

IST
SPB
208
A1
B6



Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Rizobios para Leguminosas Forrajeras en Suelos Acidos de América Tropical:

Guía Metodológica



10 SET. 1985
59738

Sección de Microbiología de Suelos
Programa de Pastos Tropicales, CIAT
A.A. 6713, Cali, Colombia

Compilado por:
Rosemary Sylvester Bradley,
Fabiola Campuzano de Ramírez,
Arelis García Ortiz.



3845

Agosto, 1985

CONTENIDO

CAPITULO		No. de Página
1	Introducción	1-1
2	Recolección de nódulos para posterior aislamiento de rizobios	2-1
3	Aislamiento de los rizobios de los nódulos; medio BYMA	3-1
4	Reconstitución de cepas de Bradyrhizobium (rizobios de crecimiento lento) a partir de ampollas (cultivos liofilizados)	4-1
5	Caracterización de colonias de rizobios de crecimiento lento	5-1
6	Pruebas de pureza para cepas de rizobios	6-1
7	Serología para distinguir entre cepas	7-1
8	Preparación de tubos con Siratro para pruebas de nodulación; medio Norris	8-1
9	Recuento de rizobios por el método de número más probable (NMP)	9-1
10	Recuento en cajas de Petri de células viables de rizobios en inoculantes y semillas peletizadas	10-1
11	Sistema para evaluación de cepas de rizobios en Jarras de Leonard	11-1
12	Preparación de pequeñas cantidades de inoculante a partir de cultivos puros de rizobios en medio BYMA	12-1
13	Sistema para evaluación de cepas de rizobios en cilindros de suelo no perturbado	13-1
14	Instrucciones para la inoculación de semillas de leguminosas forrajeras tropicales con rizobios	14-1
15	Método para evaluación de nodulación de leguminosas forrajeras en praderas	15-1
16	Reducción de Acetileno	16-1
17	Prototipo de ensayo de inoculación de leguminosas forrajeras en el campo	17-1
18	Cámara estéril según diseño de NifTAL	18-1

1. INTRODUCCION

El propósito de esta guía es el de resumir los métodos disponibles para estudios en rizobiología aplicada a la agricultura tropical. Por eso se dá mas énfasis a estudios aplicados, y no pretendemos cubrir todos los métodos disponibles para estudios sobre rizobios. Existen varios libros sobre metodología para estudios de fijación de N_2 (Bergersen, 1980; Vincent, 1975; IAEA, 1983) para los que requieren información más detallada.

No está incluido ningún método para la evaluación cuantitativa de fijación de N_2 , porque hay mucha discusión todavía sobre la válidez de los métodos existentes. Aquí consideramos los métodos más prácticos para el manejo de rizobios para estudios sobre respuestas a inoculación que no requieren que se midan las cantidades de N_2 fijado, si no la evaluación de los aumentos en rendimiento causados por la inoculación.

Los métodos descritos aquí fueron desarrollados para estudios con leguminosas forrajeras tropicales, que en su gran mayoría nodulan con rizobios de crecimiento lento (Bradyrhizobium spp. según la nueva clasificación de Jordan, 1984). Estudios con rizobios de crecimiento rápido (Rhizobium spp.) requieren algunas adaptaciones de estos métodos.

Referencias

- Bergersen, F.J. 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley.
- IAEA. 1983. A guide to the use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition: calculations and interpretation of data. IAEA-TECDOC-288.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de Rizobiología. Edit. Hemisferio Sur, Pasteur 743, Buenos Aires, Argentina.
- Jordan, D.C. (1984). In Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. N.R. Krieg & J.G. Holl (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore. p 234-254.

2. RECOLECCION DE NODULOS PARA POSTERIOR AISLAMIENTO DE RIZOBIOS

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en forma (unos son redondos, otros son largos y otros ramificados) y en tamaño (0.5 mm - 5 cm en diámetro) pero siempre se destacan fácilmente de la raíz. El color interno de un nódulo que está vivo y activo varía de rojo claro a rojo oscuro. La estructura es firme, y los tejidos liberan una savia roja cuando se abre el nódulo.

Un nódulo muerto es más esponjoso y su color interno es negro u oscuro. Los nódulos vivos pero inactivos tienen un color interno verde, blanco o rojo. Los nódulos rojos o rosados no siempre son activos, pero tienen más probabilidad de serlo.

Para la recolección de nódulos, que luego se utilizarán en aislamiento de los rizobios, se debe escoger una planta vigorosa con hojas verdes y sanas, y siempre identificar la planta con nombre científico, o recolectar muestras de hojas, flores y semillas para que pueda ser identificada posteriormente. La fecha de la recolección se debe sincronizar, si es posible, con la estación de crecimiento vegetativo de las plantas y con la humedad adecuada del suelo, cuando los nódulos son más abundantes y activos.

Sin embargo, muchas veces es más conveniente aprovecharse de una excursión de recolección de semillas de plantas leguminosas, que generalmente se hace en la época seca. En el caso de falta de nódulos en las raíces de las plantas, en época seca, se puede recolectar una pequeña cantidad (5g) del suelo alrededor de las raíces, y posteriormente inocular una planta crecida en una matera que contenga arena y solución nutritiva con este suelo, para que se formen nódulos con rizobios procedentes del sitio de origen de la planta.

La localización de los nódulos en el sistema radical depende la especie de planta. En algunas especies los nódulos son muy profundos o están solamente localizados en las raíces laterales y muy alejados de la raíz principal. Generalmente es más fácil encontrar nódulos en plantas

jóvenes de 2-3 meses de edad. Sin embargo en la mayoría de las especies de uso agronómico se pueden conseguir nódulos fácilmente cavándose cuidadosamente alrededor de la raíz principal con una navaja o implemento similar. No se debe arrancar la planta porque es muy probable que así la ligación frágil de los nódulos con la raíz se romperá y se dejarán la mayoría de los nódulos en el suelo.

Se debe escoger aproximadamente 20 nódulos vivos e intactos de la planta y colocarlos enteros en un frasco o tubo de vidrio, conteniendo cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) o silica gel seco, como aparece en la figura.

Siempre es mejor dejar una raicita fija en el nódulo para facilitar su manejo durante el aislamiento de los rizobios. Luego después de colocar los nódulos en el frasco de vidrio se deben tapar para que empiece el proceso de desecamiento. Entre más rápido se sequen los nódulos mejor. Si aparece agua de condensación dentro del frasco se deben cambiar los nódulos a otro frasco. Si la muestra de nódulos es grande lo mejor es dividirla entre varios frascos. Los nódulos dentro de los frascos se mantienen viables más tiempo bajo refrigeración.

Después de la recolección de los nódulos se pueden mandar al laboratorio de Microbiología de Suelos del CIAT, o a otro laboratorio que tenga condiciones necesarias para aislamiento de bacterias. Para mandar nódulos por correo, de otro país al CIAT se debe anexar un certificado fitosanitario en el paquete, que se puede conseguir, previamente solicitándolo al CIAT.

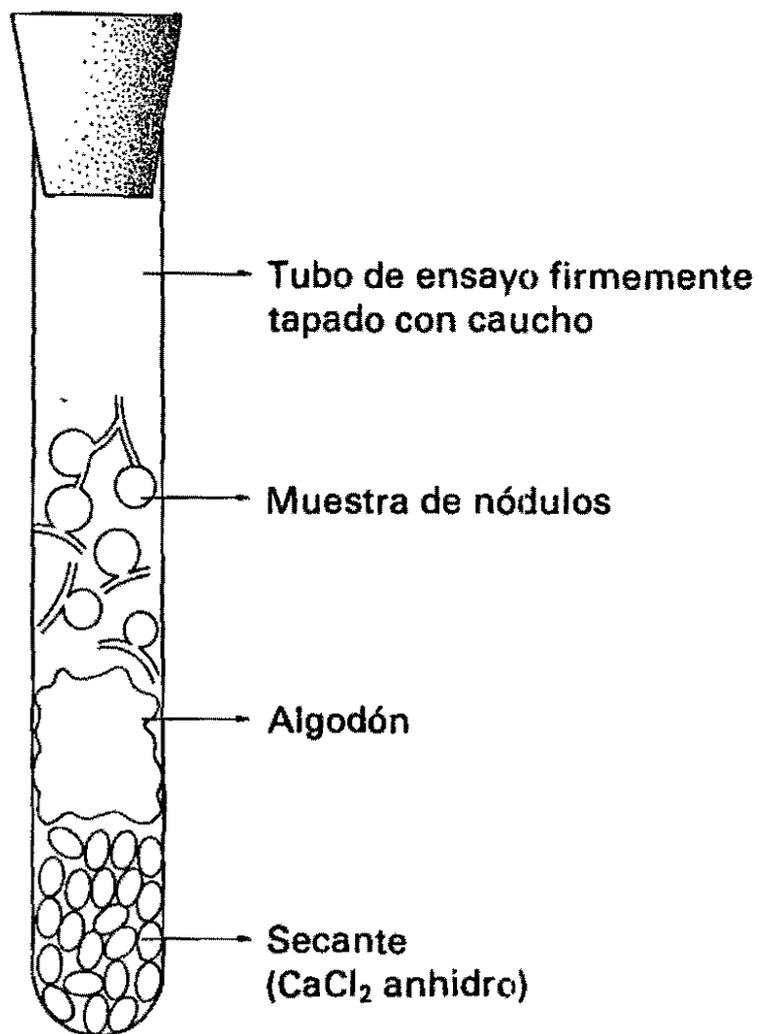
Datos necesarios para la historia de los nódulos enviados a CIAT para aislamiento

Es muy importante enviar el máximo posible de información sobre los nódulos. Se solicita adaptar la siguiente información, según el caso específico.

1. Fecha de recolección de los nódulos.

2. Planta hospedera (si disponen de semilla para ensayos posteriores. Si es económicamente importante).
3. Procedencia (país, departamento, ciudad, pueblo, hacienda).
4. Clima (lluvia, temperatura, tiempo y meses de estaciones).
5. Colector.
6. Características de la planta (tamaño y color con relación a otras de la misma especie, si es una planta aislada o varias en grupo/pradera).
7. Características del nódulo (tamaño, forma, superficie, color).
8. Nodulación abundante, regular, esparcida.
9. Plantas inoculadas (con que cepa?).
10. Plantas no inoculadas.
11. Características de la vegetación (pradera, sabana con arbustos, sabanas con árboles, sabana inundable, potrero, lado de la carretera, disturbado, natural, experimento (especificar), selva, plantación, selva desmontada y resembrada, etc.
12. Características del suelo (humedad, pH estimado o medido (especificar) fertilización, arcilloso, arenoso, fertilidad natural alta, media, baja, etc.).

Preservación de Nódulos para Posterior Aislamiento de Rizobios

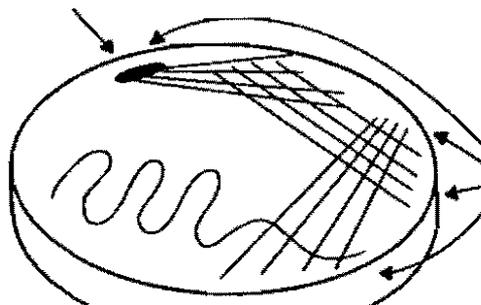


3. AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS DE LOS NODULOS

1. Si los nódulos son recogidos en el campo, es mejor dejarlos en tubos que contengan gel-silica y CaCl_2 .
2. Antes de esterilizar los nódulos superficialmente deben dejarse una o dos horas en agua estéril para que absorban el agua y suelten la suciedad. Sumergirlos en alcohol puro durante un minuto aproximadamente.
3. Cambiar los nódulos a una solución 0.1% HgCl_2 (HgCl_2 1 gramo; conc. HCl 5 ml, agua un litro) dejándolos 3-4 minutos, con algunas agitaciones. Alternativamente puede usarse una solución 3-5% H_2O_2 . Nódulos muy pequeños necesitan de menos tiempo.
4. Lavar los nódulos cinco veces con agua estéril.
5. Abrir un nódulo en una gota de agua estéril en cajas de petri que contengan medio de cultivo BYMA con pH 5.5 y 6.8 y estriar con una asa de platino.*
6. Guardar los platos 3-15 días a 28°C.
7. Volver a subcultivar para purificar la cepa, escogiendo las colonias más típicas de rizobios (pueden demorarse a aparecer mucho más que los contaminantes).

*

Nódulo
ó inóculo



Esterilizar el asa en la llama entre las 4 direcciones de las estrías.

Medio de cultivo BYMA

10g manitol

100ml agua de levadura**

0.5g K_2HPO_4

0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.2g NaCl

0.01g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

0.2g $CaCl_2$

15g Difco Bacto agar (para medio líquido no se incluye el agar (BYMB))

5ml solución de indicador de pH***

Completar a 1000ml con agua destilada, autoclavar y corregir el pH a 6.8 con NaOH (0.5 N) estéril, o acidificar con HCl 0.5 N para pH 5.5 ó 4.5.

** Mezclar 600g de levadura (Fleischmann) con 5400ml agua y hervir 1 hora en el autoclave sin presión. Dejar enfriar y centrifugar. Envasar cantidades de 100ml del sobrenadante y guardarlos sin esterilización en el congelador.

*** 0.5% azul de bromotimol en 0.016 NaOH (pH 6.8)

0.5% purpúrea de bromocresol en 0.016N NaOH (pH 5.5)

0.3% verde bromocresol en 0.016N NaOH (pH 4.5)

4. RECONSTITUCION DE CEPAS DE BRADYRHIZOBIUM (RIZOBIOS DE CRECIMIENTO LENTO) A PARTIR DE AMPOLLAS (Cultivos liofilizados)

1. Romper la ampolla con ayuda de una lima y flamear la boca del tubo con el mechero.
2. Con una pipeta Pasteur, agregar a la ampolla aproximadamente 3 gotas de solución salina (al 0.85%) estéril, tratar de bañar las paredes del tubo con la solución para recuperar todas las células que estén en la ampolla.
3. Con la pipeta Pasteur extraer la solución de la ampolla y colocar una gota en una caja de Petri que contiene medio BYMA. La cepa debe sembrarse en dos cajas de Petri, una con BYMA a 6.8 y otra con BYMA a pH 5.5*.
4. Sembrar con estriás con una asa de platino.
5. Incubar a 28°C. Transcurridos 6 ó 10 días debe haber buen crecimiento. Sin embargo, hay cepas que tardan 15 días y más en crecer.
6. Una vez que se observa buen crecimiento de la cepa, se recomienda sembrarla en tubos de ensayo con tapas de rosca conteniendo BYMA con rojo Congo**. Esto como medida de precaución para conservarla. De esta forma puede guardarse por 2 ó 3 meses en la nevera. El tubo debe tener la tapa bien cerrada para evitar desecamiento del agar.

* Las cepas se siembran en pH 5.5 porque la colección de cepas de leguminosas forrajeras son aisladas de suelos ácidos y crecen muy bien en pH 5.5. Sin embargo, se recomienda sembrarlas también en pH casi neutro (pH 6.8)

** 10ml solución acuosa de rojo Congo/litro de medio (se prepara disolviendo 1g/400ml de H₂O).

5. CARACTERIZACION DE COLONIAS DE RIZOBIOS DE CRECIMIENTO LENTO (categorización de colonias en cajas de petri sembradas por estrias con BYMA pH 5.5 e incubadas 7-15 días en 28° C; solo para productores de alcalinidad).

Descripción del crecimiento

Categoría	pH 5.5	pH 6.8
V	Crecimiento muy lento colonias pequeñas "secas" opacas y elásticas ó cremosas en pH 5.5	Poco o ningún crecimiento en pH 6.8
W	Colonias pequeñas, "secas", opacas, elásticas o cremosas en ambos pHs.	
X	Colonias elevadas de tamaño medio (4-5mm diámetro), y gelatinosas o elásticas en ambos pHs.	
Y	Colonias "acuosas", aplanadas con producción de goma líquida en ambos pHs, aunque muchas veces se produce más goma en pH 5.5 que 6.8.	
Z	Colonias "acuosas" aplanadas con producción de goma líquida en pH 5.5	Colonias pequeñas opacas y cremosas "secas" en pH 6.8

Obs. Es frecuente que en cultivos de los tipos X, Y y Z aparezcan 2 tipos de colonia en uno o ambos pHs. Con estos cultivos es necesario tener especial cuidado para eliminar la posibilidad que los 2 tipos de colonia sean contaminantes, resemebrándolos varias veces. Los rizobios son notorios por la inestabilidad de las colonias y puede ser difícil obtener cultivos estables que contengan solamente 1 tipo de colonia. Sin embargo, esta inestabilidad en las colonias no necesariamente afecta la eficiencia en fijación de N₂. Se pueden usar cultivos con colonias inestables para ensayos de inoculación, si ya se sabe que esto es una característica del mismo cultivo, y que no se debe a la presencia de contaminantes o mutantes estables.

