

SB
317
.L43
E9



G U I A D E E S T U D I O

EVALUACION, SELECCION Y MANEJO DE LA SIMBIOSIS
LEGUMINOSA-RIZOBIO


BIBLIOTECA
ADQUISICIONES - CANJE

2544
07 JUL. 1987

CONTENIDO CIENTIFICO:

Rosemary Sylvester-Bradley, Ph.D.

Judith A. Kipe-Nolt, Ph.D.

David J. Harris, Ph.D.

PRODUCCION:

Carlos A. Valencia, Ing. Agr.

CIAT, Cali, Colombia
Febrero, 1987

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

Cita Bibliográfica:

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1987. Evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio; Guía de Estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido científico: Rosemary Sylvester-Bradley; Judy Kipe-Nolt; David J. Harris. Producción: Carlos A. Valencia. Cali, Colombia. CIAT, 79p.

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.....	4
INTRODUCCION.....	6
1. LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.....	7
1.1 IMPORTANCIA DE LA FIJACION DE NITROGENO.....	7
1.2 ORGANISMOS QUE FIJAN NITROGENO.....	9
1.3 LA ENZIMA NITROGENASA.....	10
1.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO.....	11
1.4.1 Familia Leguminosae.....	11
1.4.2 Familia Rhizobiaceae.....	12
1.4.3 Ciclo de vida de los rizobios y nodulación.....	16
1.4.4 Características de los nódulos.....	19
1.4.5 Terminología descriptiva de la simbiosis	21
1.4.6. Evaluación de la simbiosis.....	22
PREGUNTAS DE ESTUDIO.....	25
2. MANEJO DE LOS RIZOBIOS.....	29
2.1 RECOLECCION Y MANEJO DE CEPAS DE RIZOBIOS.....	29
2.1.1 Recolección y preservación de nódulos	
2.1.2 Aislamiento, caracterización y autenticación de rizobios.....	30
2.1.3. Efectividad potencial.....	36
2.1.4. Preservación y reconstitución de cepas..	36
2.2 PREPARACION Y MANEJO DE INOCULANTES.....	38
2.2.1 Función de los inoculantes.....	38
2.2.2 Preparación de los inoculantes.....	38
2.2.3 Evaluación de la calidad de los inoculantes.....	39
2.3 INOCULACION.....	41
2.3.1 Objetivo de la inoculación.....	41
2.3.2 Inoculación de las semillas.....	43
2.3.3 Inoculación del suelo.....	43
PREGUNTAS DE ESTUDIO.....	48
3. EVALUACION AGRONOMICA DE LA SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO	48
3.1 OBJETIVOS, TRATAMIENTOS Y PARAMETROS PARA LA EVALUACION AGRONOMICA.....	48

	Pág.
3.2 ETAPAS DE LA EVALUACION.....	50
3.2.1 Evaluación de la efectividad de las cepas nativas (Etapa I.).....	52
3.2.2 Evaluación de la efectividad de la simbiosis incluyendo el uso de inoculantes (Etapa II).....	55
3.2.2.1 Necesidad de seleccionar cepas	57
3.2.2.2 Selección de cepas efectivas..	59
3.2.2.3 Mejoramiento genético de leguminosas.....	62
3.2.3 Evaluación de la interacción entre la simbiosis y los factores de manejo agronómico (Etapa III).....	62
3.2.4 Selecciones posteriores y liberación de los materiales.....	65
3.3 MONTAJE Y MANEJO DE LOS ENSAYOS.....	67
3.3.1 Selección del sitio.....	67
3.3.2 Invernadero vs. campo.....	67
3.3.3 Control de la disponibilidad de N mineral	67
3.3.4 Precauciones para evitar contaminación..	69
3.3.5 Muestreos para evaluar nodulación y rendimiento de nitrógeno.....	70
3.3.6 Análisis de los resultados.....	72
PREGUNTAS DE ESTUDIO.....	75
BIBLIOGRAFIA Y LECTURAS COMPLEMENTARIAS.....	78

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, 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.
- . Mencionar los parámetros utilizados para la evaluación agronómica de la simbiosis y explicar su significado.

INTRODUCCION

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.

1. LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO

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, una parte del nitrógeno atmosférico (la 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.

1.1 IMPORTANCIA DE LA FIJACION DE NITROGENO

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.

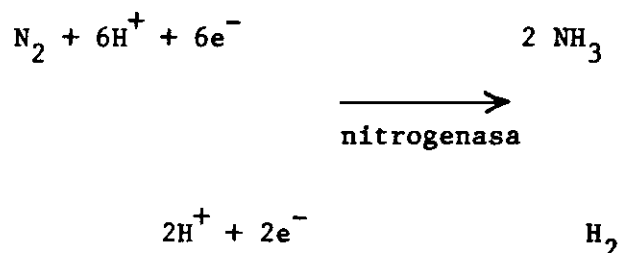
Los fertilizantes nitrogenados se utilizan ampliamente para corregir la deficiencia de nitrógeno y elevar los rendimientos de las cosechas. Sin embargo, debido a los altos precios que han alcanzado los recursos energéticos utilizados para la elaboración de los fertilizantes nitrogenados, ha surgido la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

que forman las leguminosas con bacterias de la familia Rhizobiaceae, la cual da lugar a la formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno.

1.3 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^- .

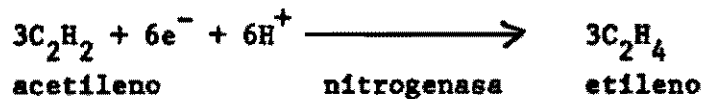
En condiciones óptimas, la reacción de la nitrogenasa puede expresarse de la siguiente manera:



La liberación de H_2 reduce la eficiencia de la nitrogenasa y, en parte, explica, la gran demanda de energía requerida 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.

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

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 también 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.

1.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO

1.4.1 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, Albizzia, 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.

1.4.2 Familia Rhizobiaceae

Los rizobios son bacterias del suelo, caracterizadas por su habilidad para infectar raíces de leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de N₂ en las raíces, aunque en algunos casos se pueden formar en el tallo (como en Sesbania y Aeschynomene).

1. LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO

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, una parte del nitrógeno atmosférico (la 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.

1.1 IMPORTANCIA DE LA FIJACION DE NITROGENO

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.

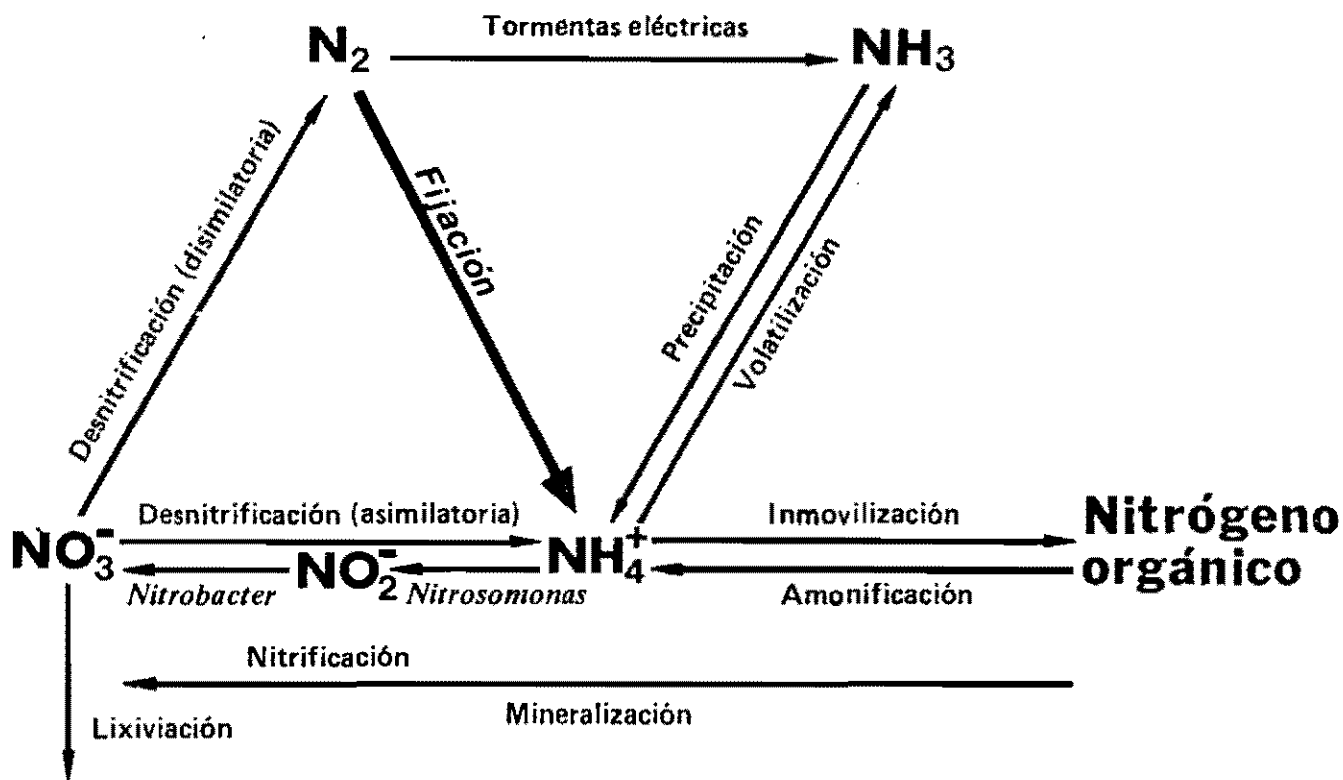


Figura 1. Ciclo bioquímico del nitrógeno.

