de suelo) es relativamente fácil recuperar todos los nódulos. El método que se recomienda consiste en extraer las raíces de los cilindros o potes y colocarlas sobre un tamiz, para luego lavarlas cuidadosamente con agua corriente; luego se hace el recuento de todos los nódulos. Si el recuento no se puede hacer inmediatamente, las raíces con los nódulos se deben guardar en bolsas plásticas rotuladas, las cuales se conservan refrigeradas. También se pueden hacer estimaciones de peso fresco o seco, volumen fresco, color interno, etc.

En los ensayos de invernadero, los datos se pueden tomar con mayor precisión, incluyendo el número y, si son suficientemente grandes, peso exacto de los nódulos, para cuantificar su abundancia. En ensayos grandes en el campo, cuando hay un número alto de plantas para evaluar, se recomienda la evaluación de la nodulación con base en categorías de parámetros discontinuos, como por ejemplo, abundancia, calificada en categorías tales como abundante, regular, escasa y ausente.

Para extraer los nódulos, se cava cuidadosamente alrededor de la planta con una navaja, pala u otro instrumento adecuado, teniendo la precaución de no causar daños al sistema radical; es importante examinar bien el suelo para recuperar los nódulos que se hayan desprendido. Al extraer los nódulos, también es necesario tener en cuenta que puede haber nódulos en las raíces secundarias, a veces muy alejadas de la raíz principal. Cuando las plantas tienen un estado de crecimiento avanzado, recuperar todo el sistema radical puede ser una labor dispendiosa que requiere mucha paciencia y cuidado.

Los parámetros que se evalúan generalmente son los siguientes: número de nódulos, tamaño relativo, distribución y color interno predominante. En este último caso es necesario evaluar el color inmediatamente, ya que este sufre un rápido deterioro después de que se extraen los nódulos.

Es necesario seleccionar las épocas más adecuadas y definir los parámetros y categorías apropiadas para describir las diferencias existentes entre los tratamientos. La experiencia con cada cultivo permite desarrollar categorías y seleccionar las épocas ideales para evaluar la nodulación.

Evaluación del rendimiento de nitrógeno

Para evaluar el rendimiento de nitrógeno, se corta la planta o se cosechan los granos, y se determina el peso verde y el peso seco de una submuestra. Una vez se obtenga el porcentaje de peso seco y el rendimiento de peso fresco por unidad de área o por planta, se puede calcular el rendimiento con base en peso seco. Este valor se multiplica por la concentración de nitrógeno en el tejido (%) para obtener el valor del rendimiento de nitrógeno.

El método más común para determinar la concentración de nitrógeno en el tejido vegetal es el de micro-Kjeldhal, el cual es más conveniente porque solo utiliza 0.1 g de muestra, en tanto que el método de macro-Kjeldhal requiere de 1.0-3.0 g; ésto significa un ahorro de reactivos y de tiempo. Para este análisis, las muestras deben ser secadas, molidas y homogenizadas previamente. Las muestras se digieren en H_2SO_4 con catalizador durante una hora a $400^{\circ}C$. Luego se libera el amonio por destilación y se determina su cantidad, bien sea por titulación o colorimetría.

Para este método, es de suma importancia tomar una muestra representativa, ya que constituye uno de los eslabones más débiles del diagnóstico foliar.

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos en los ensayos agronómicos se deben analizar estadísticamente para poder evaluar su significado. Se han desarrollado métodos especiales de análisis estadístico para evaluar los ensayos que se utilizan en la evaluación agronómica de la fijación de nitrógeno. Estos métodos, ilustrados con ejemplos, se encuentran en el Manual de Métodos citado.



En esta Unidad Audiotutorial se han tratado de una manera general, los conceptos y criterios más importantes relacionados con la simbiosis leguminosa-rizobio, su evaluación y su manejo.

A quienes estén interesados en adquirir conocimientos detallados sobre los métodos específicos que se utilizan para llevar a cabo las diferentes evaluaciones tratadas en esta Guía de Estudio, se les recomienda consultar el texto "Simbiosis Leguminosa-rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo", que se puede solicitar a:

CIAT

Distribución y mercadeo

A.A. 6713

Cali - Colombia

Preguntas de estudio

1. Enuncie el objetivo general de la evaluación agronómica de la simbiosis leguminosa-
rizobio: _____

2. En la evaluación agronómica se emplean 3 tipos de tratamiento, cada uno de los cuales
permite caracterizar un aspecto de la simbiosis. Defina el aspecto caracterizado por
cada tratamiento:

1. Bajo N, sin inocular: _____

2. Bajo N, inoculado: _____

3. Fertilizado con N: _____

3. Complete el siguiente cuadro-resumen sobre la evaluación agronómica de la simbiosis:

Etapa	Objetivo de la etapa	Nombre de los ensayos	Tratamientos utilizados
I			
II			
III			

4. Enuncie cuatro métodos para disminuir el nivel de disponibilidad de N mineral:

En Invernadero: 1. _____ 2. _____

En el Campo: 3. _____ 4. _____

5. Enuncie los tres criterios que se consideran para la selección de cepas:

1. _____

2. _____

3. _____

Frente a cada uno de los enunciados que siguen a continuación, coloque una (C) si considera
cierta la afirmación o una (F) en caso contrario.