6. PRUEBAS DE PUREZA PARA CEPAS DE RIZOBIOS

1. Examinación microscópica

Por coloración gram o contraste de fase para eliminar cultivos con morfología diferente a rizobios (esporas, coccus o gram positivo)

2. pH

Un pH final de < 6 u > 8 del medio líquido indica la presencia de contaminantes

3. Medio Peptona-Glucosa

Los rizobios no crecen bien en este medio, entonces si se nota un crecimiento marcado con cambio de pH, se debe a la presencia de un contaminante. Los contaminantes a veces no crecen bien en medio levadura-manitol, y puede equivocarse pensando que el cultivo está puro si solamente se usa este medio.

<u>Medio</u>	glucosa	5g
	peptona	10g
	agar	15g
	agua destilada	1000ml
	púrpura de bromocresol	10ml
	(1.0% en etanol)	
	pH final = 6.7	

4. Reaislamiento a partir de nódulos

Una cepa que se demuestre difícil de purificar por el método de estrias puede purificarse de nódulos en una planta estéril inoculada con una suspensión de la cepa. Los nódulos se deben esterilizar en la superficie. Puede ser necesario hacer aislamientos de varios nódulos para obtener la cepa purificada.

5. Serología

Se puede confirmar la presencia de una cepa en un cultivo usando serología. Sin embargo esto no garantiza la ausencia de contaminantes.

7. SEROLOGIA PARA DISTINGUIR ENTRE CEPAS

Una manera de identificar cepas de rizobios es por serología. Existen diferentes métodos de serología que varían en su especificidad. El método de inmunodifusión no es muy específico, es decir se distinguen entre grupos de cepas, pero dentro de grupos puede existir variabilidad que no se detecta por este método. Sin embargo, este método es el más sencillo disponible, y requiere pocos equipos, y se puede usar para identificar con seguridad cepas que son diferentes una de la otra. En trabajos de selección de cepas es necesario tener certeza que las cepas seleccionadas para ensayos de campo son diferentes. Antisueros de cepas identificadas como efectivas pero serológicamente desconocidas pueden ser preparados en los laboratorios de NIFTAL ó CIAT. Esto facilitará la selección de cepas para cada leguminosa que son serológicamente diferentes, y que se pueden comparar bajo condiciones de campo.

Procedimiento

Se prepara agar a 0.75% con 0.85% de solución salina y una vez derretido el agar se añade azida sódica a 0.025% para evitar el crecimiento de contaminantes. Se distribuye en cajas de Petri con una profundidad de 4mm de agar y se deja solidificar. Se forman pequeñas cavidades en una distribución hexagonal, y una cavidad en el centro (se puede usar el equipo de Gelman apropiado para esto o un sacabocado pequeño de 2 a 5mm). La cavidad central se llena de antisuero, y las cavidades externas con las células a ser probadas (los antígenos). Dos cavidades externas deben contener antígenos de la misma cepa que se está probando como antisuero. Estas dos cavidades "testigos" deben estar en lados opuestos del hexágono.

Preparación de antígenos

A partir de un cultivo de una caja de Petri suspendido en 10ml de solución salina, se centrifuga y suspende en 1-5ml de solución salina, dependiendo de la cantidad de crecimiento de cada cepa. Se colocan los tubos al baño María por 30 minutos a 100°C, y se llenan las cavidades de

las cajas descritas arriba con los antígenos respectivos.

Lectura

Las cepas que son serológicamente iguales al antisuero forman zonas de precipitación continuas con las zonas formadas por los dos testigos. El tiempo necesario para la formación de las bandas depende del tamaño de las cavidades, la humedad y temperatura del aire y también de la reacción específica As-Ag. Además, si se deja pasar mucho tiempo las bandas pueden perder su nitidez. Entonces se recomienda que a partir de las 24h hacer lecturas diarias, para definir los tiempos apropiados según las condiciones ambientales del local.

8. PREPARACION DE TUBOS CON SIRATRO* PARA PRUEBAS DE NODULACION

Se usan tubos con plántulas de "Siratro" estériles para pruebas de autenticación de rizobios de crecimiento lento, y para recuentos. Para otros grupos de rizobios de crecimiento rápido (v.g. trébol, fríjol, etc.) es necesario escoger la planta hospedera mas apropiada. Preferiblemente debe tener semillas pequeñas para asegurar el buen desarrollo de las plantas en los tubos.

I. ESTERILIZACION DE LA SEMILLA

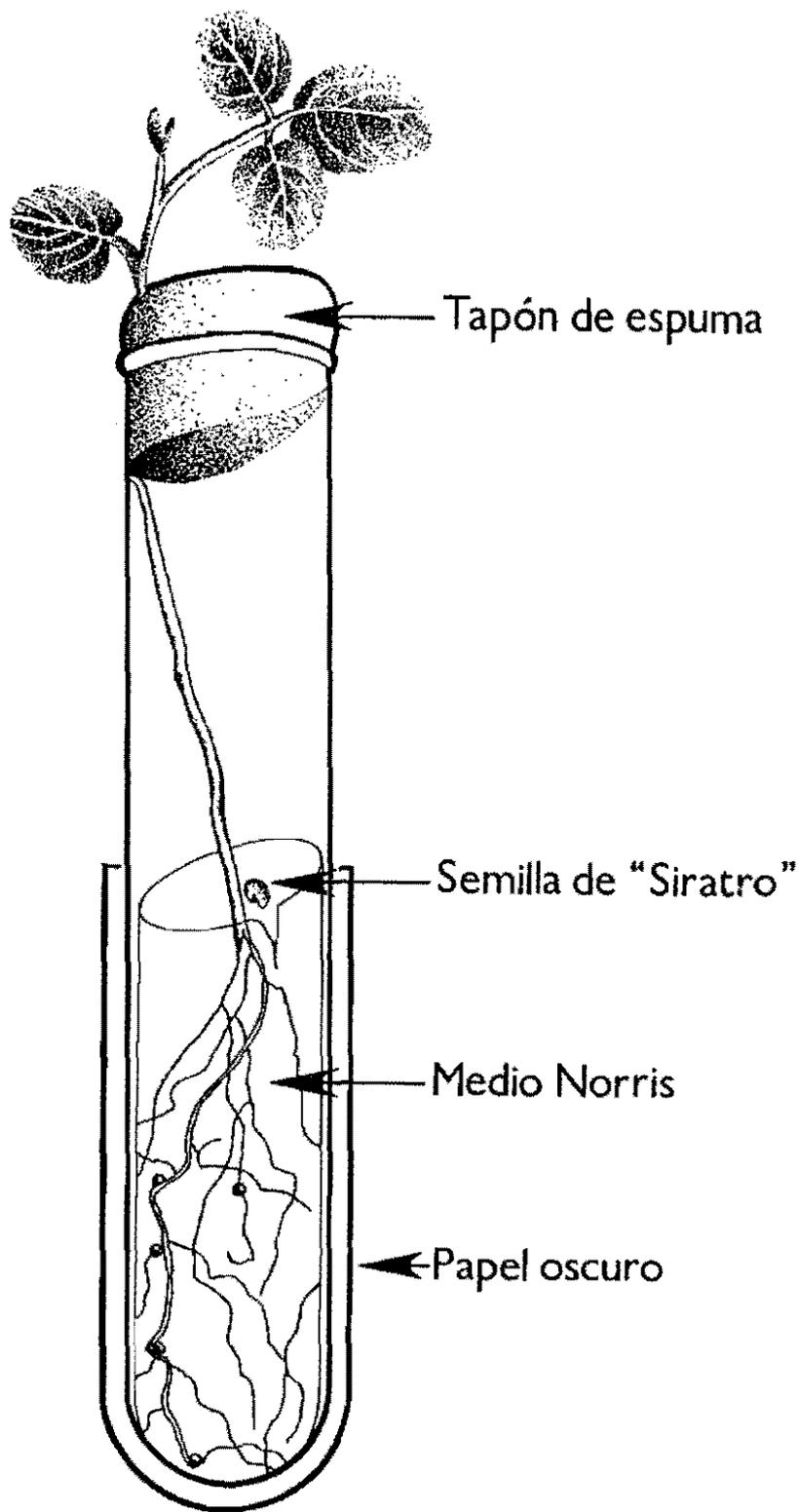
1. Poner las semillas en un tubo o en un frasco adecuado (no olvidar que las semillas van a embeber y a crecer después de ser esterilizadas).
Corrientemente sirve un tubo de rosca.
2. Cubrir las semillas en etanol a 95%, 3 minutos agitando el tubo durante este tiempo.
3. Después de vaciar el etanol llenar de nuevo con HgCl_2 acidificado. Dejar 3 minutos.
4. Lavar 5-6 veces con agua estéril.
5. Hacer un corte pequeño en la testa de cada semilla con un bisturí esterilizado.
6. Asépticamente transpasar las semillas hasta un plato de Petri que contiene dos láminas de papel de filtro todo estéril o papa dextrosa agar (PDA).
7. Dejar las semillas 24-48 horas para que germinen.

* La semilla debe ser recién cosechada y de buena calidad.

II. SIEMBRA E INOCULACION

1. Transplantar una semilla por tubo de medio Norris y dejar crecer 5-7 días para luego inocular con 1ml de suspensión del cultivo a ser probado, permitiendo que la parte aérea salga por un lado del tapón.
2. Cubrir la parte inferior del tubo con papel para evitar contacto directo de la luz con las raíces.
3. Dejar crecer 4 semanas en una cámara con luces** y temperatura de 25-30°C. Si en el transcurso de este tiempo hay deshidratización del medio, regar en el mismo medio pero sin agar y diluido 1:4.
4. Se deben incluir testigos sin inocular y con 0.75g KNO_3 /l
5. Evaluar la nodulación.

** puede ser luz del día suplementada con lámparas fluorescentes e incandescentes.



Medio de Norris (Ref. Norris & Date, 1976)

	Stock (g/l)	ml Stock/l de medio
1. KCl	29.8	2.5
2. K_2HPO_4	4.35	2.5
3. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	98.6	2.5
4. Micronutrientes:		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.078	} 0.5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.03	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.01	
H_3BO_3	1.43	
5. Citrato férrico	1.795	1.0
6. Disuelva y adicione	0.068 g/l de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	
7. Completar a 1000ml con agua destilada		

Para tubos de ensayo:

8. Adicionar 10g de agar/l de medio para medio neutro (pH 6.8).
9. Adicionar 20g de agar/l de medio para medio ácido (pH 4.5).
10. Distribuir en tubos de ensayo con tapas de espuma y autoclavar.
11. Dejar solidificar en posición vertical o inclinado.

Para Jarras de Leonard :

12. Distribuir el medio en las jarras, mezclando bien para mantener el $CaSO_4$ en suspensión.
13. Esterilizar la jarra.
14. Regar con la misma solución diluída 1:4.
15. Preparar testigos con N utilizando 0.75g/l KNO_3 .

Referencias:

- Norris, D.O. and Date, R.A. 1976. Legume Bacteriology In Tropical Pasture Research Principles and Methods. C.A.B. Bull. 51, Comm. Bureau of Pastures and Field Crops, 134-174.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de Rizobiología, Edit. Hemisferio Sur, Pasteur 743, Buenos Aires, Argentina.

9. RECUESTO DE RIZOBIOS POR EL METODO DE NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

La infección y formación de nódulos en las raíces de una leguminosa es el único criterio confiable para distinguir entre los rizobios y otros microorganismos del suelo. Cuando la muestra para un recuento contiene varios tipos de microorganismos (por ejemplo inoculante hecho con turba no estéril, ó suelo) es necesario contar los rizobios usando diluciones de la muestra, inoculadas en tubos conteniendo plantas estériles de una leguminosa. La leguminosa que se usa más frecuentemente para recuentos del grupo de rizobios que nodula en leguminosas forrajeras es "Siratro" (cultivar mejorado de Macroptilium atropurpureum) debido a su habilidad de nodular con un rango amplio de cepas de rizobios de crecimiento lento.

Procedimiento

Para cada recuento se inoculan 6 o mas diluciones con 4 repeticiones en cada dilución (24 tubos con "Siratro" preparados según explicación anterior). Es preferible hacer 3 repeticiones de cada recuento, es decir 3 muestras de semilla inoculada, inoculante ó suelo. Se hace una serie de diluciones para cada muestra según la explicación para "Recuento en cajas de Petri". Se inoculan 4 repeticiones de 1ml de la suspensión de cada dilución a 4 tubos con "Siratro". Si se usan 3 repeticiones de la muestra, se necesitan de 3 x 6 diluciones x 4 repeticiones = 72 tubos con Siratro, y 18 o mas (dependiendo del número de diluciones) tubos con solución salina para diluciones. Si no se cuenta con suficiente vidriaria para esto, puede emplearse solamente una muestra de cada tratamiento (24 tubos con Siratro); sin embargo, este procedimiento no toma en cuenta la variabilidad entre diferentes series de diluciones, que puede afectar los resultados. Después de 3-4 semanas de crecimiento se evalúa la nodulación, (presencia o ausencia de nódulos en cada tubo).

Ejemplo

Muestras de 100 semillas inoculadas de Pueraria phaseoloides, usando cepa 2422 y peletización con cal ó roca fosfórica. La suspensión de 100

semillas en 100ml se denominó dilución 10^2 y la primera dilución que se inoculó a las plantas fué 10^3 .

Cepa 2422 con cal

Cepa 2422 con RF

Dilución	Repetición				Dilución	Repetición			
	1	2	3	4		1	2	3	4
10^3	+	+	+	+	10^3	+	+	+	+
10^4	+	+	+	+	10^4	+	+	+	-
10^5	+	-	-	-	10^5	+	+	+	+
10^6	-	-	-	-	10^6	+	+	+	+
10^7	+	-	-	-	10^7	+	+	+	+
10^8	-	-	-	-	10^8	+	+	+	+
10^9	-	-	-	-	10^9	-	-	-	-

La Tabla de NMP (Vincent, 1975) muestra números más probables para 10, 8, 6, ó 4 diluciones (S). En nuestro ejemplo tenemos 7, entonces consideramos la dilución 10^4 como la dilución 1 para trabajar con 6 diluciones (S=6). Es importante siempre incluir una dilución en que todos los tubos están negativos, y otro donde todos están positivos.

En el tratamiento con RF uno de los tubos en dilución 10^4 no noduló, aunque en las 4 diluciones siguientes había nodulación. En este caso se considera este tubo como positivo*. Entonces en el caso de cal hay 6 tubos positivos y en el caso de RF hay 20 tubos.

Refiriéndose a la Tabla estos números de tubos positivos se convierten en los números más probables de 5,8 y 1.8×10^4 células en la primera dilución considerada (10^4) respectivamente.

* En las diluciones menores puede ocurrir mucha contaminación con otros microorganismos que a veces inhibe el crecimiento de la planta y/o la nodulación, y en diluciones mayores las plantas nodulan porque hay menos contaminantes. En estos casos se consideran los tubos como positivos.

Usando la fórmula para S=6:

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

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

d = dilución de la primera dilución considerada

v = volumen inoculado (1 ml)

n = número de semillas

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

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

Referencia:

Vincent, J.M. (1975). Manual Práctico de Rizobiología. Edit. Hemisferio Sur, Pasteur 743, Buenos Aires, Argentina.