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 altos requerimientos de hidrógeno, temperatura y presión. Por ejemplo, el requerimiento para producir una tonelada de amoníaco es de aproximadamente 1000 m^3 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 alta eficiencia 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.

1.2 ORGANISMOS QUE FIJAN NITROGENO

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.

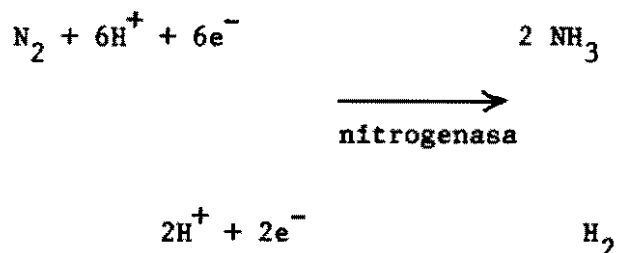
De los microorganismos que forman asociaciones simbióticas con plantas superiores, hongos o helechos, es de interés particular la asociación

que forman las leguminosas con bacterias de la familia Rhizobiaceae, la cual da lugar a la formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno.

1.3 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 requerida 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.

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

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 también 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.

1.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO

1.4.1 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, Albizzia, 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.

1.4.2 Familia Rhizobiaceae

Los rizobios son bacterias del suelo, caracterizadas por su habilidad para infectar raíces de leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de N_2 en las raíces, aunque en algunos casos se pueden formar 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
		----- LM Agar a 28°C -----		
<u>Rhizobium</u>	Acida	Circulares convexas, semitraslúcidas, mucilaginosas	más de 3 mm de diámetro en los primeros 3 a 5 días de incubación	Manitol Sucrosa
<u>Bradyrhizobium</u>	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 um por 1.2 a 3.0 um, 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 oscilan entre 25 a 30°C y 6 a 7, respectivamente, aunque existen cepas adaptadas a condiciones más extremas.

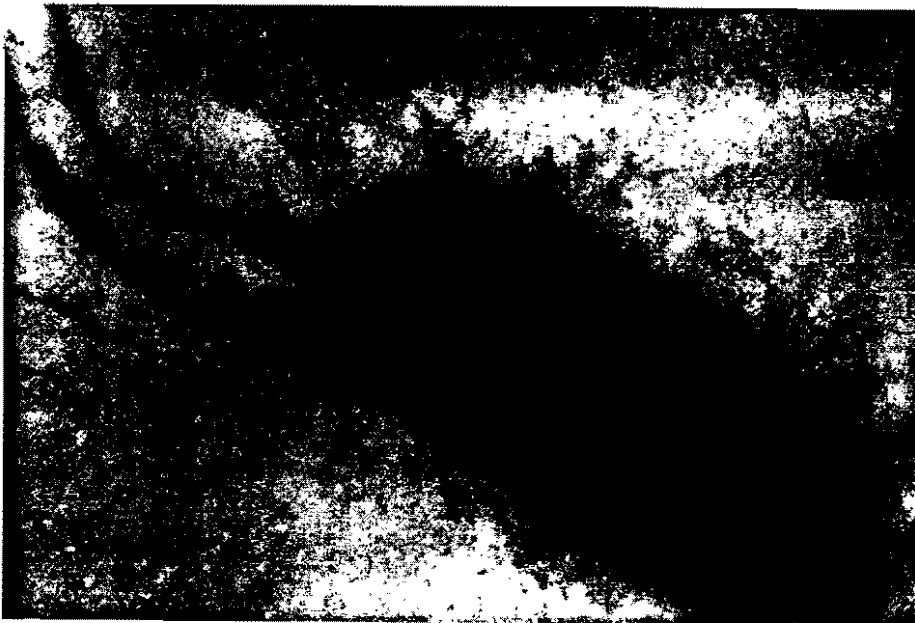


Figura 2. Microfotografía de una célula de Rhizobium phaseoli, ampliada 30,000 veces.

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).

Cuadro 2. Especies de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium y sus géneros hospedantes.

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

Fuente: Jordan, 1984.

1.4.3 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:

1.4.3.1 Vida libre y multiplicación en la rizosfera

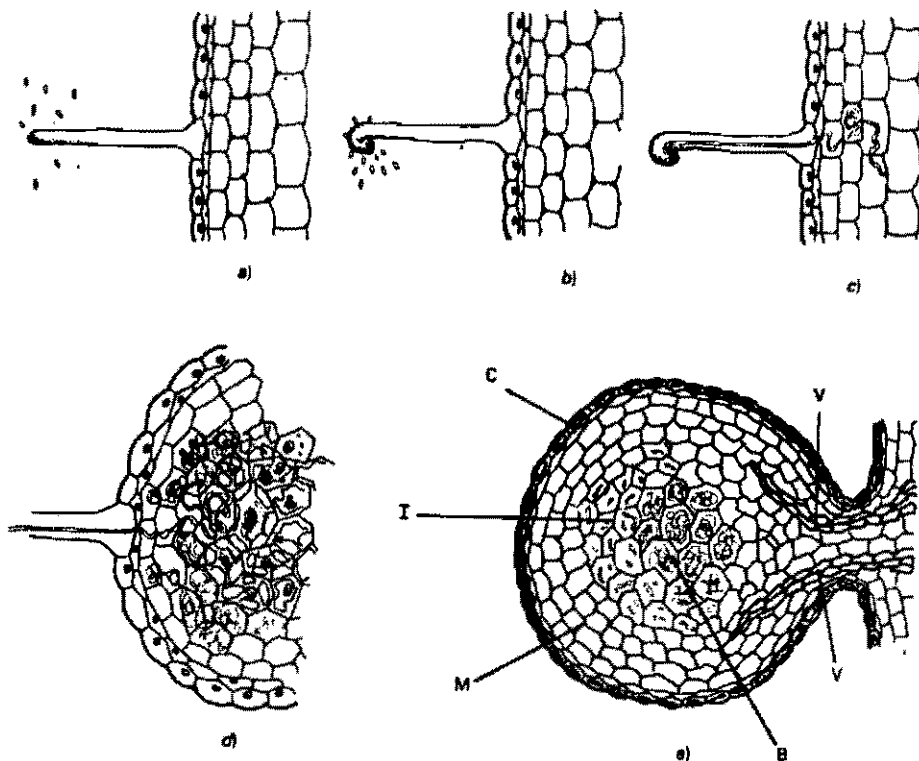
Los rizobios son capaces de vivir heterotróficamente en el suelo; en estas condiciones, las cepas de rizobios varían en su tolerancia al calor, a la deficiencia de humedad y a los niveles extremos de pH, lo cual afecta la habilidad de las cepas individuales para sobrevivir y persistir en el suelo en 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 específicos para la especie de leguminosa. De esta manera se inicia el proceso que conduce a la simbiosis.

1.4.3.2 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,



a. Multiplicación de los rizobios

b. Curvatura del pelo radical

c. Hilo de infección

d. División celular y formación del nódulo

C. Corteza nodular

B. Zona fijadora (bacteroides)

I. Zona de infección y de crecimiento del nódulo

M. Zona meristemática apical

V. Tejido vascular

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

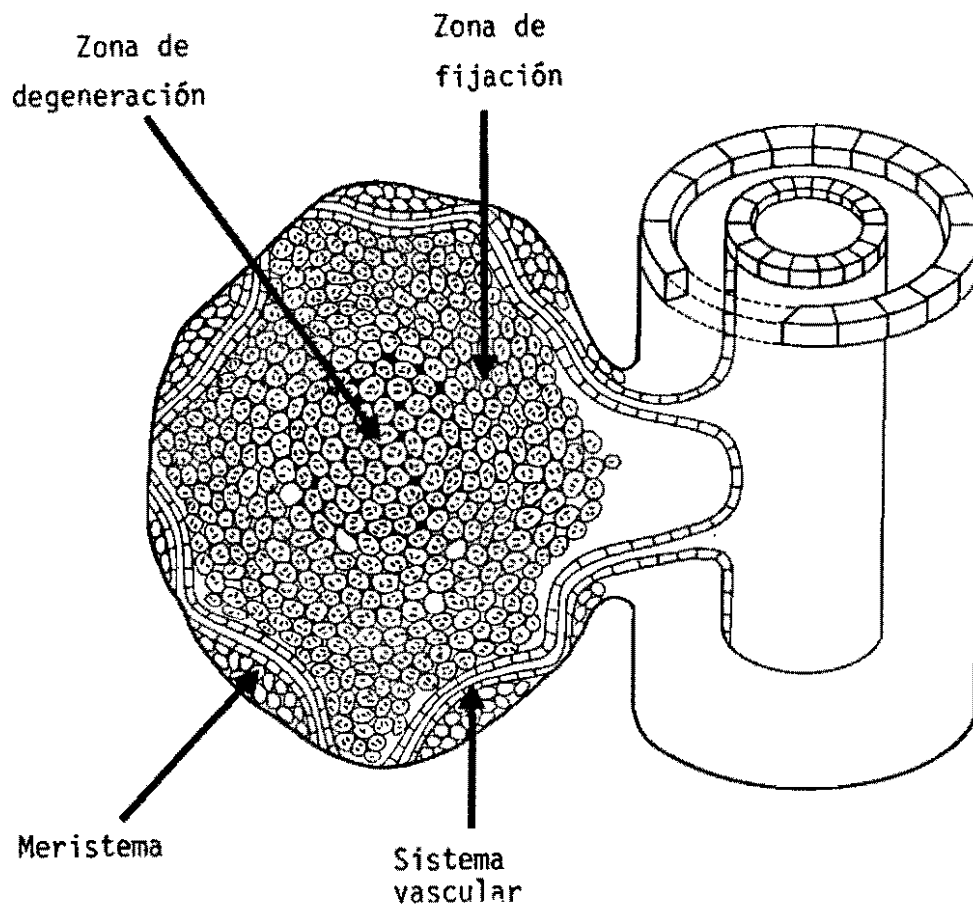


Figura 4. Corte esquemático de un nódulo determinado.