6. Las evaluaciones de la Etapa I_L deben realizarse en varios sitios representativos, ya que los rizobios nativos varían en cantidad y calidad de un sitio a otro. ()
7. El tratamiento -N, -I permite evaluar el rendimiento potencial de las leguminosas. ()
8. Los inoculantes se emplean en todas las etapas de evaluación de la simbiosis. ()
9. En los ensayos en invernadero (cilindros o pots) por lo general se requieren mayores niveles de fertilización que en el campo. ()
10. La evaluación de cepas en medio estéril puede conducir a la selección de cepas no competitivas. ()
11. Los sistemas de labranza tienen poco efecto sobre la tasa de mineralización del nitrógeno. ()
12. La inclusión de inoculantes en la selección agronómica amplía el rango de germoplasma adaptado a las condiciones locales. ()
13. Se debe recurrir al mejoramiento genético para aumentar la capacidad de la planta para nodular efectivamente con las cepas nativas. ()
14. La selección de cepas se hace más ágil si se utilizan cepas recomendadas por otras instituciones, para las leguminosas con que se está trabajando. ()
15. La arena parafinada, en los pots y cilindros se utiliza principalmente para conservar la humedad del suelo. ()
16. La tasa de mineralización del N es mayor en los suelos ácidos que en los suelos de pH neutro. ()
17. Los niveles de fósforo y molibdeno en el suelo tienen un importante efecto en la fijación de nitrógeno. ()
18. El color interno de los nódulos se puede evaluar en el laboratorio, si los nódulos han sido preservados adecuadamente. ()
19. El máximo potencial de fijación de nitrógeno de la simbiosis se expresa en condiciones de baja disponibilidad de N mineral. ()
20. La falta de respuesta a la inoculación en los ensayos de selección indica que existe una deficiencia genética de la planta que afecta su capacidad para fijar nitrógeno. ()

Respuestas a las preguntas de estudio

Capítulo 1

1. Nitrogenasa
- | Género | Reacción | T. crecimiento | Ejemplo |
|-----------------------|----------|----------------|--------------------|
| <i>Rhizobium</i> | ácida | rápida | frijol |
| <i>Bradyrhizobium</i> | alcalina | lenta | leg. forr. tropic. |
3. 1. Vida libre y multiplicación en el suelo; 2. Infección de las raíces y formación de nódulos; 3. Función de los nódulos; 4. Muerte de los nódulos y liberación de los rizobios al suelo.
4. 1. Abundancia; 2. Tamaño; 3. Color interno; 4. Distribución
5. Suministrar oxígeno a los organismos fijadores de nitrógeno (ya que se requiere mantener el O_2 libre en niveles mínimos para proteger a la enzima nitrogenasa).
6. 1. Inhibición de la actividad de la nitrogenasa; 2. Inhibición de la síntesis de nitrogenasa; 3. Inhibición de la formación de nódulos.
7. Infectividad: capacidad de una cepa de rizobios para infectar las raíces de las leguminosas y promover la formación de nódulos. Efectividad: capacidad de una cepa de rizobio para fijar nitrógeno atmosférico.
8. Debido a la alta estabilidad del triple enlace de la molécula de N_2 .
9. (C) 10. (F) 11. (F) 12. (C) 13. (F) 14. (C)
15. d 16. b 17. b 18. a 19. c 20. b

Capítulo 2

1. Disponer de variabilidad genética de rizobios para evaluar y seleccionar cepas.
2. Obtener cultivos puros de las cepas de rizobios presentes en los nódulos colectados.
3. Confirmar que los microorganismos aislados de los nódulos son en realidad rizobios.
4. Conocer la capacidad de las cepas aisladas para fijar nitrógeno.
5. Conservar la viabilidad de las células de rizobios de las cepas aisladas.
6. Introducir una alta población de rizobios efectivos y específicos al ambiente radical.
7. Permitir que los rizobios se multipliquen en el soporte (turba).