CUADRO * Cantidad (M) de rizobios estimada según el recuento de plantas infectadas:
C. Diluciones a 1/10
(A = 10)

Tubos positivos		Etapas de la dilución (e)			
n = 4	n = 2	s = 10			
40	20	>7 × 10 ⁸			
39					
38	19	6,9			
37		3,4			
36	18	1,8			
35		1,0			
34	17	5,9 × 10 ⁷			
33		3,1	s = 8		
32	16	1,7	>7 × 10 ⁶		
31		1,0			
30	15	5,8 × 10 ⁶	6,9		
29		3,1	3,4		
28	14	1,7	1,8		
27		1,0	1,0		
26	13	5,8 × 10 ⁵	5,9 × 10 ⁵		
25		3,1	3,1	s = 6	
24	12	1,7	1,7	>7 × 10 ⁴	
23		1,0	1,0		
22	11	5,8 × 10 ⁴	5,8 × 10 ⁴	6,9	
21		3,1	3,1	3,4	
20	10	1,7	1,7	1,8	
19		1,0	1,0	1,0	
18	9	5,8 × 10 ³	5,8 × 10 ³	5,9 × 10 ³	
17		3,1	3,1	3,1	s = 4
16	8	1,7	1,7	1,7	>7 × 10 ²
15		1,0	1,0	1,0	
14	7	5,8 × 10 ²	5,8 × 10 ²	5,8 × 10 ²	6,9
13		3,1	3,1	3,1	3,4
12	6	1,7	1,7	1,7	1,8
11		1,0	1,0	1,0	1,0
10	5	5,8 × 10 ¹	5,8 × 10 ¹	5,8 × 10 ¹	5,9 × 10 ¹
9		3,1	3,1	3,1	3,1
8	4	1,7	1,7	1,7	1,7
7		1,0	1,0	1,0	1,0
6	3	5,8 × 1	5,8 × 1	5,8 × 1	5,9 × 1
5		3,1	3,1	3,1	3,1
4	2	1,7	1,7	1,7	1,7
3		1,0	1,0	1,0	1,0
2	1	0,6	0,6	0,6	0,6
1		<0,6	<0,6	<0,6	<0,6
0	0				
Amplitud aprox.		10 ⁹	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Factor, 95 % de los límites de confianza **		n = 2	3,6		
(X, ±)		n = 4	3,8		

* Calculado según el cuadro VIII, de Fisher y Yates (1963).

** Cochran; Biometrics, 1950, 6, 165.

10. RECUESTO EN CAJAS DE PETRI DE CELULAS VIABLES DE RIZOBIOS EN
INOCULANTES Y SEMILLAS PELETIZADAS

El propósito de este recuento es de asegurar que el número de células de rizobios en las semillas inoculadas en ensayos de campo, alcance un nivel adecuado para obtener una buena infección de las raíces. En el caso de falla de alguno de los tratamientos inoculados en ensayos de campo, estos datos servirán para afirmar que la falla no fué debida a un bajo número de rizobios sino a la falta de adaptación de la cepa a las condiciones locales. Por eso se deben hacer recuentos con muestras de los inoculantes a ser usados, y de las mismas semillas inoculadas que se van a sembrar en el campo. Es aconsejable obtener los inoculantes para el ensayo con bastante tiempo de anticipación para poder hacer un recuento para detectar inoculantes de mala calidad, y no usarlos en el ensayo. Solo se puede usar el método de cajas de Petri en el caso de inoculantes en base a turba estéril (es decir, muestras que prácticamente no contienen contaminantes). Si la muestra contiene contaminantes se debe usar el método de "número mas probable".

I. Recomendaciones para las diluciones

1. Asegurar una dispersión homogénea de las células empleando perlas de vidrio en las botellas y tubos de dilución, agregando dispersantes en las soluciones y agitando muy bien cada muestra antes de hacer la siguiente dilución.
2. Conservar la viabilidad de las células haciendo la serie de diluciones en un lapso de 30 minutos.
3. Tener buenas condiciones de asepsia, empleando material estéril, mecheros, alcohol y si es posible una cámara de aislamiento de flujo laminar, o construido según las instrucciones de NIFTAL.

II. Material indispensable para cada tratamiento (esto se adapta según las diluciones que se van a emplear, por ejemplo en el caso de inoculantes se usan las diluciones 10^{-6} a 10^{-10}).

Para diluciones de semillas usando 10^{-2} a 10^{-6} se necesita:

1. Tres botellas con capacidad para 100ml de solución de dilución (ver 8). Una botella adicional para la dilución de cada una de las cepas puras.
2. Doce tubos con capacidad para 9ml de solución de dilución.
3. Perlas de vidrio (5/tubo o 10/botella de dilución)
4. Doce pipetas de 1ml.
5. Un mechero.
6. Tres rastrillos (para dejar enfriar después de esterilizar con alcohol y quemar con alcohol).
7. Alcohol (1 litro).
8. 508 ml de solución de NaCl al 0.85% (solución de dilución) más Tween 40 (0.1 ml por litro de la solución de dilución) u otro dispesante esterilizado en cantidades de 99 ml o 9 ml en botellas o tubos.
9. 500 ml de medio BYMA más Congo rojo (este colorante se incluye para facilitar el reconocimiento de las colonias de rizobio que generalmente toman menos color que las de otras bacterias) esterilizado en un Erlenmeyer y repartido en 15 cajas de Petri. Una caja de Petri adicional para cada cepa pura. También se puede usar verde brillante o púrpura de bromocresol como colorantes, y agregar nistatina u otro antibiótico que inhiba el crecimiento de hongos y no afecta el crecimiento de los rizobios.
10. Cultivos puros de cada una de las cepas bajo investigación.
11. Autoclave u olla de presión
12. Cámara de aislamiento.

13. Peachímetro.
14. Destilador de agua.
15. Balanza (0.1g).

Otros materiales que facilitan el trabajo:

1. Cuenta colonias con lente de aumento de 2X - 3X
2. Contador
3. Incubadora a 28°C (a falta de esto se pueden incubar las cajas a temperaturas ambiente).
4. Centrífuga para preparación de agua de levadura
5. Jeringa para dispersar la solución salina.
6. Agitador para tubos de ensayo.

Medio "BYMA" ("Brockwell's yeast mannitol agar")

Preparación:

10g manitol

100ml agua de levadura* (puede ser sustituido por 0.4 de extrato de levadura)

0.5g K_2HPO_4

0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.2g NaCl

0.01g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

0.2g $CaCl_2$

20g Bacto agar Difco

* Mezclar 600g de levadura (Fleishmann) con 5.400ml de agua y hervir 1 hora en el autoclave sin presión. Dejar enfriar y centrifugar. Envasar cantidades de 100ml del sobrenadante y guardarlos sin esterilización en el congelador.

10ml solución acuosa de Congo rojo (se prepara disolviendo 1g/400ml de H_2O)

(1ml solución alcohólica (0.125%) de verde brillante, ó 5 ml de 0.5% púrpura de bromocresol en 0.016N de NaOH)

Completar a 1000ml con agua destilada, autoclavar y corregir el pH a 6.8 ó 5.5 con NaOH ó HCl 0.5 N estéril.

III. Procedimiento para muestras de semillas peletizadas.

Se deben marcar todos los tubos de diluciones y las cajas de Petri con la fecha, tratamiento y repetición antes de empezar, y dejarlos organizados en el orden en que se van a emplear. De las semillas peletizadas con 50g de inoculante/kg, se pesan 3 muestras de 2g de semillas peletizadas en cada tratamiento inoculado, evitando contaminación entre tratamientos (para inoculantes se usan muestras de 1g). Se echa una muestra por tratamiento (separando los bloques), cada una en una botella cerrada con 100ml de solución salina al 0.85% más 0.01% Tween 40. Se agita durante 10 minutos aproximadamente para desprender completamente el pelet de las semillas y separar las células unas de otras. Esto se considera una dilución 10^2 .

De cada dilución 10^2 , con una pipeta (1) se toma 1ml y se echa en 9ml de solución salina, quedando una dilución 1×10^3 . Se desecha la pipeta (1) y esta dilución 10^3 se mezcla muy bien utilizando una pipeta limpia (2). De la dilución 10^3 se echa con la misma pipeta (2) 0.1 ml sobre la superficie de una caja que contenga 25-30ml de medio BYMA y se distribuye muy bien utilizando un rastrillo previamente esterilizado en alcohol y flameado. Con la misma pipeta (2) se pasa 1 ml a un tubo con 9 ml de solución salina, dando una dilución 10^4 y así sucesivamente hasta la dilución 10^6 , tomando siempre 1 ml de la solución anterior con una pipeta nueva y pasando a tubos con 9 ml de solución salina y con la misma pipeta 0.1 ml a la caja de Petri (Figura 1). Todo este proceso se repite para cada muestra. Un sistema alternativo es de hacer la serie de diluciones en la misma forma, pero sin echar los 0.1 ml en la caja de Petri. Cuando ya está lista la serie de diluciones se usa una pipeta (5) para echar 0.1 ml de la última

dilución en una caja de Petri, y se puede seguir usando la misma pipeta para echar las alícuotas de 0.1 ml de las otras diluciones, siempre y cuando se siga la secuencia de la más diluida a la menos diluida. Después de terminar se cuentan las semillas en las muestras.

Es importante, especialmente si hay muchos tratamientos, separar el trabajo por repeticiones y no por tratamientos. Si se demoran 3 a 5 horas para hacer el trabajo, puede haber un efecto sobre el número de rizobios en las semillas. Entonces es necesario contar toda la repetición I primero, la II después, etc.

Para el fácil reconocimiento de las colonias de las cepas de los rizobios en los recuentos, también se recomienda hacer resiembras de una dilución 10^2 de un cultivo puro de cada una. Para esto se toma del cultivo del rizobio del tubo lo que se coja con la punta de un asa y se diluye en una botella que contenga 100ml de solución salina más Tween 40 al 0.1ml/litro. Se agita muy bien y de esta dilución 10^2 se siembra lo que se coja con la argolla del asa por el método de agotamiento (haciendo estrías) en una caja de Petri que contenga BYMA más Congo rojo. Las cajas se deben colocar en posición invertida entre 26°C y 28°C durante 6 días para cepas de crecimiento lento. Se siguen haciendo recuentos hasta 10 días. Se marcan las colonias contadas en el fondo de la caja con un marcador.

Para distinguir los rizobios de los contaminantes en las cajas (si es que los hay), se comparan las colonias del recuento con las de la caja sembrada con la dilución 10^2 de los cultivos puros. Puede haber variabilidad entre colonias de una misma cepa, especialmente las cepas 2469 y 2434, pero por comparación entre las diluciones de los cultivos puros y de las semillas inoculadas se pueden reconocer las colonias de los rizobios. Es necesario hacer los recuentos varias veces entre los 6 y 10 días porque las colonias que crecen más rápido pueden unirse a través del tiempo, dificultando el recuento si se dejan crecer mucho, mientras otras colonias demoran más para aparecer.

IV. Cálculo

Se escogen de las cajas de Petri las tres repeticiones de la dilución que tengan entre 30 y 300 colonias por caja a los 10 días (puede ser necesario mas tiempo para cepas de crecimiento muy lento). Se saca un promedio del número de colonias por caja y se multiplica por la dilución, luego se multiplica por 10 (porque únicamente se colocó 0.1ml de la dilución sobre cada una de las cajas de Petri). Esto corresponde al número de células en los 2g de semillas. Luego este número se divide por el número de semillas que había en la muestra para saber el número de células de rizobios por semilla.

Ejemplo:

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

No. de células en 2g semillas = 36×10^5

No. de semillas en 2g = 72

No. de células/semilla = $\frac{36 \times 10^5}{72} = 5 \times 10^4$

ESQUEMA DE DILUCION

Operación	No. del frasco o tubo y volumen del diluyente (ml)	Dilución obtenida
Se echan 2g de semilla peletizada	1 (botella)	100 10 ²
Usar pipeta (1) y tomar 1ml de la botella (1), pasarlo al tubo (2). Además para tomar 0.1ml de 10 ² para la caja de Petri	2 (tubo)	9 10 ³
Usar pipeta (2) y tomar 1ml del tubo(2), pasarlo al tubo (3). Además para tomar 0.1ml de 10 ³ para caja de Petri	3 (tubo)	9 10 ⁴
Usar pipeta (3) y tomar 1ml del tubo (3), pasarlo al tubo (4). Además para tomar 0.1ml de 10 ⁴ para caja de Petri	4 (tubo)	9 10 ⁵
Usar pipeta (4) y tomar 1ml del tubo (4), pasarlo al tubo (5). Además para tomar 0.1ml de 10 ⁵ para caja de Petri	5 (tubo)	9 10 ⁶

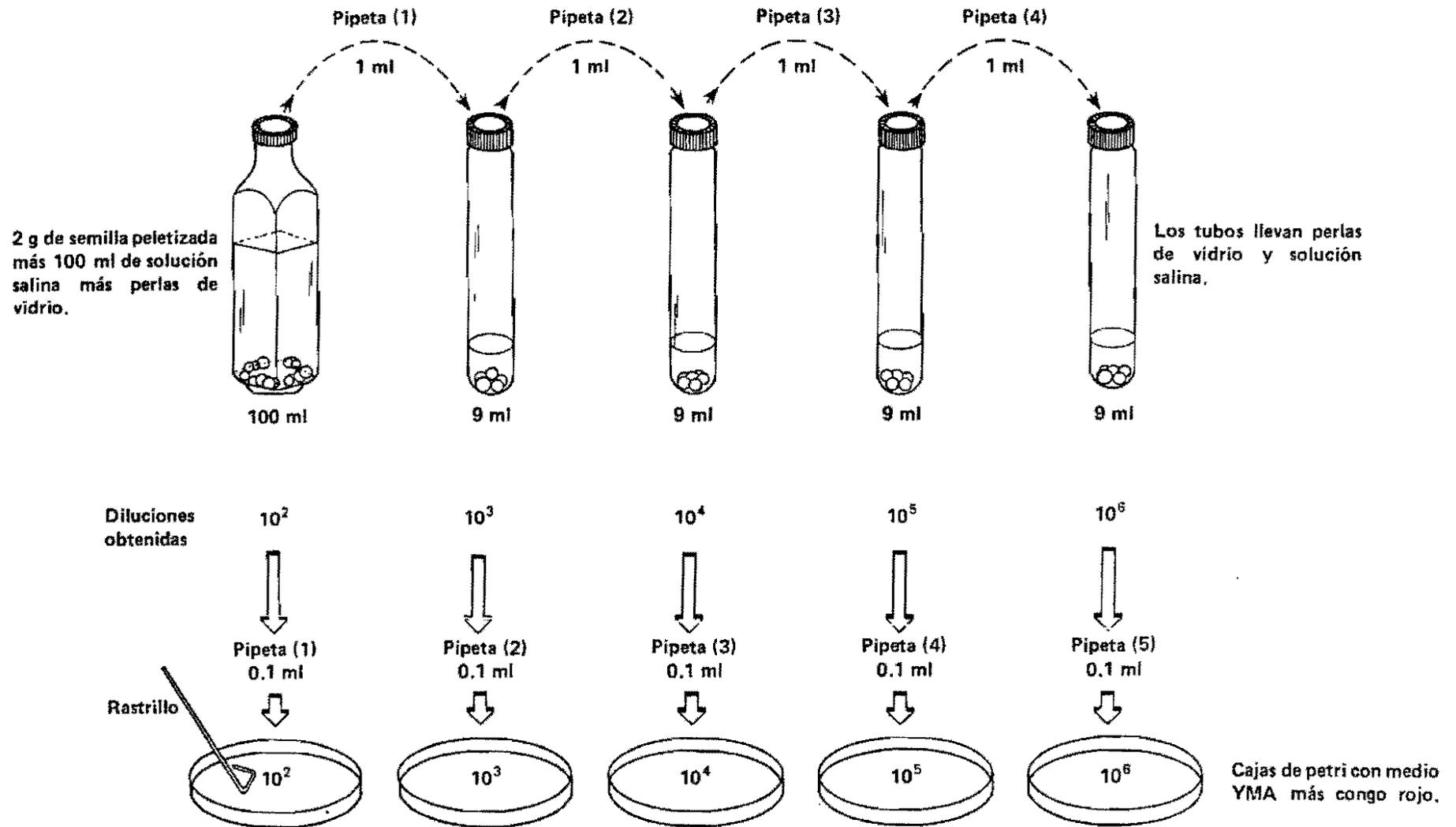


FIGURA 1. Esquema de las diluciones y la siembra en un recuento de células de rizobios en cajas de petri.