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).

1.4.3.3 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 (alantonina 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).

1.4.3.4 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.

1.4.4 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). 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.

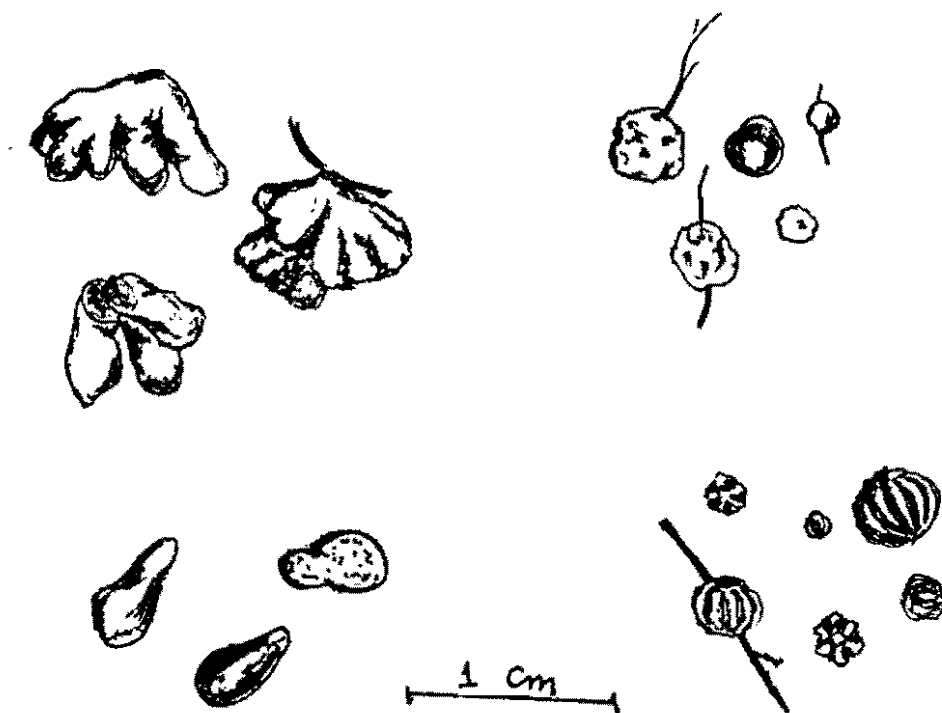


Figura 5. Los nódulos fijadores de nitrógeno tienen formas y tamaños variados.

El color interno de los nódulos efectivos generalmente es rojo o rosado debido a la presencia de leghemoglobina. Si el color interno del nódulo

es 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.

1.4.5 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 e infectividad potencial de 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 6).

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, sin modificación por parte del hombre.

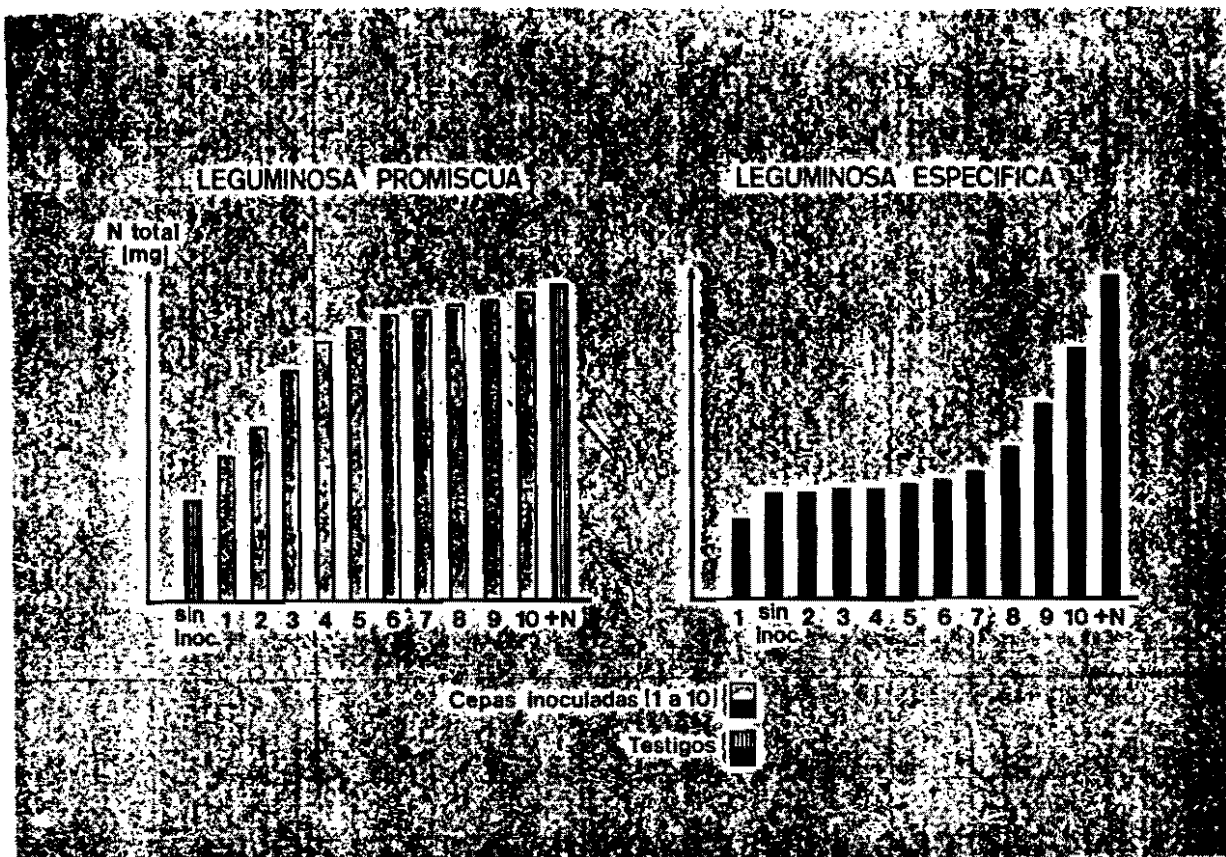


Figura 6. Las leguminosas específicas nodulan sólo con una o unas pocas cepas de rizobios; las leguminosas promiscuas nodulan con un amplio rango de cepas.

1.4.6 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 N^{15} 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 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.

1.4.6.1. Evaluación de la nodulación

Aunque las características de la nodulación no están directamente relacionados 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.

1.4.6.2. Determinación del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal

La determinación de la concentración 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, para evaluar la efectividad de la simbiosis, es necesario obtener datos de rendimiento al igual que 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. También 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 clasifica en dos géneros, Rhizobium y Bradyrhizobium. Complete el siguiente cuadro con sus principales características:

Género	Reacción	Tasa de crecimiento	Ejemplo
<u>Rhizobium</u>			
<u>Bradyrhizobium</u>			

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. El rendimiento de nitrógeno de una leguminosa es un parámetro que cuantifica el N fijado. ()
12. Los nódulos más cercanos a la raíz principal generalmente son más efectivos. ()

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. ()

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

15. La enzima nitrogenasa es muy sensible a:

- a. la temperatura
- b. la humedad
- c. la sequía
- d. el oxígeno
- e. todas las anteriores

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:

- a. la cepa de rizobio
- b. la leguminosa
- c. las condiciones de manejo
- d. las condiciones ambientales
- e. todas las anteriores

18. El máximo suministro de energía (carbohidratos) de la leguminosa hacia los nódulos ocurre en:

- a. la fase vegetativa
- b. la floración

- c. la fase reproductiva
 - d. la madurez
 - e. es constante
19. El color interno rojo de los nódulos activos se debe a:
- a. la nitrogenasa
 - b. los bacterioides
 - c. la leghemoglobina
 - d. el oxígeno
 - e. ninguna de las anteriores
20. La mayoría de las leguminosas de importancia económica pertenece a la subfamilia
- a. Mimosoideae
 - b. Papilionoideae
 - c. Caesalpinioideae
 - d. a y b
 - e. b y c

2. MANEJO DE LOS RIZOBIOS

Para lograr una combinación leguminosa-rizobio efectiva, es posible intervenir para modificar intencionalmente la actividad de la simbiosis, 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 cepas para trabajar con inoculantes.

2.1 RECOLECCION Y MANEJO DE CEPAS DE RIZOBIOS

2.1.1 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 7).

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.

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.

2.1.2 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.