8. Medir el nivel de rizobios presentes en el inoculante con el fin de ayudar a interpretar los resultados de los ensayos agronómicos.
9. 1. Apariencia; 2. Tasa de crecimiento; 3. Producción de acidez o alcalinidad.
10. 1. Reacción de Gram; 2. Prueba de Cetolactasa; 3. **Pruebas de infectividad**
11. 1. **Liofilización**; 2. En fragmentos de porcelana; 3. Bajo aceite mineral
12. Colectar una muestra de suelo alrededor de la raíz e inocular con ella una planta que se desarrolla en un medio estéril, para inducir nodulación; luego se aíslan los rizobios de los nódulos.
13. (C) 14. (F) 15. (F) 16. (C) 17. (F) 18. (C)
19. (C) 20. (C) 21. (C) 22. (F) 23. (C) 24. (F)
25. (F)

Capítulo 3

1. Seleccionar germoplasma de leguminosas con alto potencial para fijar nitrógeno atmosférico (simbiótico).
2. 1. Efectividad de las cepas nativas; 2). Efectividad de los inoculantes; 3. Rendimiento potencial de las leguminosas.
- 3.

Etapa	Objetivo de la etapa	Tipos de ensayo	Tratamientos utilizados
I _L	- Ev. simbiosis con cepas nativas	- Necesidad de inocular	-I, +N
II	- Ev. simbiosis con uso inoculantes	- Nec. selec. cepas - Sel. de cepas	-I, I ₁ , +N -I, I ₁ , I ₂ ,...,+N
III	- Ev. efecto factores manejo	- Ev. prácticas de manejo	Niveles factores

4. En invernadero: 1. Usar cilindros con suelo no disturbado; 2. Agregar al suelo un sustrato con alto contenido de carbono. En el campo: 1. Asociar la leguminosa con una gramínea; 2. Utilizar prácticas de labranza mínima.
5. 1. Tolerancia a las condiciones locales; 2. Amplio espectro de efectividad; 3. Estabilidad genética.
6. (C) 7. (F) 8. (F) 9. (C) 10. (C) 11. (F)
12. (C) 13. (C) 14. (C) 15. (F) 16. (F) 17. (C)
18. (F) 19. (C) 20. (F)

Bibliografía y lecturas complementarias

- APPLEBY, C.A. (1974). Leghemoglobin. In: Quispel, A. (ed.) The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Co, American Elsevier. pp. 521-554.
- BARTHOLOMEW, W.V. (1965). Mineralization and immobilization of nitrogen in the decomposition of plant and animal residues. Chapter 7 In: Soil Nitrogen. Bartholemew, W.V. and Clark, F.E. (eds.), American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- BERGERSEN, F.J. (Ed.) (1980). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley and sons. Chichester, N. York, Brisbane, Toronto. 702p.
- BIRCH, H.F. (1964). Mineralization of plant nitrogen following alternate wet and dry conditions. Plant and Soil. 20: 43-49.
- BROMFIELD, E.S.P. (1984). The preference for strains of *Rhizobium meliloti* by cultivars of *Medicago sativa* grown on agar. Can. J. Microbiol. 30: 1179-1183.
- BURNS, R.C., HARDY, R.W.F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, N. York. 189 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de 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. 178 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Informe Anual, Programa de Pastos Tropicales, Microbiología de Suelos. CIAT, Cali, Colombia. pp. 153-175.
- DATE, R.A. (1977). Inoculation of tropical forage legumes. In: Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. eds. J.M. Vincent & J. Bose. Univ. of Hawaii, NITAL Project, Univ. Hawaii. Comm. Trop. Agric. Misc. Publ. 145: 293-311.
- HAYDOCK, K.P., NORRIS, D.O. and t'MANNETJE, L. (1980). The relation between nitrogen percent and dry weight of inoculated legumes. Plant and Soil, 57: 353-362.
- IFDC/UNIDO (International Fertilizer Development Center and United Nations Industrial Development Organization). 1979. Fertilizer Manual IFDC. Reference Manual R-1. International Fertilizer Development Center, Muscle Shoals, Al., U.S.A.

- JORDAN, D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae. Conn. 1938, 321AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Ed. by N.R. Krieg and J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.
- KEYSER, H.H. and CREGAN, P.B. (1984). Interactions of selected *Glycine soja* Sieb. & Zucc. Genotypes with fast and slow-growing soybean Rhizobia. Crop Sci. 24: 1059-1062.
- MINCHIN, F.R., WITTY, J.F., SHEEHY, J.E., and MULLER, M. (1983). A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot. 34: 641-649.
- MYTTON, L.R. (1984). Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. Plant and Soil, 82: 329-335.
- NiTAL (1984). The Rhizobium germplasm resource at NiTAL. Catalogue of Strains.
- QUISPEL, A. (ed.) (1974). The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Co., American Elsevier. 769p.
- PURSEGLOVE, J.W. (1968). Tropical crops. Dicotyledons. Longman Group Ltd, London. 719p.
- SPRENT, J.I. (1979). The biology of nitrogen-fixing organisms. McGraw-Hill Book Company Ltd. (UK). 196p.
- SYLVESTER-BRADLEY, R., AYARZA, M.A., MENDEZ, J.E., and 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.
- WITTY, J.F. (1983). Estimating N₂-fixation in the field using 15N-labelled fertilizer: some problems and solutions. Soil Biol. Biochem. 15: 631-639.