11. SISTEMA PARA EVALUACION DE CEPAS DE RIZOBIOS EN JARRAS DE LEONARD

La jarra de Leonard es uno de los dispositivos más usados por los rizobiólogos para el estudio de la eficiencia de cepas de rizobios. Aunque este dispositivo permite un buen control microbiológico, en el programa de selección de cepas para suelos ácidos del Programa de Pastos del CIAT, se usa la jarra de Leonard más para el control de calidad de una cepa, por ejemplo para saber si una cepa recomendada no ha perdido su capacidad como buena fijadora de nitrógeno y no para hacer selección de cepas. Esto se debe a la dificultad de simular las condiciones naturales en jarras de Leonard. Por ejemplo, la competitividad entre el los rizobios inoculados y los rizobios nativo no puede medirse, siendo esto uno de los aspectos más importantes en la selección de cepas, y es difícil mantener condiciones de acidez en la solución nutritiva.

a. Montaje de la jarra de Leonard

La parte superior consiste en una botella de vidrio (de licor ó cerveza) de aproximadamente 600cc de capacidad a la que se le ha quitado aproximadamente 7cm de su fondo. Esto se hace utilizando una resistencia que calienta la parte de la botella donde se quiere partirla, y luego enfriándola en agua fría.

La parte inferior es un frasco de vidrio de boca ancha con capacidad de 1000cc cuyo tamaño permite que la botella sin fondo invertida encaje en ella perfectamente.

- En el cuello de la botella invertida se coloca una mecha que permite el ascenso de la solución nutritiva (medio de Norris), hasta la parte superior de la jarra. En CIAT se han obtenido buenos resultados utilizando una mecha de algodón.
- Luego de colocar la mecha agregar a la botella invertida de 400 a 500 g de arena de cuarzo ó de río bién lavada.

- Agregar en el frasco de la parte inferior medio de Norris (ver preparación de tubos con Siratro).
- Tapar la parte superior de la botella con la tapa de una caja Petri ó papel aluminio y envolver el dispositivo con papel marrón, asegurándolo con cinta adhesiva.
- Esterilizar todo el montaje en autoclave por 2 horas.

Lavado de arena de cuarzo (ó de río)

50kg de arena

2 l. H_2SO_4 diluídos en 5 l. de agua

- Colocar la arena en un envase plástico.
- Humedecer la arena con agua.
- Agregar los 2 l. de H_2SO_4 ya diluídos y completar con agua hasta cubrir totalmente el nivel de la arena. Dejar reaccionar por 24 horas.
- Después de 24 horas colocar una manguera dentro del envase donde está la arena y dejar que el agua lo llene, o sea lavar la arena hasta que el agua salga cristalina.
- Extender la arena para secarla al aire libre.

Nota: con 50kg de arena se pueden preparar aproximadamente 100 jarras.

b. Inoculación de la semilla

- Tener montadas las jarras como se indicó en la parte a. y rotular el papel que envuelve la jarra con el nombre de la leguminosa que se vá a sembrar, el número de la cepa y la repetición correspondiente.

- Tener preparadas en medio de cultivo líquido (YMB) las diferentes cepas que se van a inocular, con aproximadamente 6 días de crecimiento, o una suspensión a partir de cajas de Petri.
- Dos días antes de la siembra escarificar y esterilizar la semilla, para ponerla a germinar en cajas de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar). Este proceso debe hacerlo más asépticamente posible para evitar contaminación. Incubar a 28°C hasta que germine la semilla. Solo sembrar las semillas que sean libres de contaminantes.
- El mismo día de la siembra humedecer la arena de las jarras con medio Norris (100ml. por cada jarra).
- Con ayuda de una espátula hacer huecos en la arena, para colocar con una pinza estéril una semilla germinada en cada hueco; dos para semillas grandes y 4 para semillas pequeñas.
- Agregar a cada semilla 0.5ml de inoculante y cubrir la semilla con la arena. Tener la precaución de trabajar con material estéril para cada cepa para evitar contaminación entre cepas.
- Tapar cada jarra con la tapa de una caja Petri. Esta tapa se quita cuando las plantas tienen 2cm de altura. Se cubre la superficie con arena parafinada estéril (ver Instrucciones para cilindros de suelo).
- Colocar las jarras al ambiente con lámparas de luz helio por 12 horas diarias , o en cuarto de crecimiento.
- Una semana después de la siembra ralea, dejando solamente la mejor planta.

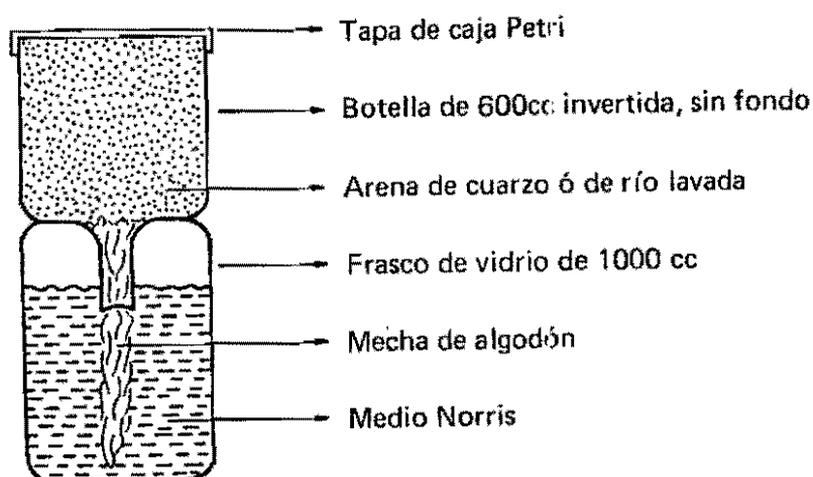
El tiempo que toman estos ensayos es de 6-8 semanas, durante los cuales se debe chequear periódicamente el nivel de la solución nutritiva de cada jarra. El riego se hace en el frasco inferior reservario con la solución

nutritiva diluída 1:4. Al final del ensayo se corta la parte aérea de cada planta y se coloca en una bolsa de papel debidamente rotulada con el número de la cepa, el nombre de la leguminosa y la repetición a la que pertenece la muestra, para posterior análisis de contenido de peso seco y nitrógeno.

Las raíces deben ser separadas con mucho cuidado de la mecha de algodón y colocadas en bolsas plásticas rotuladas, para hacer el conteo de nódulos y peso seco de toda la raíz.

El diseño experimental recomendado es el de bloques al azar con 5 repeticiones y dos controles, control sin inocular y sin N, y control con N. Para fertilización con N se emplea 0.75g/l de KNO_3 en la solución nutritiva.

Jarra de Leonard:



12. PREPARACION DE PEQUEÑAS CANTIDADES DE INOCULANTE A PARTIR DE CULTIVOS PUROS DE RIZOBIOS EN MEDIO BYMA

1. Tomar con el asa de platino varias colonias de la cepa y sembrarla con estrías en 3 cajas con medio BYMA a pH 5.5.
2. Incubar a 28°C por 6 a 10 días
3. Escoger dos cajas donde exista mayor crecimiento del rizobio para preparar el inoculante.
4. Tener preparado 20ml de medio de cultivo líquido (BYMB) esterilizado en un erlenmeyer de 50ml para cada inoculante.
5. Echar en cada caja un poco del medio líquido y con el asa despegar todo el rizobio que ha crecido.
6. Con una pipeta Pasteur homogenizar y pasar nuevamente al erlenmeyer. Tapar bién para evitar contaminación.
7. Poner a agitar para homogenizar el caldo. Este caldo debe mezclarse el mismo día con la turba.

Nota: Antes de despegar el rizobio de las cajas Petri, se recomienda hacer al cultivo un directo al microscopio, para verificar que no está contaminado.

Preparación de inoculante en turba

1. La turba* debe estar seca, molida** y tamizada con malla No. 100.

* La turba debe ser previamente escogida según su habilidad de mantener una alta población de rizobios durante 6 meses. Turba esterilizada con raios gamma es más confiable que turba no esterilizada. Si se está usando turba estéril, se inyecta el caldo directamente a la bolsa, tomando precauciones para evitar la contaminación.

** El molino debe ser graduado para producir partículas de turba no muy finas. Si la turba es demasiado fina no absorbe el líquido del caldo con rizobios.

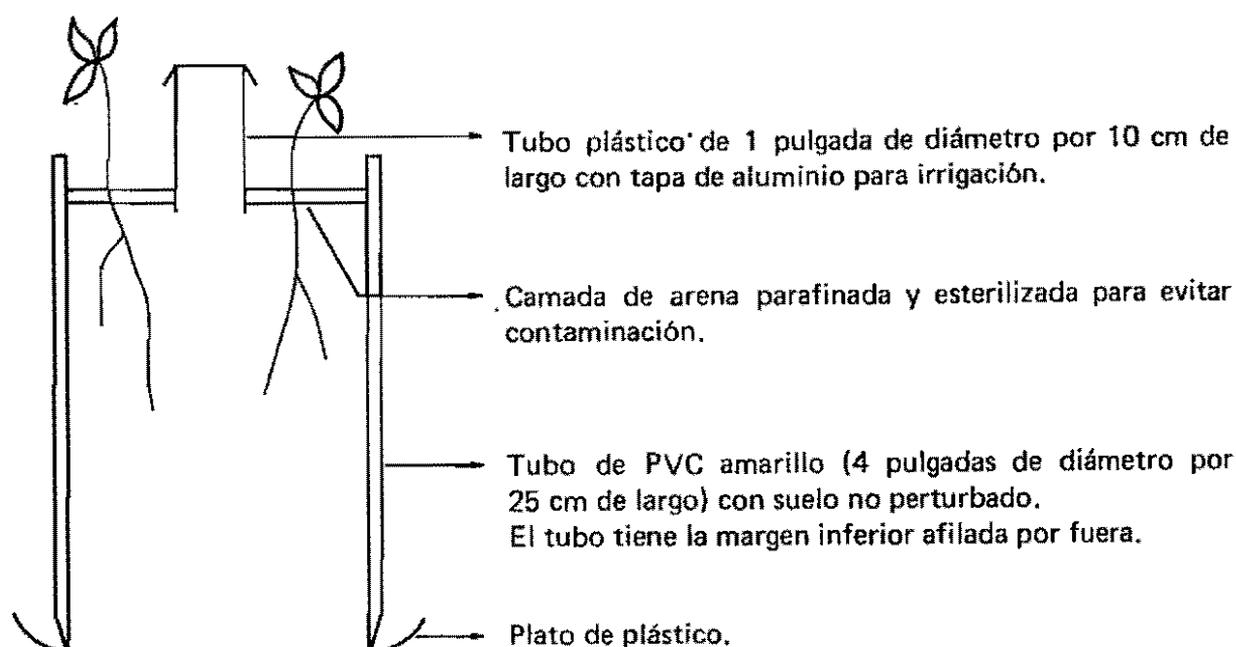
2. Hacer una mezcla al 5% de turba con CaCO_3 (ej. 95g de turba y 5g de CaCO_3). Esto porque la turba utilizada en el CIAT tiene un pH 5.5 aproximadamente y debe ajustarse a un pH neutro.
3. Mezclar el caldo con la turba en una proporción 1 a 2. Por ejemplo, 10ml de caldo mezclar con 20g de turba. Esto puede realizarse en un vaso de precipitación.
4. Dejar extendido el inoculante por 12 horas en un lugar fresco. Si es muy poca la cantidad preparada, se puede dejar menos tiempo para evitar demasiado secamiento.
5. Colocar la mezcla en una bolsa de polietileno fina, previamente rotulada con el número de la cepa, gramos de inoculante que contiene y fecha de vencimiento. En estas condiciones, el inoculante puede ser almacenado hasta por 6 meses a 4°C .

Todo este proceso puede realizarse fuera de la cámara de siembra, para evitar contaminación con rizobios de las áreas estériles del laboratorio.

Nota:

- (1) En caso de preparar varios inoculantes debe tener la precaución de trabajar con material estéril, para cada cepa de rizobios para evitar contaminación entre las mismas.
- (2) Se preparan mayores cantidades de inoculantes en la misma forma, pero usando cultivos crecidos en medio BYMB (caldo), y tomando las precauciones "Pruebas de Pureza".

13. SISTEMA PARA EVALUACION DE CEPAS DE RIZOBIOS EN CILINDROS DE SUELO
NO PERTURBADO



Se puede usar este sistema en experimentos donde se quiere comparar tratamientos con diferentes cepas de rizobios con un testigo sin inoculación y sin nitrógeno y otro testigo con nitrógeno. La ventaja de usar suelo no perturbado es que la perturbación del suelo puede causar un aumento en la tasa de mineralización resultando la liberación de nitrógeno mineral, que puede inhibir la nodulación (Sylvester-Bradley et al 1983). En el CIAT se usan estos cilindros para la preselección de

cepas de rizobios para leguminosas forrajeras, antes de probarlas en el campo.

Se introducen los cilindros por golpeo en el suelo del sitio seleccionado, protegiendo el cilindro con un pedazo de madera, y sacándolo con una pala. Se puede irrigar el suelo antes con agua limpia, en el caso de ser demasiado duro, pero cuidando de que el agua se distribuya igualmente en el área que será muestreada. Los cilindros se introducen en el suelo hasta aproximadamente 2 cm de su margen superior, dejando así espacio suficiente para la arena parafinada. Es mejor enterrar los cilindros en hileras y no pisar las áreas donde se los van a clavar. Se pueden dejar los cilindros enterrados en el sitio y sacarlos luego antes del experimento, para que se conserven bajo condiciones naturales. Antes de empezar el ensayo se debe pesar cada uno y determinar la humedad del suelo de algunos cilindros. Se dividen los cilindros en 5 grupos, cada grupo de un rango de peso. Cada grupo forma un bloque del ensayo. Se deben cubrir los cilindros con un plato o algo parecido para evitar contaminación por rizobios hasta que se siembre el experimento. Se deben mantener los cilindros en capacidad de campo (ver instrucciones enseguida), con agua libre de contaminación, y pesándolos periódicamente durante el ensayo. Se puede estimar la capacidad de campo midiendo la humedad del suelo en el campo aproximadamente 1 día después de un aguacero. La humedad adecuada varía entre 18% para suelos arenosos y 24% para suelos arcillosos (en base a peso húmedo).

Para montar el experimento se siembran las semillas inoculadas y recubiertas con la misma metodología que se usaría en el campo, pero teniendo cuidado de que se proporcione más o menos el mismo número de células de rizobios por semilla en todos los tratamientos. Se deben aplicar un mínimo de 300 células por semilla y se puede aumentar esta cantidad hasta 10000 células por semilla. Alternativamente se pueden sembrar semillas pregerminadas, poniendo el inoculante (aprox. 0.5g) debajo de cada semilla.

Se aplican niveles de nutrientes adecuados para el buen desarrollo de la planta, revolviendo los primeros 5 centímetros del suelo. La primera

aplicación de nitrógeno se aplica dos semanas después de la germinación a través del tubo de irrigación. Se divide la aplicación de nitrógeno, por ejemplo en el caso de tener dos testigos con la aplicación de 75 y 150 kg N ha⁻¹ durante un experimento de más o menos 3 meses de duración, se podría aplicar el equivalente de 15 y 30 kg N ha⁻¹ respectivamente, cada dos semanas durante las 10 primeras semanas del experimento. Se debe tener cuidado de que la cantidad de solución aplicada no sea tan grande que se encharque el suelo, y siempre igualar con agua los pesos de los tratamientos que no reciben N.

Se deben mantener los cilindros cubiertos hasta que las plántulas alcancen más o menos 2 cm de altura, cuando se debe poner el tubo de irrigación y la arena parafinada*. Después de aproximadamente una semana se reduce el número de plantas a lo requerido siempre dejando las plantas mejores. Durante todo el experimento se debe evitar contaminación por rizobios entre los tratamientos, lavándose bien las manos y los instrumentos usados con alcohol entre cada tratamiento y evitando que el agua de irrigación sea contaminada por tierra o rizobios.