2.1.2.1 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

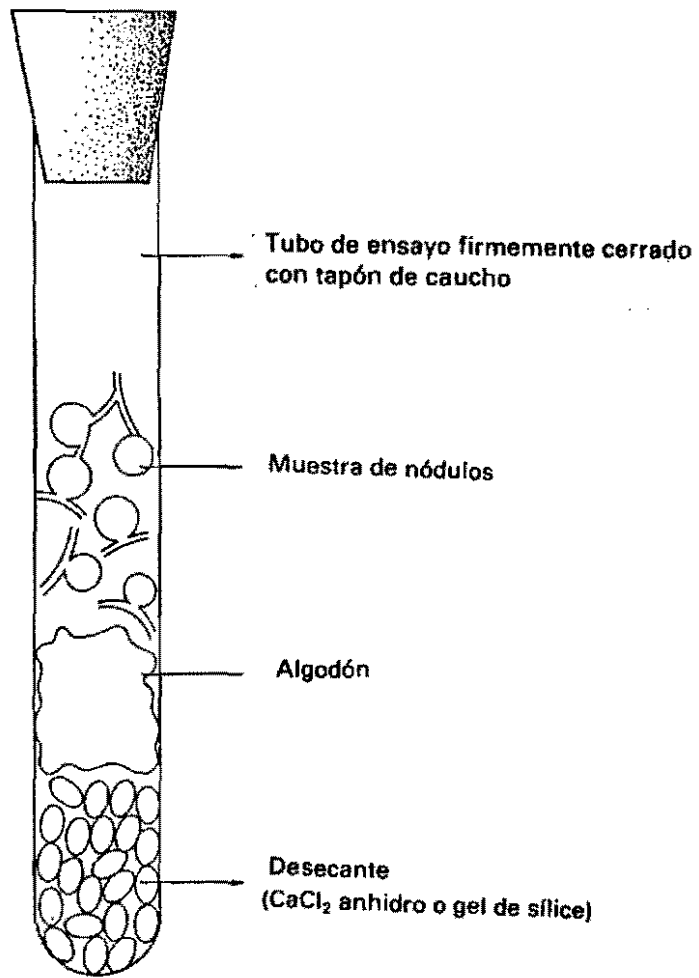


Figura 7. Tubo con desecante, empleado para preservar los nódulos colectados.

sembrarla varias veces a partir de colonias individuales, estriando o rastrillando en la superficie del agar (Figura 8).

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 bromotímol, el cual torna el medio de color amarillo con la producción de acidez, y de color azul con la producción de alcalinidad. En lugar de los indicadores de pH, al medio se le puede incorporar como indicador, rojo del 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.

Cuando las muestras contienen muchos hongos, en el medio de cultivo se pueden incluir fungicidas. Aunque esto 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.

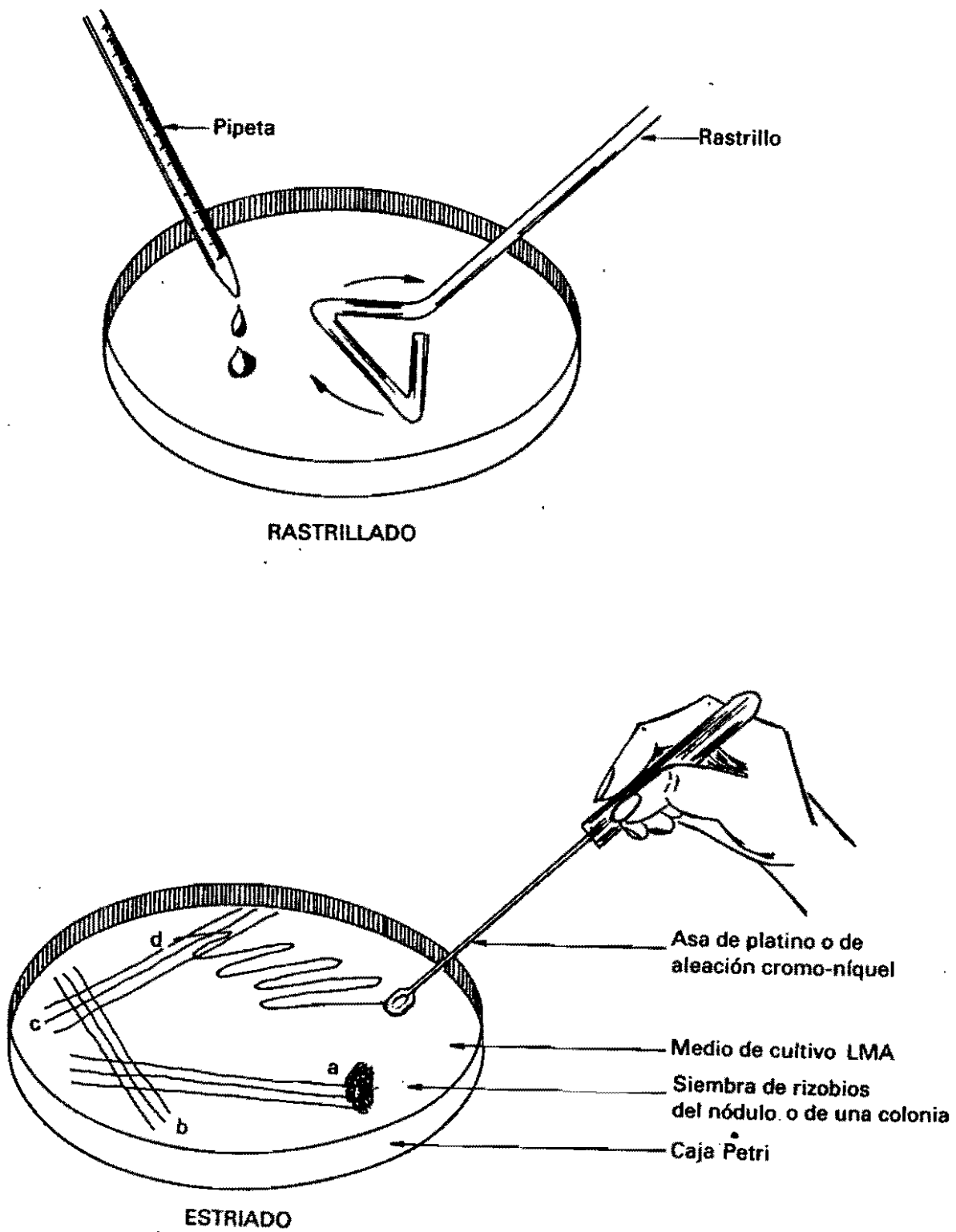


Figura 8. Métodos de estriado y rastrillado para la siembra de cultivos de rizobios.

2.1.2.2 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:

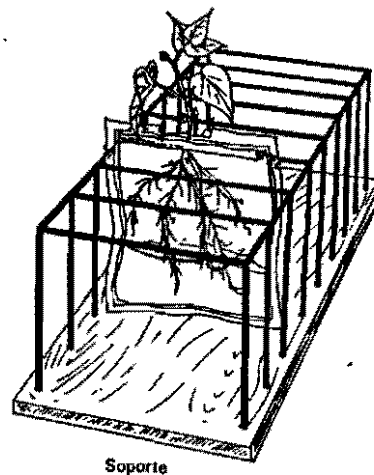
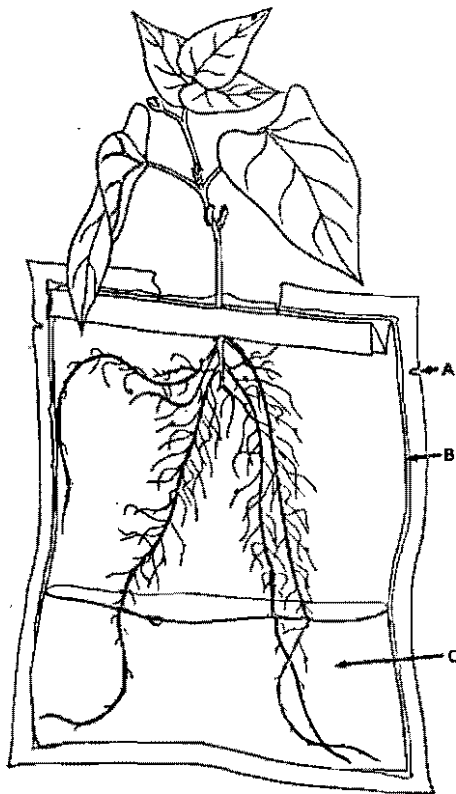
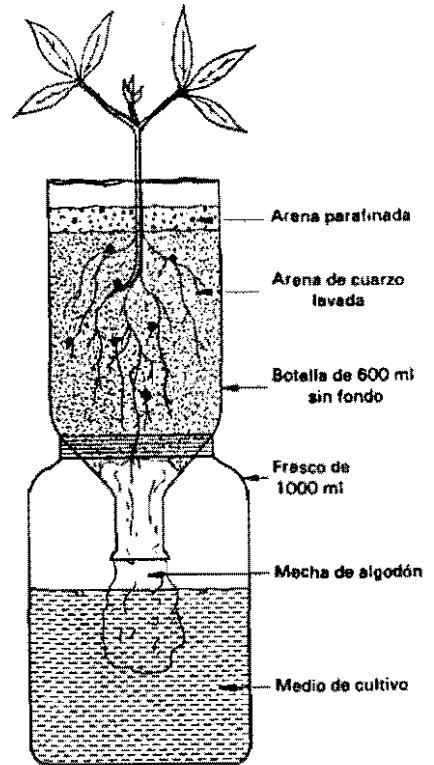
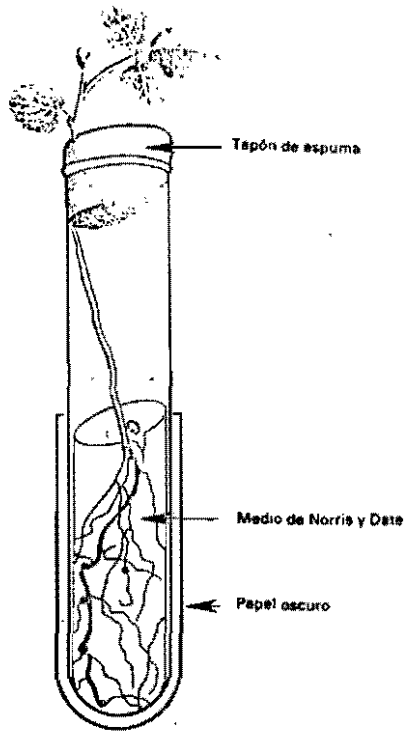
- a. Reacción de Gram
- b. Prueba de ketolactasa
- c. Habilidad para nodular una leguminosa (infectividad)

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 ketolactasa se utiliza para distinguir entre Rhizobium y Agrobacterium. La presencia de ketolactasa 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 9). En estas pruebas no es necesario evaluar el rendimiento de las plantas, sino solamente la presencia o ausencia de nódulos.