Al final del experimento (8-12 semanas) se evalúa el peso seco y contenido de nitrógeno de la parte aérea, y la nodulación por número ó peso seco. Se puede expresar la eficiencia de las cepas como aumento del nitrógeno de la parte aérea con relación al testigo sin nitrógeno.

Para sacar el suelo con las raíces del cilindro no se debe humedecer mucho el suelo. Se golpea el cilindro por fuera con un palo y el suelo sale fácilmente. Se deben lavar los cilindros y remojarlos 1 hora en 0.5% Na hipoclorito antes de volverlos a usar.

* Arena parafinada: Se prepara la arena parafinada así: Se disuelven 4 g de parafina sólida en 100 mls de benzol, y se mezclan vigorosamente con 1 kg de arena de cuarzo seca. Una vez evaporado el benzol, se esteriliza la arena durante dos horas en un horno de aire caliente a 16°C, en frascos tapados.

Fertilización de cilindros de suelo no perturbado para selección de cepas de rizobios

Es importante que los niveles de nutrientes aplicados a los cilindros sean suficientes para alcanzar concentraciones adecuadas de los elementos en el tejido foliar de las plantas. En cilindros o potes el desarrollo de las raíces es restringido, entonces puede ser necesario aplicar niveles más altos de nutrientes que los niveles requeridos en el campo. Por ejemplo en cilindros de suelo de Carimagua es necesario aplicar 100-200 kg P/ha para alcanzar los niveles de P en el tejido que se alcanzan con 20kg P/ha en el campo, También es necesario aplicar niveles más altos de K, Ca, Mg y S. Con estas tasas altas de fertilización, y debido a la concentración de los nutrientes aplicados en la superficie del suelo en los cilindros, pueden resultar problemas de toxicidad de Cl^- o Na^+ . Se recomienda entonces fraccionar la fertilización en por lo menos 2 partes, y evitar fuentes que contengan Na^+ o Cl^- . Se debe conducir un ensayo preliminar para escoger los niveles de nutrientes adecuados para las plantas analizando el tejido al final del ensayo. Se puede guiar por los niveles críticos determinados y publicados en el Informe Anual de Pastos Tropicales del CIAT, 1981 por la Sección de Nutrición de Plantas.

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

Referencia:

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. Pl Soil 74, 237-247.

Niveles de fertilización usados en cilindros de suelo no perturbado de Carimagua para selección de cepas de rizobios

Elemento	kg/ha	Fuente	P.M. (P.E.)	kg/fuente ha	mg fuente cilindro (88.3 cm ²)
P	* 50x2	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	252(62)	204x2	180x2
** Ca	128	-	-	-	-
Ca		64	CaCO ₃	100(40)	160
K	*30x2	K ₂ SO ₄	174(78)	67x2	59x2
***S	60	-	(32)	-	-
S		33	Flor de azufre	100(85)	39
Mg	40	MgO	40(24)	67	59
Zn	5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	288(65)	22	19.4
Cu	1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	160(64)	2.51	2.22
B	0.5	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	382(44)	4.3	3.8
Mo	0.4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	242(96)	1.01	0.89
****N	30	Urea		65.2	58

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

** Se aplica 128 kg Ca/ha parcialmente en el Ca (H₂PO₄)₂·H₂O y parcialmente en el CaCO₃.

*** Se aplica el S con el K (24.64 kg/ha), Zn(2.45), Cu(0.01), y flor de azufre (33 kg S/ha).

**** Se aplica 5 veces solamente en los tratamientos que llevan 150 kg N/ha.

Observaciones: Los fertilizantes insolubles (CaCO₃, flor de azufre, MgO) se aplican mezclándolos con suelo y distribuyéndolos en la superficie de los cilindros con un salero.

Cálculos para humedad de los cilindros

Se debe medir la humedad del suelo en 5 cilindros representativos y, pesar todos los cilindros en el mismo día que se toman las muestras para la humedad, marcando cada cilindro con un número de identificación. Se hace una tabla con los números de los cilindros divididos en 5 grupos, cada grupo representando un rango de pesos (por ejemplo Bloque I: 3775-3825g, Bloque II: 3825-3875g, Bloque III: 3875-3925g, Bloque IV: 3925-3975g, Bloque V: 3975-4025g).

Los cilindros con extremos de peso no se debían usar. Nuestros cilindros de PVC desocupados pesan 437g (ó 490g con el plato plástico). Se calcula el peso seco del suelo para el promedio del peso de cada bloque.

Por ejemplo:

3800-437 = 3363g suelo húmedo/cilindro en Bloque I (PSH inicial).

Humedad del suelo (medido): 14.78%

$$\text{Peso suelo seco (PSS)} = 3363 \text{ (PSH)} - \left(\frac{3363 \times 14.78}{100} \right) = 2866 \text{ g}$$

El contenido de peso húmedo deseado (final), para este suelo era del 20%, entonces el porcentaje de peso seco deseado era 80% del peso final del suelo.

Entonces: PSS = 0.8 x PSH final.

$$\text{PSH final} = \frac{2866}{0.8} = 3582 \text{ g}$$

Peso cilindro = 437g

Peso final + cilindro = 4019 g

Entonces un cilindro que pesa 3800 g en este bloque necesita de 4019-3800=219 ml agua. Se llevan todos los cilindros en este bloque a un peso de 4019 + 53 (plato) = 4072 g. Sin embargo, es mejor no agregar todo el agua a la vez, si no más o menos 50 ml menos que la cantidad final requerida, para dejar suficiente espacio para la solución nutritiva.

Cuando ya están sembrados los cilindros se adiciona al peso final el peso del tubo de irrigación (25 g) la arena parafinada (65 g) y el suelo usado para fertilización (5 g) = 95 g. Cada semana se pesan todos los cilindros y se corrigen los pesos al peso final calculado ($4072 + 95 = 4167$ g en nuestro ejemplo).

14. INSTRUCCIONES PARA LA INOCULACION DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS
TROPICALES CON RIZOBIOS

La inoculación de la semilla de leguminosas es importante para proporcionar una cepa de rizobio seleccionada, para que los nódulos formados fijen suficiente nitrógeno para sostener la máxima productividad de la planta.

Se llama de "inoculante" la mezcla de un cultivo de las cepas de rizobios seleccionadas para la leguminosa a ser sembrada con turba (un suelo con alto contenido de materia orgánica) molida (Malla No. 100), u otro soporte. Se puede aplicar el inoculante pegándolo en la semilla o directamente en el suelo. Aquí solamente consideraremos la inoculación de la semilla usando inoculante en base a turba. CIAT puede suministrar pequeñas cantidades de inoculantes para ensayos. Existen plantas comerciales que producen inoculantes en México, Brasil y Uruguay.

El inoculante es perecedero y debe, de ser posible, ser guardado en la nevera (no congelado). Después de seis meses en la nevera el inoculante puede perder su viabilidad. Un inoculante de buena calidad contiene por lo menos 2×10^7 células de rizobios/g.

El inoculante está empacado en plástico muy delgado para facilitar la respiración de las bacterias. Para evitar que se rompan los paquetes se deben envolver en papel o en tela que no sea plástica, pues el plástico grueso puede inhibir la respiración.

Se puede inocular la semilla simplemente mezclando el inóculante con agua y agregándole a la semilla, pero el número de rizobios/semilla y su sobrevivencia es mucho mayor si se pega el inoculante en la semilla con un adhesivo y si se cubre la semilla inoculada con un material protector como roca fosfórica o cal. Este proceso se llama "peletización" y el recubrimiento se llama "pelet". Para la peletización de la mayoría de las leguminosas forrajeras tropicales se usa la roca fosfórica. Para Leucaena se recomienda cal. Para mejorar la respuesta a la inoculación se puede agregar MoO_3 o Molibdato de Amonio a la roca fosfórica en una proporción de 1:3. No se debe utilizar Na_2MoO_4 como fuente de Mo en el

pelet, porque es tóxico cuando entra en contacto directo con los rizobios (Kerridge et al, 1973).

El pegante más apropiado es la goma arábiga comercial, molida, disponible en cualquier droguería en algunos países. Se puede sustituir "polvillo de mandioca" en el Brasil (Seiffert y Miranda, 1983). También se puede usar una solución al 5% de metilcelulosa. Ni azúcar ni leche son tan adecuados como pegantes.

El método de inoculación descrito aquí ha sido probado bajo condiciones de invernadero y campo para leguminosas forrajeras tropicales a ser sembrados en suelos ácidos e infértiles. Para estas condiciones es el método más confiable actualmente disponible.

Para más detalles ver Roughley, 1970 y Brockwell, 1982.

Instrucciones

1. Preparación de la semilla

La semilla debe ser escarificada previamente a la inoculación. En el caso de semillas tratadas con fungicidas se deben lavar con agua y secarlas antes de inocularlas.

2. Preparación de la goma

Preparar una solución de goma arábiga, por lo menos un día antes del plantío, agregando 40 g de goma a 100 ml de agua limpia (8 cucharadas rasas de goma para 10 de agua) y dejando la mezcla durante 12 horas para disolver. La goma disuelve más rápidamente en agua caliente. La solución es perecedera y debe ser guardada en la nevera o preparada nuevamente antes de cada siembra.

3. Inoculación

En el día de la siembra o la noche anterior, se ponen 50 g de inoculante/kg semillas a ser inoculadas en un balde o recipiente similar. En el caso de inoculación de mezclas de cepas es importante mantener los paquetes de inoculantes de cada cepa separados hasta el momento de la inoculación, cuando se utiliza una cantidad igual de cada una de las cepas para proporcionar un total de 50 g inoculante/kg semillas. Si se está inoculando con una sola cepa se usa la misma cantidad total (50 g/kg). Al inoculante en el balde se agrega aproximadamente 30 ml (3 cucharadas tamaño soperas) de la solución de goma arábica para cada 50 g de inoculante (12-14 gotas de goma arábica para 1 g de inoculante). Se mezcla bien, y agregan las semillas. Se sigue mezclando hasta que las semillas empiezan a despegarse una de la otra.

4. Peletización

A las semillas inoculadas se agrega inmediatamente 200-400 g/kg semillas (la cantidad depende del tamaño de las semillas), de roca fosfórica, o una mezcla de 1:3 de MoO_3 con roca fosfórica. Revolver el recipiente muy suavemente, para que forme una capa firme encima de cada semilla. Una semilla bien peletizada se ve completamente cubierta por la roca fosfórica.

Después de peletizar las semillas se deben dejar extendidas durante 20 minutos en la sombra para que se sequen y endurezcan los pelets. Esto es importante para evitar después que los pelets descascaren.

5. Siembra

Evitar guardar las semillas peletizadas más de 12 horas antes de la siembra, pues los rizobios puede perder su efectividad debido a toxinas producidas por la semilla, y desecamiento de las células. Se debía evitar que se calienten las semillas y si es posible se debían taparlas con un poco de tierra después de sembrarlas.

Referencias:

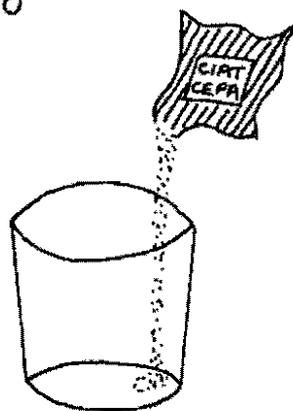
- Brockwell, J. (1982). Inoculation methods for field experiments and farmers. In Vincent, J.M. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. 211-227.
- Kerridge, P.C., Cook, B.G. and Everett, M.L. (1973). Application of molybdenum trioxide in the seed pellet for sub-tropical pasture legumes. Tropical Grasslands, 7, 229-232.
- Roughley, R.J. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil, 32: 675-701.
- Seiffert, M.F. y Miranda, C.M.B. (1983). Recomendacoes para inoculacao e peletizacao de sementes de leguminosas forrageiras tropicais, CNPCC, Campo Grande, Brasil. Comunicado Técnico No. 17.

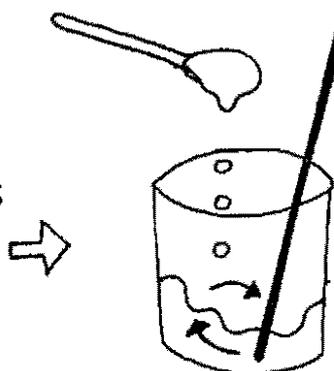
1. SI LAS SEMILLAS ESTAN TRATADAS CON FUNGICIDAS, LAVAR Y SECARLAS.

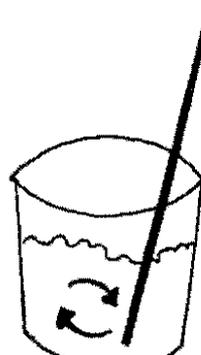
2.  PREPARAR UNA SOLUCION DE 40% DE GOMA ARABIGA EN AGUA CALIENTE (4 CUCHARADAS RASAS DE GOMA MOLIDA PARA 5 CUCHARADAS DE AGUA) UN DIA ANTES DE LA SIEMBRA

EL DIA DE LA SIEMBRA

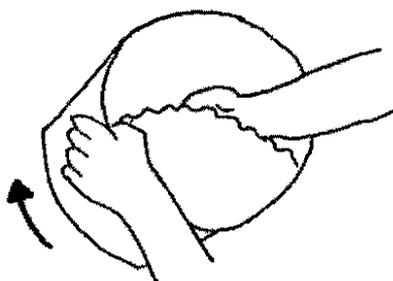
3. INOCULACION

 PONER 50 G INOCULANTE ESPECIFICO POR KG DE SEMILLAS A SER INOCULADAS EN UN BALDE LIMPIO

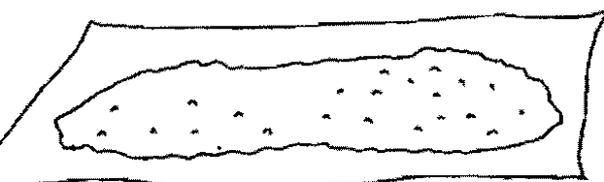
 AGREGAR APROXIMADAMENTE 30 ML (3 CUCHARADAS SOPERAS) DE GOMA PARA CADA 50 G DE INOCULANTE Y MEZCLAR BIEN

 AGREGAR LAS SEMILLAS LIMPIAS Y MEZCLAR BIEN HASTA QUE SE EMPIEZA A SECAR LA GOMA (LAS SEMILLAS SE DESPEGAN UNA DE LA OTRA)

4. PELETIZACION

 ADICIONAR 300-400 G ROCA FOSFORICA POR KG SEMILLA Y MEZCLAR MUY SUAVEMENTE CON LA MANO, ROTANDO EL BALDE PARA RECUBRIR LAS SEMILLAS.