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

Figura 9. Dispositivos para evaluar la infectividad de las cepas de rizobios.

2.1.3 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 el rendimiento.

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 importante la evaluación de las cepas en suelo que en medio estéril.

2.1.4 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.

2.1.4.1 Liofilización

La liofilización o desecado en frío es un método ampliamente utilizado

para la preservación de microorganismos. Consiste en un enfriamiento rápido de las cepas hasta temperaturas muy bajas, seguido por una deshidratación rápida mediante sublimación por alto vacío. Se deben usar cultivos de bacterias completamente puros, 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.

2.1.4.2 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 resiembra 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.

2.1.4.3 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.

2.2 PREPARACION Y MANEJO DE INOCULANTES

2.2.1 Función de los inoculantes

Se le llama inoculante a la mezcla de un cultivo de cepas de rizobios 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.

2.2.2 Preparación de los inoculantes

2.2.2.1 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 controlar 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.

2.2.2.2 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. Para preparar inoculantes con base en turba no estéril, se mezcla el caldo con la turba y luego se empaca 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 previene 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.

2.2.3 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 de 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.

2.2.3.1 Recuentos en cajas Petri

Los recuentos en cajas de 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 de Petri, y se hace un recuento en la dilución en la cual las colonias crezcan bien separadas.

2.2.3.2 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 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 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.

2.3 INOCULACION

En casi todos los suelos se encuentran poblaciones nativas de rizobios. Sin embargo, estas poblaciones varían en cantidad, especificidad y efectividad (Figura 10).

2.3.1. 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 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 y evitar la nodulación por las efectivas; 3) las condiciones de estrés pueden modificar la efectividad de la simbiosis cuando una leguminosa crece en condiciones de campo. En consecuencia, es común observar que las leguminosas promiscuas presenten

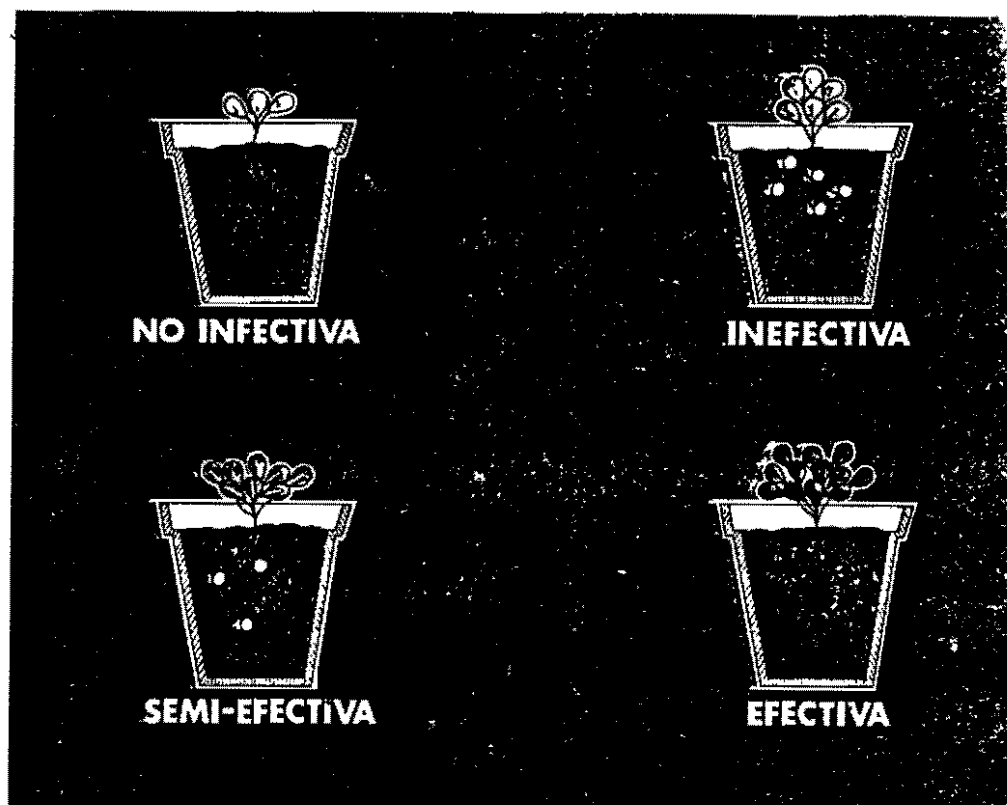


Figura 10. Las cepas no infectivas no forman nódulos con la leguminosa hospedante. Las cepas infectivas pueden establecer una simbiosis inefectiva, semiefectiva o efectiva con la leguminosa hospedante.

nodulación "semiefectiva" con las cepas nativas 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.

2.3.2 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. 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.

2.3.3 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 (1 g) 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 que identifican 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 la 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 no requieren inoculación en el campo. ()

15. La evaluación de la calidad de los inoculantes se realiza para calcular la cantidad que se debe agregar a las semillas. ()
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 ketolactosa se emplea para diferenciar los rizobios de Agrobacterium sp. ()
19. La excesiva demora en sembrar las semillas inoculadas puede causar la muerte de los rizobios debida a desecación ()
20. Cuando se va a aislar rizobios de un nódulo y se desconoce a qué género pertenecen, se debe usar medio de cultivo con varios niveles de pH. ()
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 tenga éxito, las cepas utilizadas deben ser competitivas. ()
24. La prueba de peptona-glucosa se emplea para autenticar cepas de rizobios. ()
25. La inoculación del suelo es un método que ayuda a eliminar la competencia de las cepas nativas. ()

3. EVALUACION AGRONOMICA 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.

3.1 OBJETIVOS, TRATAMIENTOS Y PARAMETROS PARA LA EVALUACION AGRONOMICA

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 agronómicamente 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; 4) necesidad de realizar mejoramiento genético, en el caso de que existan limitaciones en la capacidad de la planta para fijar nitrógeno y 5) efecto de otros factores de manejo agronómico en la simbiosis.

Es necesario establecer condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno 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 los diferentes ensayos 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 medir 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 condiciones definidas 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 de las plantas y, como consecuencia, si se usa el rendimiento como criterio de selección, pueden afectar el potencial de rendimiento de las leguminosas seleccionadas.

3.2 ETAPAS DE LA EVALUACION

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 11.

La etapa I_R corresponde a los trabajos preliminares con rizobios que se describieron en el Capítulo 2. La Etapa I_L corresponde a la evaluación agronómica preliminar, en la cual se evalúa un alto número de accesiones de leguminosas con base en varios parámetros. Si uno de estos parámetros es la capacidad de fijación de nitrógeno, se incluyen los ensayos denominados de "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.