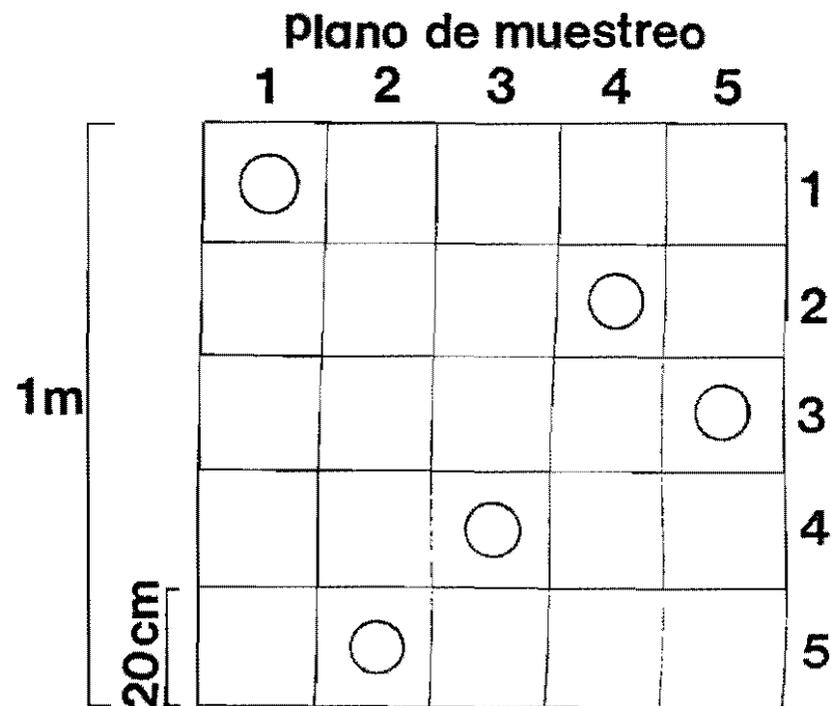
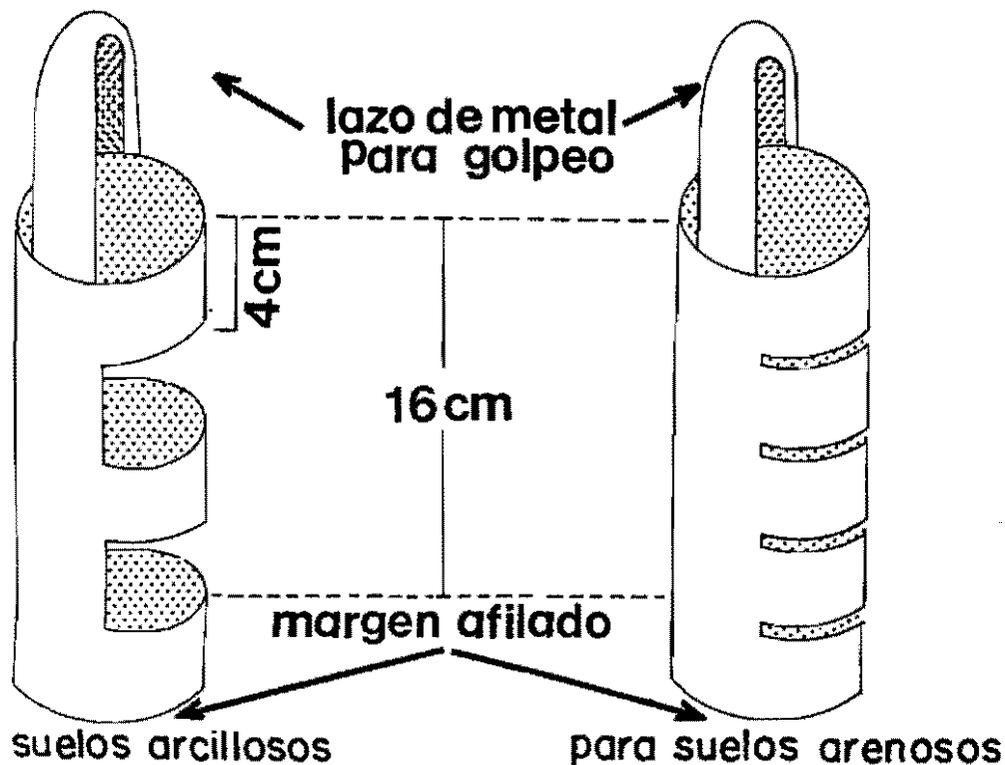
5. SIEMBRA

 TENDER EN LA SOMBRA PARA SECAR LAS

 SEMBRAR LO MAS PRONTO POSIBLE (EN MENOS DE 24 HORAS) Y EVITAR QUE CALIENTEN LAS SEMILLAS.

15. METODO PARA EVALUACION DE NODULACION DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN PRADERAS

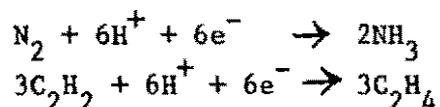
Usando un marco de 1m^2 dividido en 25 cuadros de 20×20 cm, escoger un lugar en la pradera donde haya más del 60% de cobertura de la leguminosa. Estimar el porcentaje de cobertura de la leguminosa, usando una escala de 1 a 4 para cada cuadro. Usando un barreno de 7 cm de diámetro (ver dibujo), y golpeándolo con un martillo, sacar una muestra del suelo de cada línea de cinco cuadros, cada una de una columna diferente (ver plano). Dividir cada muestra de suelo en 4 submuestras representando 4 profundidades en el suelo (0-4, 4-8, 8-12, 12-16 cm). Contar el número de nódulos en las veinte submuestras. Repetir en cuatro sitios más de la pradera que tengan más del 60% de cobertura de leguminosa. En el caso de bajo número de nódulos por muestra, se puede aumentar el número de muestras por marco, o el número de sitios muestreados. Se debe tomar nota del color interno de los nódulos y especificar si los números representan el número total de nódulos o únicamente los nódulos vivos. Se pueden expresar los números por área, por porcentaje de cobertura de la leguminosa, o por planta. En praderas donde no hay áreas con más de 60% de cobertura de leguminosa, deben evaluarse con la metodología descrita para plantas individuales. (ver "Prototipo de Ensayo de Inoculación...").



16. REDUCCION DE ACETILENO

Este método ha sido usado desde 1968 para la evaluación de fijación de N_2 por diferentes sistemas simbióticos y asimbióticos.

Se basa en el hecho de que la enzima nitrogenasa utiliza no solo N_2 sino también C_2H_2 (acetileno), N_2O , CN_3NC etc. La reducción de C_2H_2 a C_2H_4 (etileno) es fácil de medir utilizando un cromatógrafo de gas que tenga un detector de ionización de llama. Acetileno es un sustrato preferido por la enzima, entonces en la presencia de acetileno la reducción de N_2 a NH_4^+ es inhibida. Teóricamente se reducen 3 moléculas de C_2H_2 para cada molécula de N_2 fijada:



Sin embargo, en la vida real esta relación varía mucho, y se considera que el método no debía ser usado para estimaciones cuantitativas de la fijación de N_2 , pero que con interpretación cuidadosa puede ser usado para estimaciones cualitativas.

Procedimiento

1. Prender el cromatógrafo y averiguar que está funcionando bien, con suficiente gas para todo el ensayo.
2. Cosechar plantas una por una bajo condiciones frescas entre las 6 y las 10 am. para evitar la parte más caliente del día. Es aconsejable en un ensayo grande de invernadero cosechar una repetición por día.
3. Colocar las raíces de la planta cosechada en una botella de tamaño adecuado inmediatamente después de la cosecha, sin lavarlas (el agua puede inhibir la actividad).

4. Cerrar la botella que debía tener una tapa de caucho para inyección. Para mejorar el sello se puede usar grasa. Se pueden adaptar botellas de mayonesa, mermelada, etc. forrando las tapas con caucho de neumático cortado exactamente para caber dentro de la tapa, y furando la tapa en 2 o tres sitios para uso de la jeringa. El tamaño de la botella es importante para que las raíces no sean demasiado sueltas, ni demasiado apretadas.
5. Inyectar aproximadamente 10% del volumen de la botella (usando una medida exacta) de acetileno* (por ejemplo en una botella de 240ml se inyectan 25 ml de C_2H_2 , bombeando la jeringa 3 veces y removiendo 25 ml del gas en la botella para dejar una presión ambiental). Apuntar la hora exacta de la inyección. Jeringas plásticas desechables de 1,5 y 50 ml son necesarias con agujas finas.
6. Después de 30, 60 y 90 minutos sacar muestras de 0,5 ml e inyectarlas al cromatógrafo. Si no se alcanzan a leer las muestras inmediatamente se pueden inyectarlas a "vacutainers" (tubos de ensayo especiales para muestras de sangre) y guardarlas durante varios días. Sin embargo, es mejor inyectarlas inmediatamente para evitar problemas con escape de gases.

* El acetileno puede ser producido usando carbureto de calcio (CaC_2), o puede ser sacado de un cilindro bajo presión. El acetileno sacado de un cilindro se guarda en un neumático. Algunos productos comerciales contienen contaminantes y es necesario purificarlos antes de usarlos, o cambiar la fuente. Siempre se deben sacar las muestras a través de un tubo de caucho separado del neumático para evitar que el neumático se dañe.

7. Se debe medir la altura del pico de ambos gases (C_2H_2 y C_2H_4), entonces hay que cambiar la atenuación en el cromatógrafo después de que sale el pico de C_2H_4 para leer el pico de C_2H_2 . Para tener una idea general, en el cromatógrafo Perkin Elmer del CIAT, se lee el etileno en x8 x16 o x32 y el acetileno en x128 o x256. Si la altura del pico de C_2H_2 es baja en comparación con las otras muestras, se debe volver a inyectar la muestra para determinar si ha habido escape de gases en la inyección o en la botella de incubación. Si ha habido escape de gases en la botella de incubación, los valores de reducción de acetileno no son confiables y se debe considerar como parcela perdida.

8. Calibración del cromatógrafo

$$24 \times 10^3 \text{ ml} = 1 \text{ mol (20°C y 360mm)}$$

$$= 10^6 \text{ umol}$$

$$1 \text{ ml } C_2H_4 = \frac{1 \times 10^6}{24 \times 10^3} = 41.7 \text{ umoles}$$

Para la curva de calibración se toma un padrón de C_2H_4 a 995 ppm y calcula el promedio de altura de los picos de 5 inyecciones de 0.5 ml de la dilución, en una atenuación x 8.

El volumen inyectado:

$$\frac{1}{2} \times \frac{995 \text{ mls } C_2H_4}{10^6} =$$

$$\frac{1}{2} \times \frac{995}{10^6} \times 41.7 = 20746 \times 10^{-6} \text{ umoles } C_2H_4$$

20746×10^{-6} umoles C_2H_4 produce un pico de altura X U G C.

Suponiendo que X = 10 en una atenuación especificada el factor de calibración $F = 2074.6 \times 10^{-6}$ umoles C_2H_4 /UCG, en esta atenuación (x8) = $\frac{20746}{8} \times 10^{-6}$ umoles C_2H_4 /UCG en atenuación x1

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

9. Para calcular umoles C_2H_4 /muestra/hora

$$\frac{240(v)}{0.5 (i)} \times \frac{UCG \times F}{h \times \text{No. de muestras}} = \text{umoles } C_2H_4/\text{muestra/hora}$$

v = volumen botella de incubación;

i = volumen inyectado al cromatógrafo;

UCG = altura del pico multiplicado por la atenuación;

F = factor de calibración;

h = horas de incubación;

No. de muestras = número de plantas en la muestra

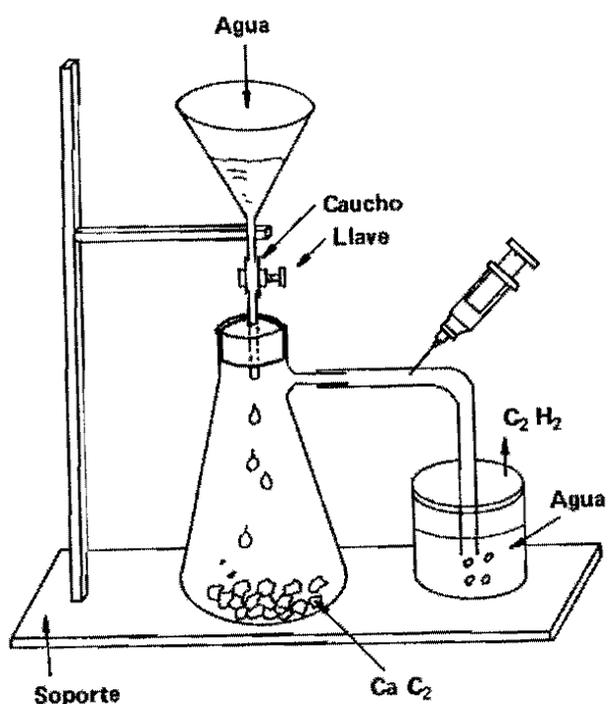
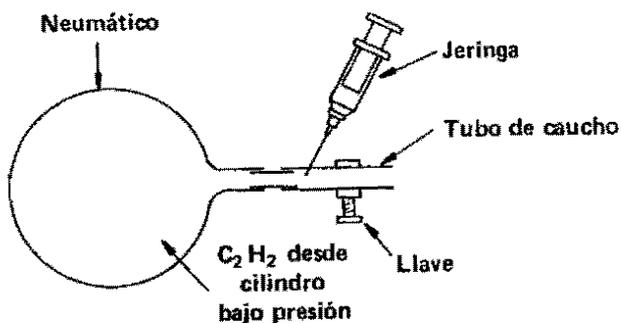
Ejemplo: $F = 259 \times 10^{-6}$ umoles

Pico 48 UCG en atenuación x 8

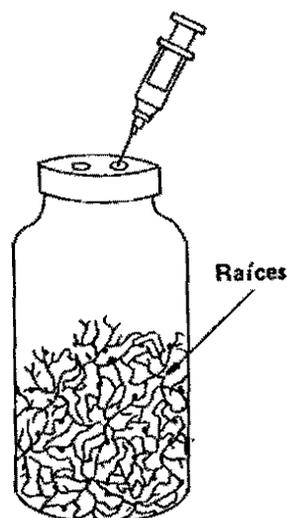
Incubación = 1 h, con dos plantas/botella

$$\frac{240 \times 48 \times 8 \times 259}{0.5 \times 1 \times 2 \times 10^6} = 5.97 \text{ umoles/planta/hora.}$$

I. DOS ALTERNATIVAS PARA LA FUENTE DE C₂H₂

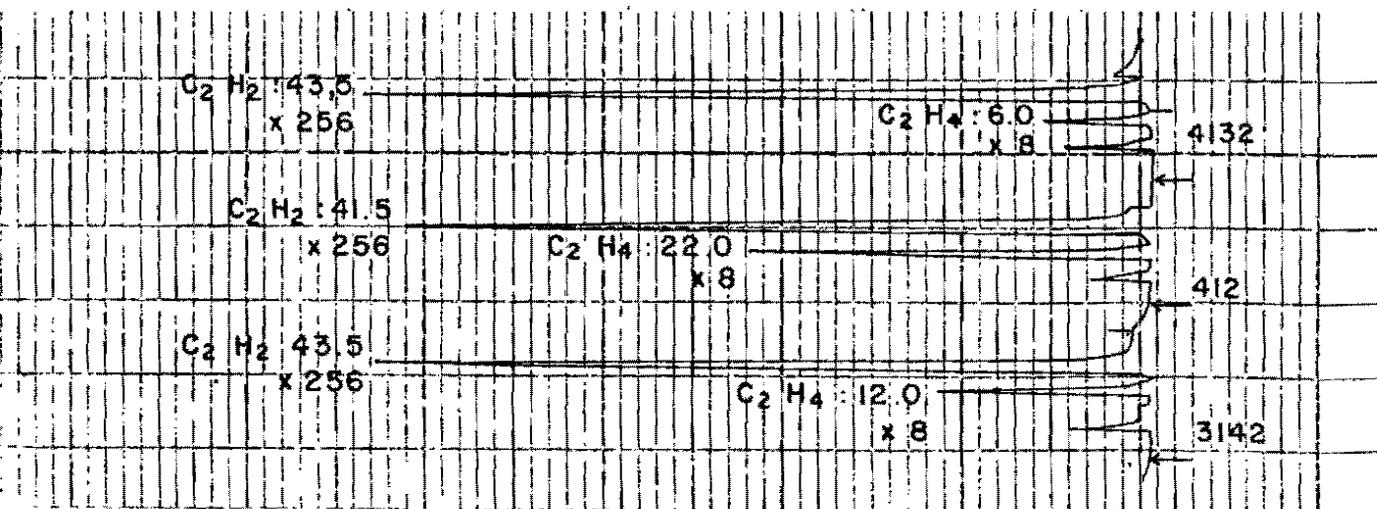


2. INCUBACION DE RAICES NODULIZADAS



3. PICOS DE ETILENO Y ACETILENO FORMADOS POR 3 MUESTRAS.

3S: El primer pico formado despues de la inyeccion (→) no se toma en cuenta.



17. PROTOTIPO DE ENSAYO DE INOCULACION DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS
EN EL CAMPO

El objetivo del ensayo propuesto aquí es de evaluar cepas de rizobios que han sido promisorias como inoculantes para leguminosas forrajeras tropicales adaptadas a suelos ácidos, bajo condiciones de campo.