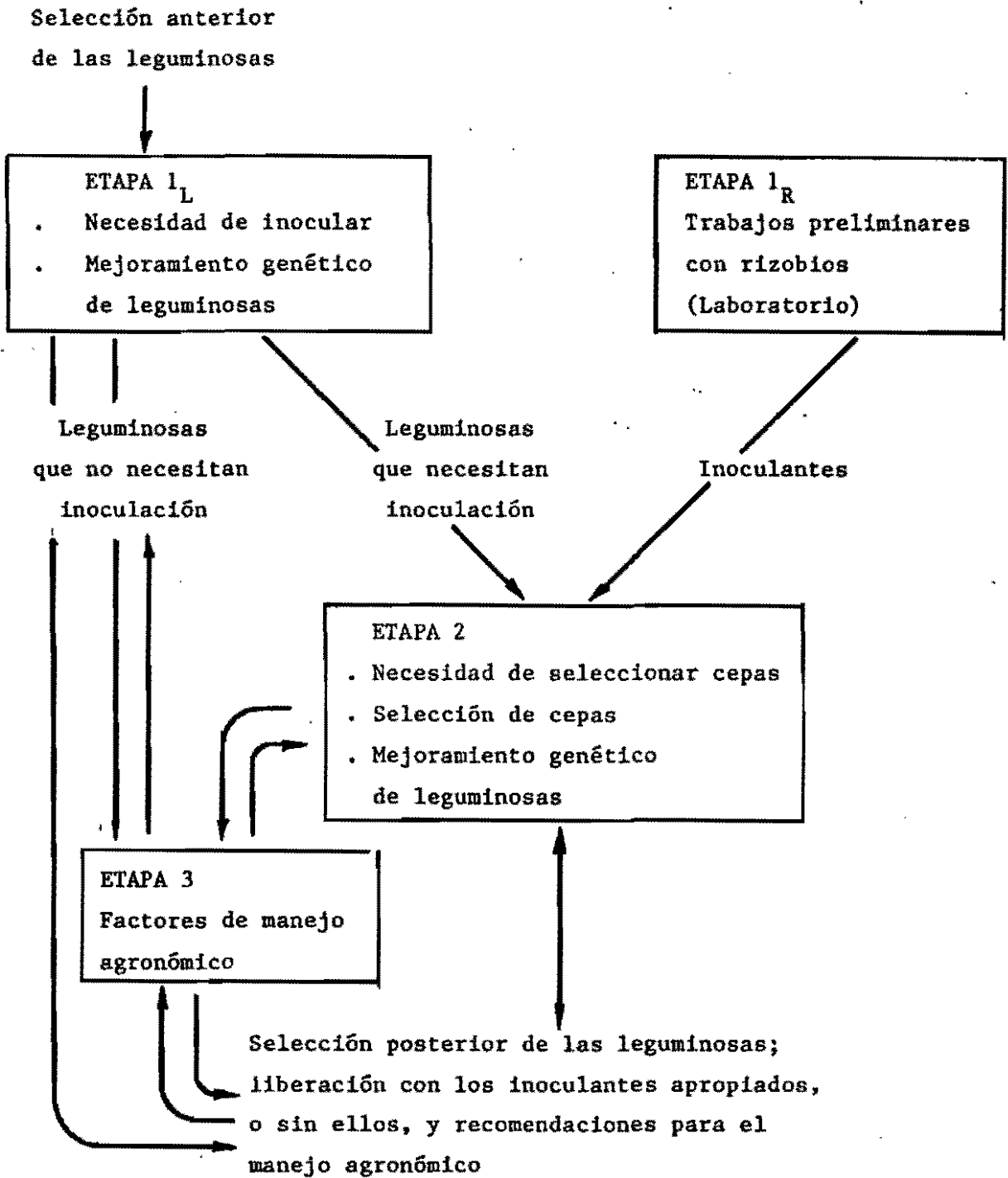


Figura 11. Diagrama de flujo del germoplasma por las distintas etapas de investigación para aumentar la fijación de nitrógeno mediante el manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio.

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.

En la Etapa III se evalúan los efectos de las prácticas de manejo agronómico para 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.

3.2.1 Evaluación de la efectividad de las cepas nativas (Etapa I_L)

En este tipo de evaluación se compara la capacidad genética de un amplio número de leguminosas, 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.

Para este tipo de evaluación 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 12). 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 probablemente 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 las leguminosas B de la Figura 12, 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 las leguminosas C, las plantas que crecen con bajo nivel de N no presentan nódulos y exhiben una fuerte respuesta al N, lo cual indica que no se establece simbiosis 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.

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.

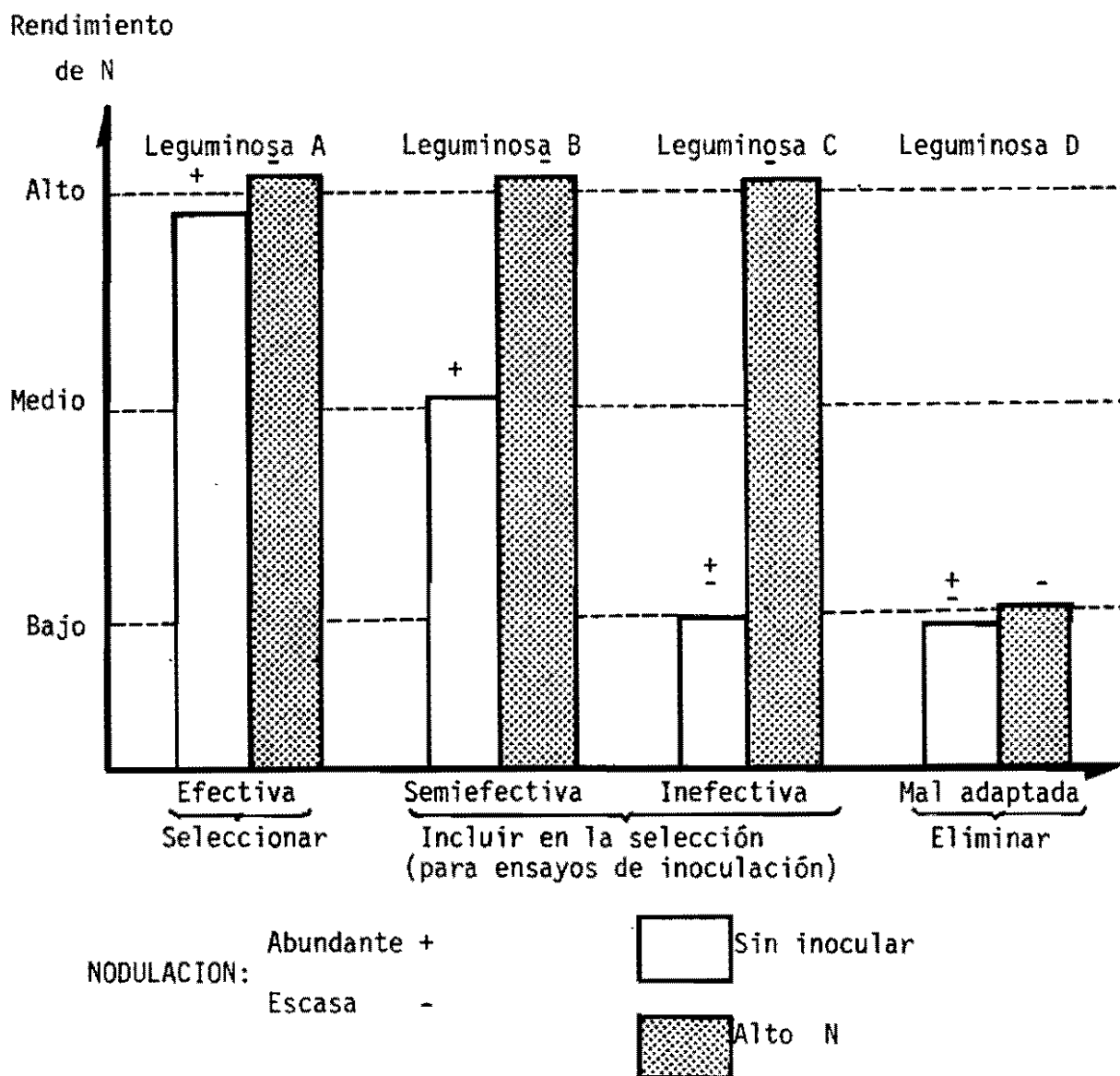


Figura 12. Efectividad de la simbiosis de diferentes especies o líneas de leguminosas con las cepas nativas en una localidad (dos tratamientos).

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 un rango de germoplasma más amplio en cuanto a su potencial de rendimiento con o sin inoculación.

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 13). 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.

3.2.2 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.

En esta etapa 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.

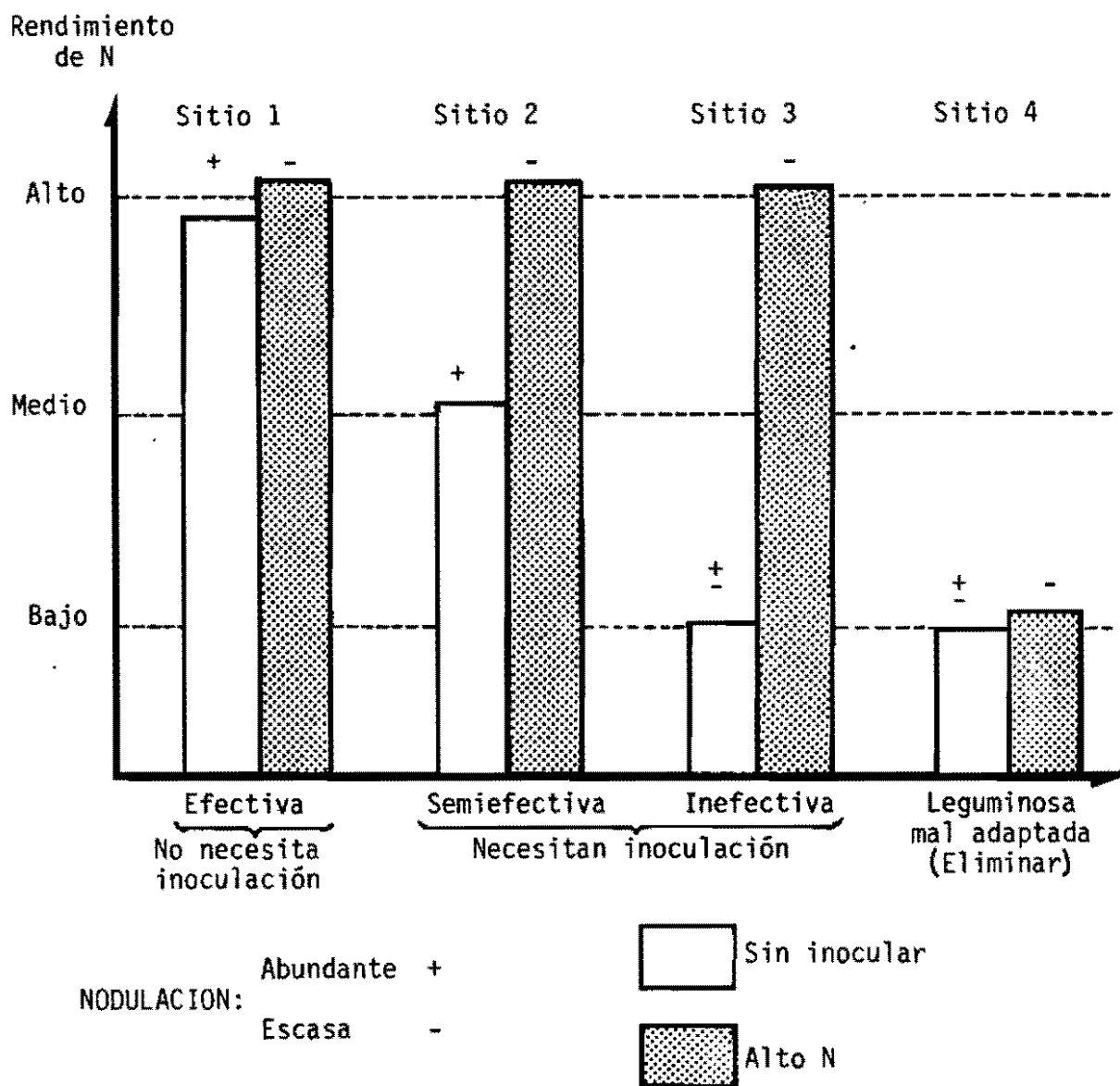


Figura 13. Efectividad de la simbiosis de una misma accesión de leguminosa con cepas nativas en suelos diferentes.

Las leguminosas identificadas en la Etapa I_L que no requieren inoculación no necesitan pasar por la Etapa II. La inclusión de inoculantes en las evaluaciones amplía el rango de germoplasma que se puede considerar como adaptado a las condiciones locales. Como 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.

3.2.2.1 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 14. En el caso A, la leguminosa nodula efectivamente tanto con las cepas nativas, como con la cepa inoculada, haciendo innecesaria la inoculación. El caso B muestra que la cepa utilizada nodula efectivamente, lo cual indica que se ha alcanzado el objetivo de seleccionar la cepa apropiada. 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). 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.

Rendimiento
de N

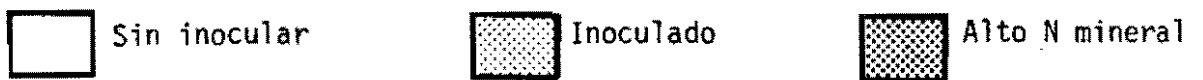
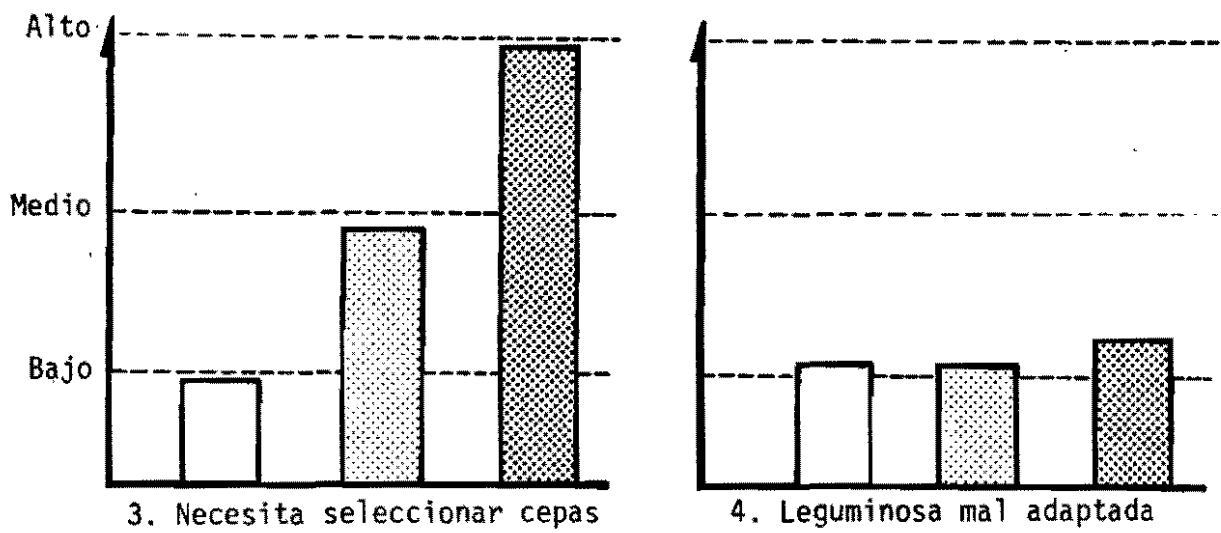
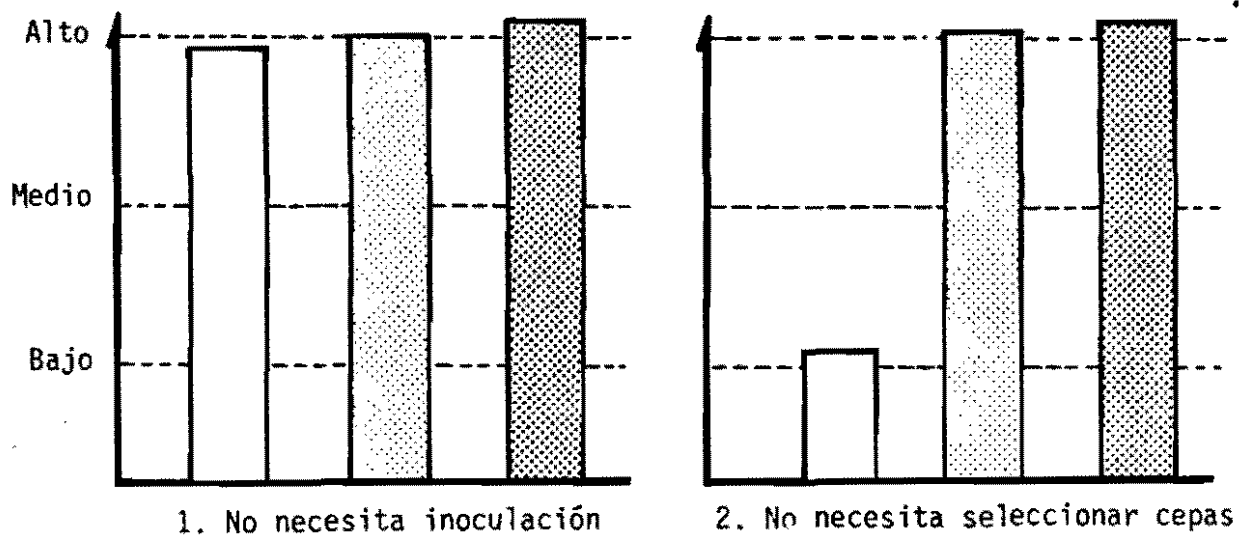


Figura 14. Determinación de la necesidad de seleccionar cepas para una leguminosa, basada en la respuesta a 3 tratamientos (sin inocular, inoculado y alto N).

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 todos los suelos, para determinar si la efectividad de la simbiosis con cada leguminosa varía de un sitio a otro.

3.2.2.2 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.

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 15). 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 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.