En el Cuadro 1 se encuentra una lista de las cepas que han sido efectivas con diferentes leguminosas en cilindros de suelo de Carimagua (para más detalles sobre los ensayos de selección refiérase a los informes anuales del Programa de Pastos Tropicales de los años 1981, 1982, 1983, 1984 y Sylvester-Bradley *et al.*, 1983). Para definir las necesidades de inoculación se sugiere montar ensayos con tres a cinco leguminosas que han sido identificadas como promisorias en una área representativa para la introducción de pastos mejorados. Una alternativa a un ensayo de campo sería un ensayo de invernadero utilizando cilindros de suelo, incluyendo diferentes suelos representativos de la región, para determinar cuales son las combinaciones leguminosa-suelo que requieren inoculación.

El ensayo de campo propuesto aquí incluye tratamientos sin inocular, inoculados y fertilizados con N. Con estos tratamientos se puede evaluar la efectividad de las cepas nativas y las cepas inoculadas. Es necesario que haya una respuesta a nitrógeno (una diferencia en rendimiento de N entre el tratamiento no inoculado y el tratamiento fertilizado con N) para que haya también una respuesta a inoculación. Si no hay ninguna respuesta a N, y las plantas no inoculadas nodulan bien, puede deberse a la actividad de las cepas nativas. Si hay una respuesta a N y no a inoculación, puede deberse a la falta de adaptación de las cepas inoculadas a las condiciones locales, a un inoculante de mala calidad, o a una tasa demasiado baja de rizobios/semilla. Si hay una buena respuesta a la inoculación y a N, se puede concluir que las cepas inoculadas son efectivas bajo condiciones locales. Este tipo de ensayo fué sugerido por Date (1977). Un ensayo sencillo que se podría montar sería con 3 tratamientos por leguminosa (sin inocular; inoculado con una de las cepas recomendadas en la Tabla 1; fertilizado con N). Se podría

incluir un tratamiento adicional de una cepa aislada localmente. Este aislamiento se puede hacer en el CIAT, mandándonos los nódulos secos en tubos con sílica gel o CaCl_2 lo más pronto posible (es necesario avisarnos antes para conseguir el certificado fitosanitario). En el caso de este tipo de ensayo de 4 tratamientos (sin inocular, inoculado con cepa CIAT, inoculado con cepa local, fertilizado con N) se podría montarlo con 2 niveles de fertilidad, o con y sin inoculación con micorrizas o con 2 tipos de preparación de tierra, lo que resultaría en un ensayo con 8 tratamientos. También se puede montarlo en 2 ó 3 sitios representativos. Otra alternativa sería un número mayor de cepas probadas o una prueba de diferentes métodos de inoculación con la misma cepa, o más niveles de N aplicado. Es importante tener en cuenta que una mezcla de cepas puede tener menos efectividad que algunas de las cepas probadas individualmente, (ver Informe Anual, 1984). Por eso solo se recomienda el uso de mezclas de cepas si también se incluyen tratamientos con la cepas inoculadas individualmente.

El método sugerido aquí (establecimiento de la leguminosa en surcos en sabana o una pradera preestablecida de una gramínea) pretende minimizar la disponibilidad de N mineral para facilitar la evaluación de las cepas nativas e inoculadas de rizobios. En suelo arado, puede aumentar la mineralización de N, y si no resultan respuestas a inoculación ni a N, no es posible determinar si es debido a la presencia de cepas nativas efectivas o a la presencia de N mineral en el suelo. Si no hay ninguna respuesta bajo condiciones de labranza reducida, es una indicación confiable que la leguminosa realmente no necesita de inoculación, debido a la presencia de cepas nativas efectivas en el suelo. Sin embargo, es importante que el establecimiento y crecimiento de la leguminosa sea buena para concluir con seguridad que la falta de respuesta a inoculación y N se debe a cepas nativas efectivas.

Recalcamos que este tipo de ensayo requiere un cuidado especial para asegurar un buen establecimiento y evitar la contaminación entre parcelas. Además, es importante evaluar la calidad de los inoculantes usados, con el método de recuentos por NMP o en cajas de Petri (si el inoculante usado no contiene contaminantes), contando el número de

células de rizobios/semilla en el mismo día que la siembra. Esta información ayuda mucho en la interpretación de los resultados.

Materiales y Métodos

1. Epoca de siembra

Es importante sembrar en la misma época empleada por los agricultores de la región.

2. Selección del sitio

Para evitar la contaminación entre parcelas y para reducir la variabilidad, se necesitan parcelas grandes en un sitio con poca pendiente, y representativo de la región y donde no se haya sembrado antes con leguminosas. Puede ser sabana nativa o una pradera degradada o preestablecida de gramínea sola. Las condiciones más apropiadas para probar la respuesta a la inoculación de una leguminosa forrajera, son en asociación con una gramínea que competirá por el N mineral en el suelo. Es importante que la gramínea esté previamente establecida para evitar problemas con su establecimiento disperejo, que afectaría el establecimiento de la leguminosa.

3. Diseño experimental

La parcela experimental se compone de 4 surcos paralelos de 10m de largo, o de 8 surcos de 5 m de largo. Los surcos son de aproximadamente 40 cm de ancho y con 1.10 m de gramínea no disturbada entre ellos (un total de 1.50cm entre surcos). Si el sitio no es totalmente plano, se debe orientar los surcos perpendiculares a la pendiente (ver croquis). Los bloques deben atravesar la pendiente.

4. Preparación de la tierra

Se quema la sabana o guadaña la gramínea, para evitar competencia con las plántulas de la leguminosa a ser sembrada. Se pueden hacer surcos

usando un azadón, con una profundidad de 10-15cm, asegurando la eliminación de las raíces de la gramínea del área a ser sembrada. También se puede preparar los surcos con un cultivador, montando dos escardillos para cada surco a una distancia de 40cm en la primera barra del cultivador y una pala pequeña entre los dos escardillos en la segunda barra o viceversa. Puede ser necesario cambiar el sistema de preparación de la tierra en cada sitio, según las características del suelo y de la gramínea asociada. Por esto se recomienda ensayar antes para determinar el mejor método de preparación de surcos. Obviamente es importante cercar el área del ensayo antes de la siembra para evitar la entrada de ganado u otros animales.

5. Fertilización

Se fertiliza en el surco, calculando la cantidad necesaria para lm^2 para cada metro lineal de surco. En la ausencia de recomendaciones específicas para el sitio, se recomienda la aplicación de 120Ca, 22P, 40S, $40\text{K}_2\text{O}$, 20 Mg, 5 Zn, 2 Cu, 1 B y 0.4 Mo ($\mu\text{g/surco de 10 m}$). En el tratamiento con N se aplican 20kg N/ha (43 kg Úrea) cada dos semanas (43g Úrea/surco de 10m), durante el ensayo, con la primera aplicación 2 - 4 semanas después de la siembra. Si antes del final del ensayo ocurre una época seca, se suspenden las aplicaciones de N hasta que empiece a llover nuevamente. Es necesario aplicar niveles altos de N, porque el objetivo de este tratamiento es demostrar el potencial máximo de rendimiento de las plantas cuando el nitrógeno no limita el crecimiento.

6. Identificación de las parcelas

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

7. Cuidados para evitar contaminación entre parcelas

Se evita la contaminación entre parcelas siempre usando recipientes y herramientas separadas para cada tratamiento y lavando bien estos materiales y las manos con agua y enjuagando con alcohol antes de pasar

de un tratamiento al otro. Es especialmente importante que no se contaminen los tratamientos no inoculados, entonces se sugiere que se trabaje primero con estos tratamientos y luego pasar a los tratamientos inoculados. Además se deberían cubrir los pies con bolsas plásticas al entrar a cada parcela. Se quitan las bolsas al salir de la parcela, dejándolas colgadas en una estaca para que puedan ser usadas nuevamente. Si se lo considera necesario se hacen surcos entre las parcelas para evitar contaminación por el agua de la lluvia.

8. Inoculación

Se aplica el inoculante (50g/kg semillas) adhiriéndolo a las semillas con una solución al 40% de goma arábica y recubriendo las semillas inoculadas con roca fosfórica (ver instrucciones aparte). Se inoculan las semillas en el mismo día de la siembra. Si por alguna razón no se pueden sembrar las semillas inoculadas en el mismo día, se deben lavar y reinocular en el día de la siembra. Es aconsejable hacer la inoculación en la madrugada para poder empezar la siembra y los recuentos temprano. Es importante pesar semillas e inoculante adicional en los tratamientos donde se van a sacar muestras para los recuentos. Si la muestra es de 2g pesar la cantidad de semilla necesaria para la parcela + 2g, y + 0.1g de inoculante.

9. Recuento de los rizobios en las semillas inoculadas

(Si esta etapa es imposible, puede ser omitida). Sin embargo, es recomendable incluirla para la mejor interpretación de los datos). Se toma una muestra de las semillas inoculadas para el ensayo, y se hace un recuento según las instrucciones aparte. Es preferible usar inoculante en base a turba estéril, para poder usar el método de recuentos en cajas de Petri, que es más sencillo que el método NMP. Si se usan cajas de Petri, es necesario hacer la inoculación en recipientes estériles y esterilizar la goma arábica, que puede contener muchos hongos.

10. Siembra

Para la siembra se debe escoger un día en que la tierra esté húmeda y que no esté lloviendo, ni haciendo mucho sol. Si se usan taras para medir la cantidad de semillas a sembrar, es necesario hacer taras especiales para semillas inoculadas y semillas no inoculadas. Para eso se debe poner la cantidad de semillas no inoculadas para un surco en un tubo de ensayo y marcar el nivel de las semillas en el tubo. Se inoculan estas semillas y se ponen en otro tubo para marcar el nivel para las semillas inoculadas. Se siembra la cantidad indicada en el tubo para cada surco. También se puede evitar este proceso pesando e inoculando la semilla para cada parcela separadamente. Se siembra en el centro del surco, usando una tasa de siembra para dejar 15 a 20 plantas/m lineal. Para Centrosema spp. 10g semillas/surco; P. phaseoloides 4g/surco; Desmodium spp. y Stylosanthes spp. 3g/surco, generalmente son adecuados. Es importante tapar las semillas con un poco de tierra y compactarlas bien con el pié para evitar que la lluvia las arrastre.

11. Control de malezas

Las malezas se controlan manualmente, evitando contaminación entre parcelas como fué descrito anteriormente. Las hormigas, etc., se controlan con Aldrín. Si la gramínea crece mucho, se puede cortar con machete.

12. Resiembras y raleo

Si es posible se debieran evitar las resiembras, pero si la población está muy mal distribuída, se pueden transplantar plántulas del mismo tratamiento, siempre llevando con la plántula el suelo que rodea las raíces, tratando de no disturbar las raíces. El raleo es más fácil de efectuar que la resiembra y tiene el objetivo de evitar mucha competencia entre plantas en casos donde germinan muchas semillas en el mismo sitio.

13. Primera evaluación de nodulación

Aproximadamente 6 semanas después de la siembra (cuando las plantas tienen 3 ó 4 hojas trifoliadas extendidas) se deben sacar 10 plantas por parcela con todas las raíces y nódulos y evaluar el número total de nódulos. En el caso de nódulos grandes (Centrosema spp.) se puede también evaluar peso seco de nódulos por parcela. También se puede evaluar la nodulación según las instrucciones abajo (No. 15).

14. Cortes

Se hacen 4 cortes durante el establecimiento. En cada corte se cortan 3 submuestras de 2m lineales en sitios escogidos al azar dentro de cada parcela. En cada corte se toman las submuestras en un sitio diferente, cortando al nivel del suelo. Se recomienda que se haga el primer corte 9-12 semanas después de la siembra, y el segundo, tercero y cuarto, 3, 6, y 9 semanas después del primer corte. Se toma nota del número de plantas en cada submuestra y se reúnen las 3 submuestras para determinar peso verde. Si la época de crecimiento es muy corta, se pueden hacer 2 cortes durante la primera época de crecimiento, dejar pasar la época y seguir con los cortes cuando empiece a llover otra vez. Sin embargo, no se debía seguir evaluando una vez que la leguminosa esta "establecida" (en condiciones para empezar el pastoreo) porque las condiciones ya no son representativas de una pradera bajo pastoreo. Después de reunir las submuestras del campo y determinar el peso verde se toma una submuestra de 100g para secar (o toda la muestra si es menor que 100g). Se secan a 60-80°C para después moler y determinar porcentaje de N. Se considera que cada metro lineal del surco representa $1m^2$, es decir las 3 submuestras representan $6m^2$. La muestra ($6m^2$) es grande para cubrir la variabilidad que existe dentro de las parcelas.

15. Segunda evaluación de nodulación

Luego del segundo corte (si es posible un día después) se hacen evaluaciones de nodulación. Se evalúan 6 plantas por parcela, escogiendo dos plantas en los extremos de cada uno de los sitios del

corte más reciente. No hay necesidad de sacar las plantas, sino cavar cuidadosamente alrededor de las raíces usando una navaja o instrumento similar. Se toma en cuenta los nódulos vivos únicamente. Se califica la abundancia, el tamaño, la distribución, el color interno y el aspecto general de la nodulación (Tabla 2). También se pueden sacar las plantas y llevarlas en bolsas plásticas para hacer la evaluación bajo techo. Si hay necesidad de almacenar las muestras se debían guardar bajo refrigeración.

Este método de evaluación se adaptó de las recomendaciones de Brockwell et al. 1982). Se analizan los datos calculando chi cuadrado para tablas de frecuencia para cada parámetro. (Ver hojas para registro de los datos).

Referencias:

- Brockwell, J., Diatloff, A., Roughley, R.J. and Date, R.A. 1982. Selection of rhizobia for inoculants. In Vincent, J.M. Nitrogen Fixation in legumes. Academic Press.
- CIAT. Informes Anuales del Programa de Pastos Tropicales 1981, 1982, 1983 y 1984.
- Date, R.A. 1977. Inoculation of tropical forage legumes. In Exploiting the legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture, eds. J.M. Vincent and J. Bose. Univ. of Hawaii. NIFTAL Project Univ. Hawaii. Comm. Trop. Agric. Misc. Publ. 145, 293-311.
- Sylvester-Bradley, R. Ayarza, M.A. Méndez, J.E. y Moriones, R. 1983. Use of undisturbed soil cores for evaluation of Rhizobium strains and methods for inoculation of tropical forage legumes in a Colombian Oxisol. Plant and Soil, 74, 237-247.

Tabla 1. Cepas efectivas con leguminosas forrajeras tropicales (Abril 1985)

<u>LEGUMINOSA</u>	<u>CEPA</u>
<u>Arachis pintoii</u> 17434	2138*, 3101, 3806, 3810*
<u>Centrosema brasilianum</u> 5234	1670*, 3334
<u>C. macrocarpum</u> 5062	3101*, 3111, 3196
<u>C. macrocarpum</u> 5065, 5744, 5887, 5713, 5737, 5740	590, 1670*, 1780*, 2290, 3101*, 3174
<u>C. sp.</u> 5112	3196, 3334, 49, 590, 1670*, 2290 3101, 3694, 3714, 1780*
<u>C. sp.</u> 5568	3101*
<u>C. sp.</u> 5277	3714, 3101*
<u>C. híbrido</u> 5931	3111, 3196, 2348, 3334*
<u>C. pubescens</u> 438	1670*, 49, 1780*, 590
<u>Desmodium heterophyllum</u> 349	2469*
<u>D. ovalifolium</u> 350	46, 2335*, 3143
<u>D. ovalifolium</u> 3666	2335*, 2469*, 3418*
<u>D. ovalifolium</u> 3784	2335*, 2469*, 2413, 3418*
<u>D. heterocarpon</u> 365	3418*
<u>D. canum</u> 13032	1502, 2372, 2383, 2487*, 3030*
<u>Pueraria phaseoloides</u> 9900	2434*, 2453, 3221, 643, 3648
<u>Stylosanthes capitata</u>	1460, 2138*, 995*, 2400, 2403, 308, 2265, 870*, 3232

* Cepas recomendadas para la inoculación separadamente o en mezcla.

Nota: Para leguminosas no indicadas aquí, por favor consultar con la Sección de Microbiología del Programa de Pastos Tropicales.

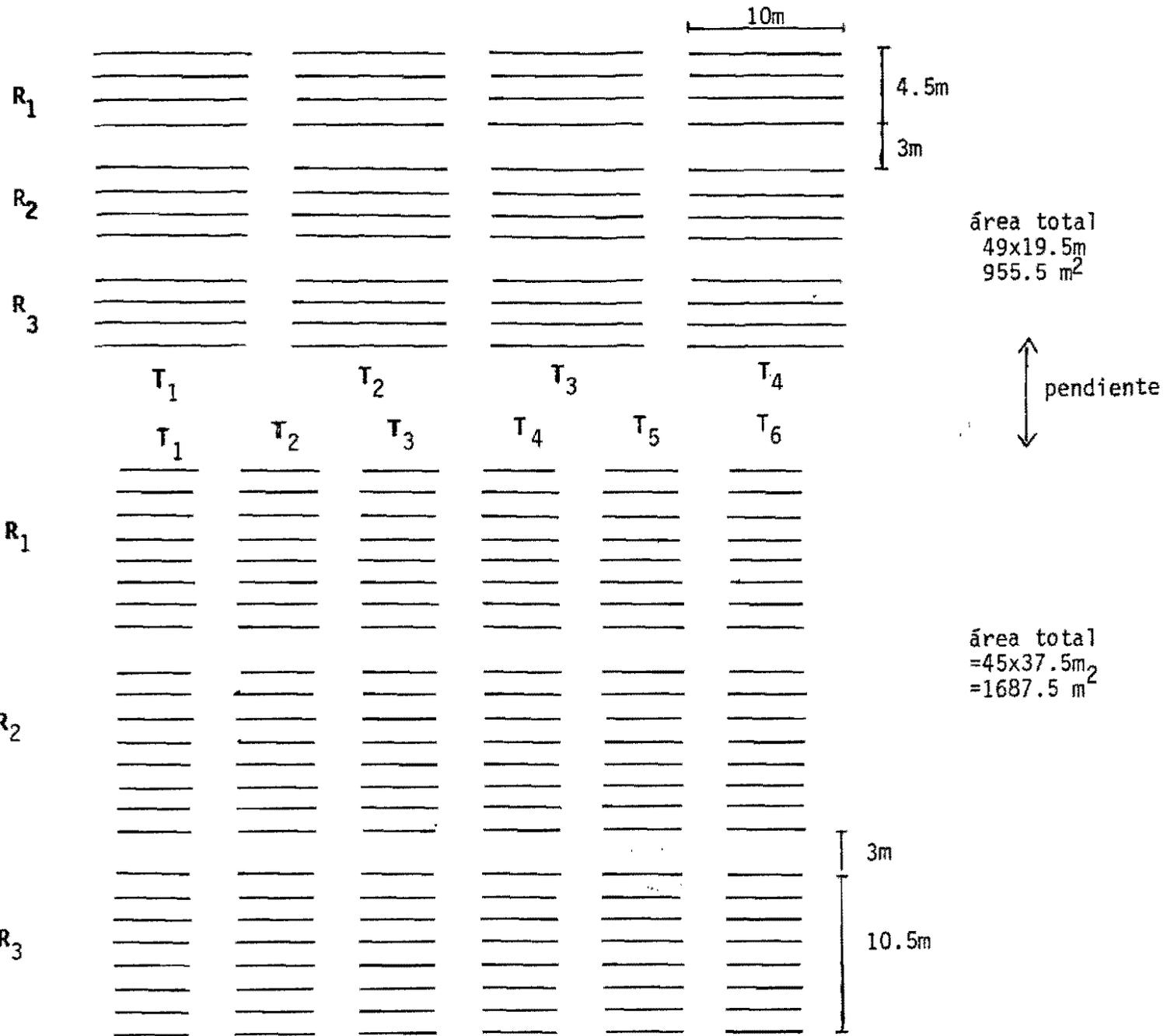
Tabla 2. Códigos para evaluación de nodulación en plantas individuales de leguminosas forrajeras tropicales (cinco parámetros).

1) <u>Abundancia</u> (No. aproximado de nódulos/planta)		4) <u>Color interno predominante de aproximadamente 10 nódulos vivos/planta</u>	
<u>Evaluación</u>	<u>Código</u>	<u>Evaluación</u>	<u>Color</u>
Superior a 100	4	Negro	N
50 - 100	3	Rojo*	R
10 - 50	2	Verde	V
1 - 10	1	Blanco	B
0	-	Marrón	M
		Rojo y verde**	R/V
2) <u>Tamaño Predominante</u>		Rojo y negro	R/N
<u>Evaluación</u>	<u>Código</u>	Marrón y verde	M/V
Grandes	4	Sin color predominante	S
Medianos	3	Sin nódulos	-
Pequeños	2		
Sin tamaño predominate	1	5) <u>Aspecto general</u>	
No hay nódulos	-	<u>Evaluación</u>	<u>Código</u>
3) <u>Nodulación en raíz principal</u>		Todos los nódulos en	2
<u>Evaluación</u>	<u>Código</u>	la raíz principal son	
Abundante	3	grandes y rojos; los	
Regular	2	otros nódulos son pe-	
Nulo	1	queños y blancos o	
No hay nódulos	-	pálidos.	
		No así	1

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

** Los colores R/V, etc., representan nódulos que contienen 2 colores.

(DOS ALTERNATIVAS DEPENDIENDO DEL NUMERO DE TRATAMIENTOS)



Fecha Evaluación:		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Ensayo No. :		No. %		No. %		No. %		No. %		No. %		No. %	
CALIFICACION		No.	%	No.	%								
Abundancia	4												
	3												
	2												
	1												
	-												
Tamaño	4												
	3												
	2												
	1												
	-												
Nodulación en raíz principal	3												
	2												
	1												
	-												
Color interno predominante	N												
	R												
	V												
	B												
	M												
	R/V												
	R/N												
	M/V												
	S												
-													
Aspecto general	2												
	1												

*No. de las plantas examinadas por tratamiento en cada categoría (Total de plantas examinadas/tratamiento = 10)

18. CAMARA ESTERIL SEGUN DISEÑO DE NIFTAL

Esta cámara es una alternativa menos costosa a una cámara de flujo laminar, y más efectiva que los cuartos de siembre con luz ultravioleta comunmente usados en laboratorios de Microbiología. El mismo mechero de Bunsen se encarga de esterilizar el aire que circula a través de la cámara entrando por el mismo orificio que contiene el mechero y saliendo por la apertura delantera.

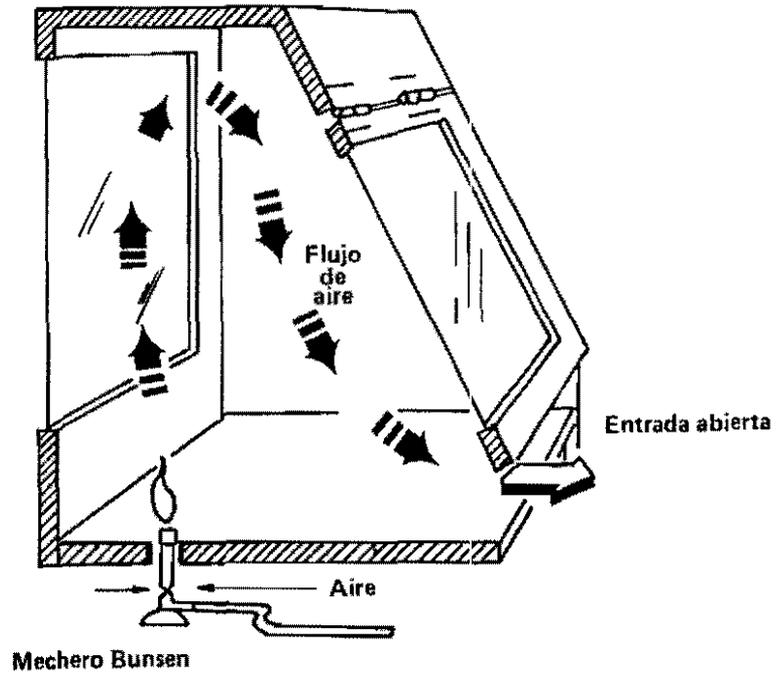
Es necesario tomar mucho cuidado desconectando el gas completamente cuando la cámara no está funcionando para evitar el peligro de explosión.

Se debe ajustar la altura de la cámara para facilitar el manejo de pipetas (es decir, debe ser en una mesa alta).

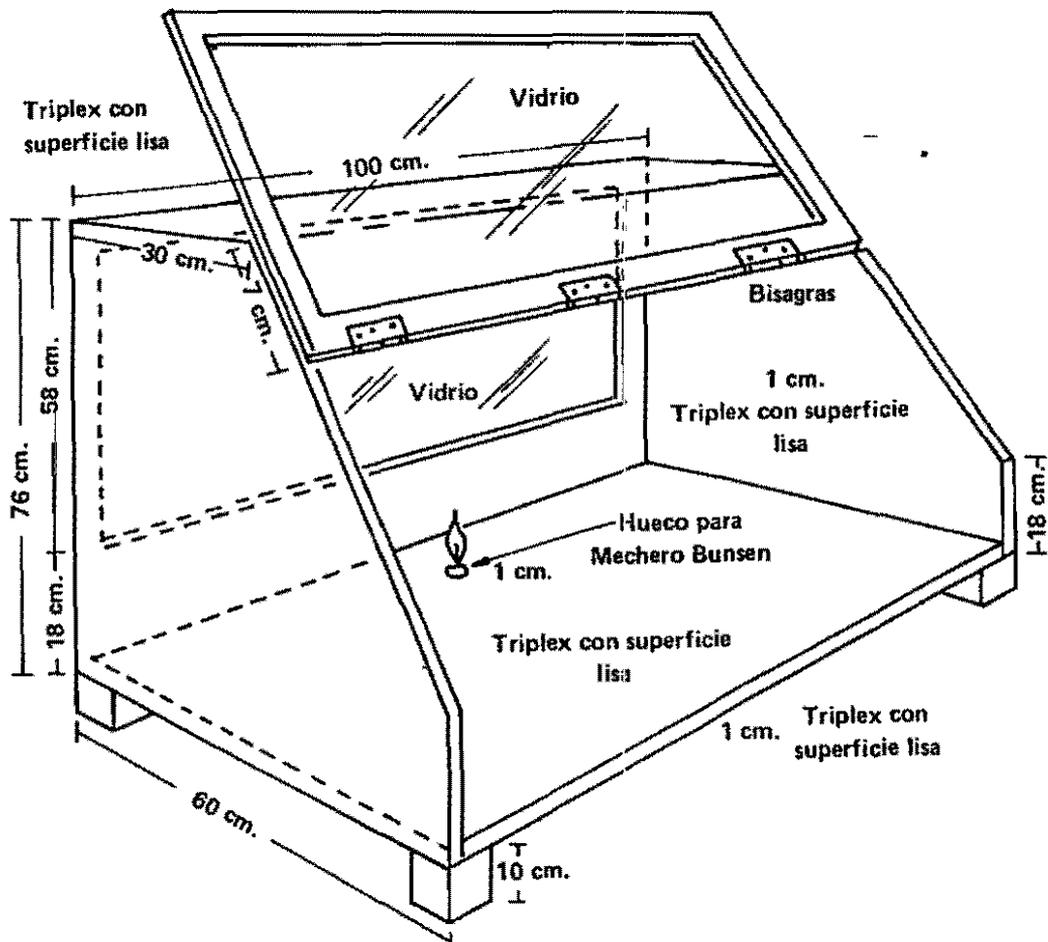
Componentes de la cámara

- 1) Fondo de triplex, marco de madera y cristal (0.12 - 0.5 cm espesor)
- 2) Piso: Triplex (plywood) con superficie lisa o fórmica
- 3) Techo: Triplex
- 4) Refuerzo de triplex o madera para sujetar la puerta.
- 5) Puerta: de cristal o cristal plástico con marco de madera, fijada en el 4) por bisagras.
- 6) Dos lados de triplex.
- 7) 8 moldes de madera de 53cm para sostener el cristal.
- 8) 8 moldes de madera de 90 cm.
- 9) 4 patas 10 cm altura.

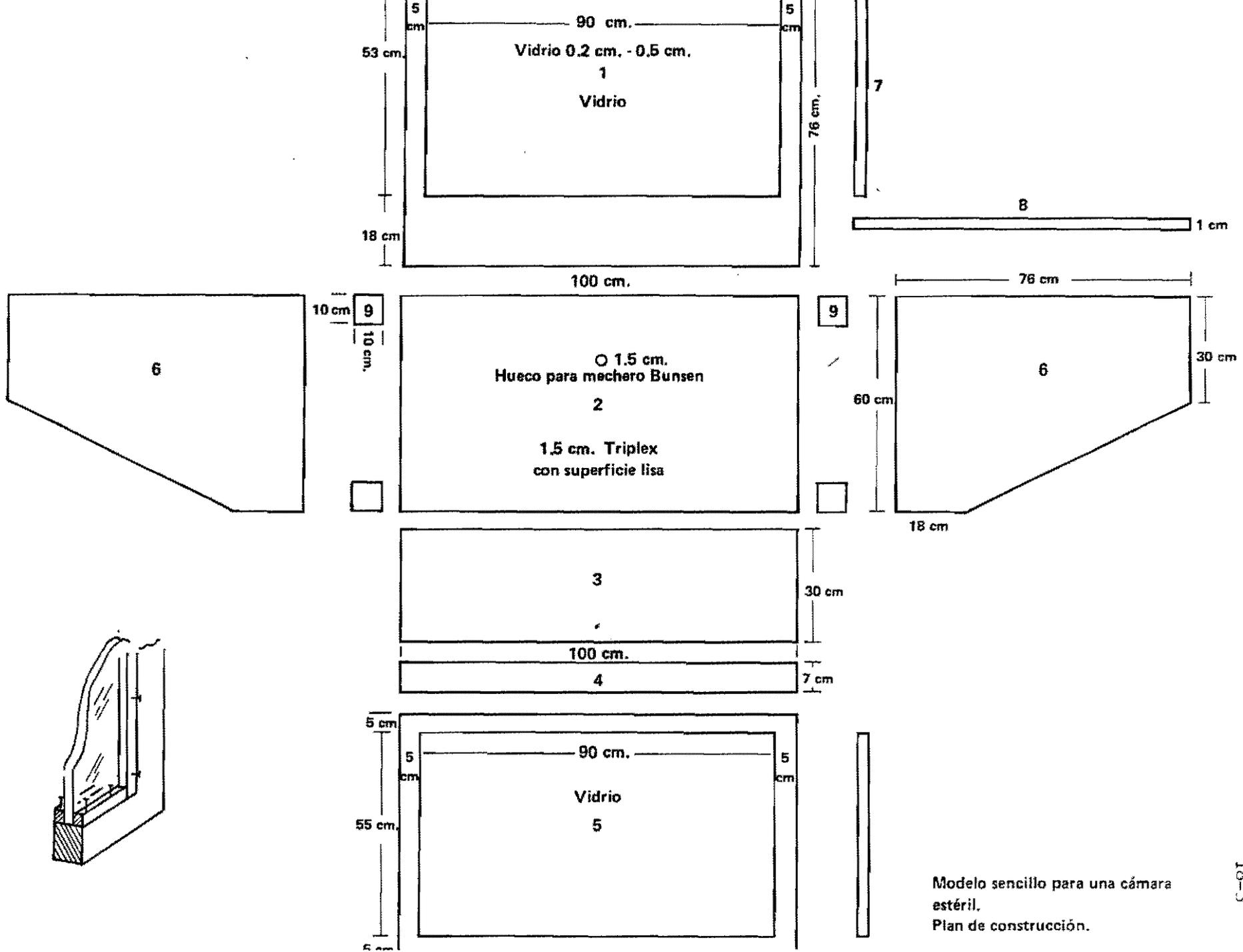
El triplex deberá ser de 1.5 cm. de grosor, con una terminación lisa en ambas



(2) Corte Transversal de la Cámara.



Modelo sencillo para una Cámara estéril.



Modelo sencillo para una cámara estéril.
Plan de construcción.