mg N en parte aérea

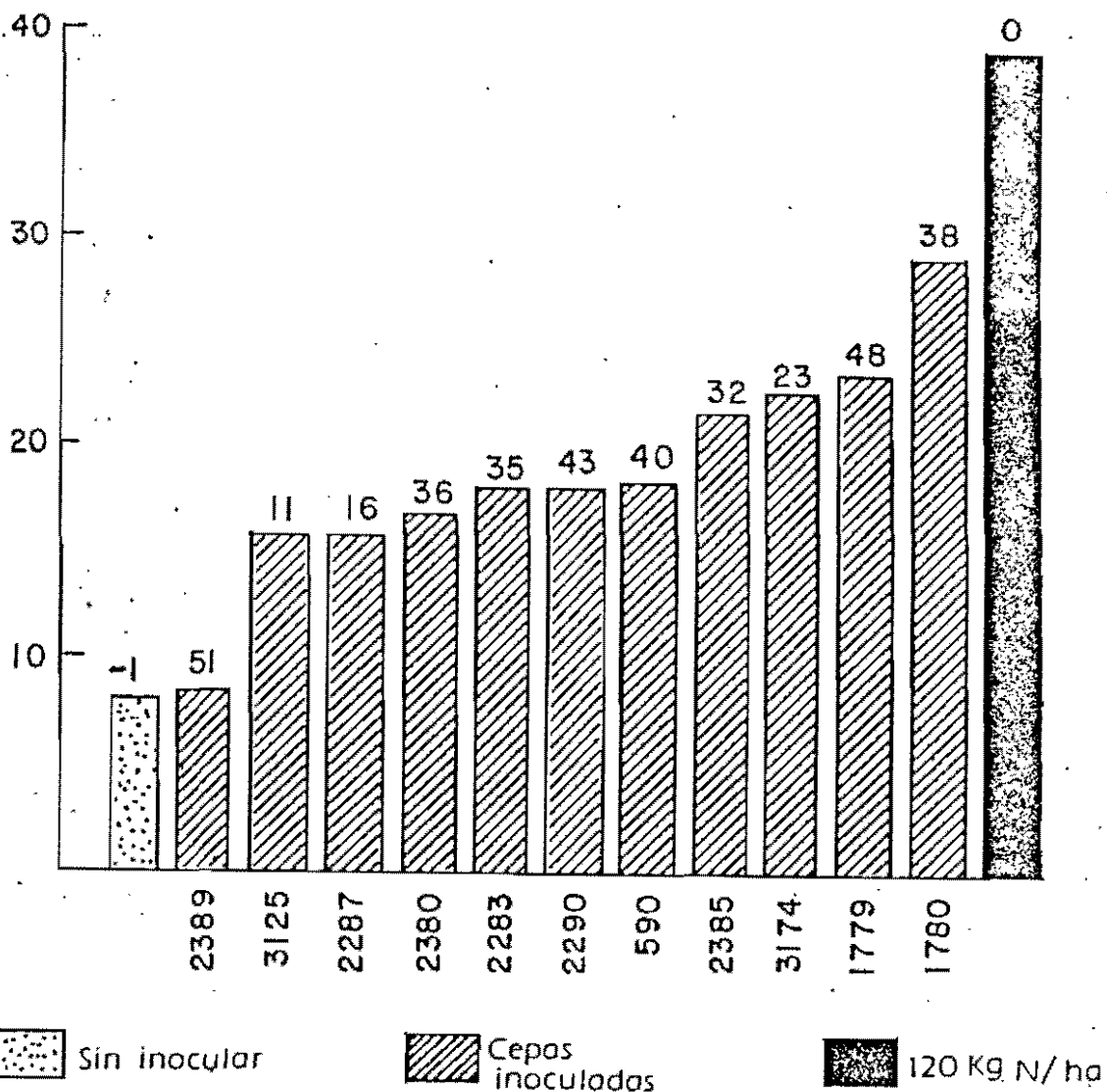


Figura 15. Resultados de un ensayo de evaluación de cepas con un ecotipo de Centrosema macrocarpum, que muestra los incrementos en el rendimiento de N debidos al efecto de cada cepa; el número sobre las barras indica el número de nódulos por cilindro de suelo.

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

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

3.2.2.3. 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 variabilidad genética de la planta en cuanto a su capacidad 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.

3.2.3 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.

3.2.3.1 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.

3.2.3.2 Sistemas de labranza; monocultivo vs. cultivos asociados

Los sistemas de labranza y de siembra probablemente afectan 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.

3.2.3.3 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.

Por ejemplo, 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 16). Aunque no se hacen determinaciones cuantitativas del efecto en la fijación de nitrógeno, se obtiene información relativa muy útil.

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.

Otro aspecto importante que debe estudiarse en esta etapa es el método de inoculación. Es importante adaptar el método de inoculación utilizado para facilitar su adopción por los agricultores. Antes de hacer recomendaciones para los agricultores, es aconsejable realizar un ensayo en el cual se comparen diferentes métodos de inoculación.

3.2.4 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 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.

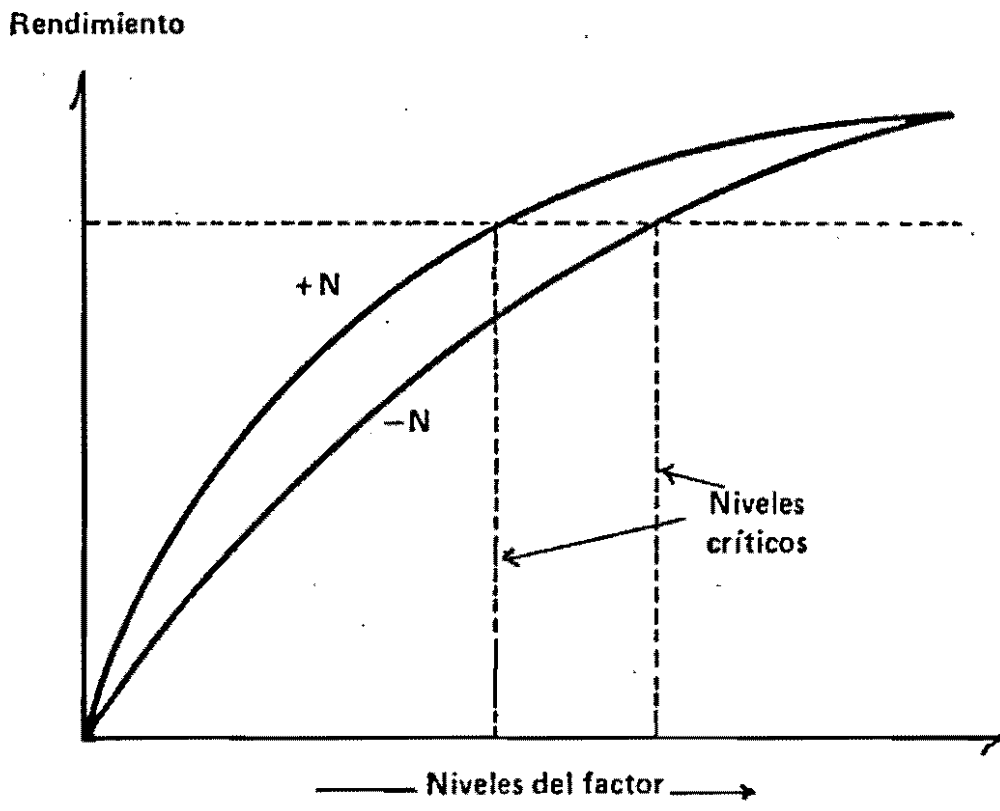


Figura 16. Efecto de un factor nutricional en la fijación de nitrógeno.

3.3 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.

3.3.1 Selección del sitio

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

3.3.2 Invernadero vs. campo

Los tratamientos 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.

3.3.3 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.

3.3.3.1 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 (nativas de las sabanas tropicales) inhiben a los microorganismos nitrificantes, posiblemente debido a la habilidad de estas gramíneas para absorber el nitrógeno en forma amoniacal.

3.3.3.2 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 hacer lo siguiente:

- 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, 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 potes 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 potes de suelo también pueden lavarse con abundante agua para lixiviar el nitrógeno.

En general, los ensayos en potes 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. Los resultados obtenidos en el invernadero siempre deben comprobarse en el campo con tratamientos seleccionados.

3.3.4 Precauciones para evitar contaminación

3.3.4.1 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.

3.3.4.2 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 un área tapada con un 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 pueden hacer zanjas entre las parcelas y dejar calles anchas, las cuales se deben dejar con pasto o sembrar con otro cultivo. Aún tomando todas estas precauciones, es difícil evitar la contaminación a largo plazo.

3.3.5 Muestreos para evaluar nodulación y rendimiento de nitrógeno

3.3.5.1 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 separan todos los nódulos de las raíces y se hace el recuento. Si el recuento no se puede hacer inmediatamente, las raíces 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 nódulos 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 o el instrumento que sea más 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 éste 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.

3.3.5.2 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 el contenido de nitrógeno en el tejido (%) para obtener el valor del rendimiento de nitrógeno.

El método más común para determinar el contenido 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. Las muestras se digieren en H_2SO_4 con catalizador durante una hora a 400°C. Para este análisis, las muestras deben ser secadas, molidas y homogenizadas previamente. El amonio se puede liberar por destilación y determinar bien sea por titulación o colorimétricamente.

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

3.3.6 Análisis de los resultados

En la Etapa I_L , en la cual se compara un alto número de leguminosas con dos tratamientos, se analiza por separado el rendimiento de nitrógeno para cada tratamiento, obteniendo así, el cambio de orden de las leguminosas con y sin tratamiento. Además, se calcula la respuesta de cada leguminosa al nitrógeno (pérdida de rendimiento debida a la falta de fertilización nitrogenada) y se comparan las respuestas al nitrógeno usando el análisis de varianza.

Los datos de rendimiento de nitrógeno pueden analizarse separadamente para cada corte o para cortes o muestreos sucesivos en el tiempo. La diferencia entre los tratamientos a través de los muestreos se puede

precisar mediante un análisis de varianza (ANDEVA) en forma factorial, utilizando el parámetro "índice de respuesta al nitrógeno" (IRN):

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

Luego se comparan las respuestas al nitrógeno utilizando el análisis de varianza.

En la Etapa II, en la cual se comparan varias cepas, se analiza el aumento en rendimiento debido a la inoculación, siempre haciendo comparaciones con el testigo sin inocular. En los análisis estadísticos de los ensayos de selección de cepas, no se incluye el testigo fertilizado con nitrógeno, porque el objetivo de este tratamiento es solamente identificar los casos en los que el nitrógeno no es el factor limitante.

Para evaluar los datos de rendimiento de la Etapa II, se utiliza un análisis factorial cuando el ensayo se ha realizado con un diseño de parcelas divididas, como por ejemplo, niveles de fósforo en la parcela principal y dos tratamientos (con y sin inoculación) en las subparcelas.

En este caso, y en ensayos de campo en los que se han realizado varios cortes, la interpretación de los resultados se facilita mucho si los aumentos debidos a la inoculación se expresan en términos porcentuales, para lo cual se utiliza el Índice de Efectividad de Inoculación (IEI).

$$\text{IEI} = \frac{(\text{rend. de N con inoculación} - \text{rend. de N sin inoculación})}{\text{rendimiento de N con inoculación}} \times 100$$

El uso del IEI permite hacer una comparación estadística entre cortes, lo cual no es posible con los datos de rendimiento, porque el rendimiento de cada corte incluye el rendimiento en cortes anteriores. Además, elimina un factor (la inoculación) en los ensayos del tipo Etapa III, simplificando la interpretación de los datos.

Actualmente se están desarrollando métodos para el análisis estadístico de datos cualitativos de la nodulación (color y distribución), basados en una adaptación de la prueba de "chi cuadrado". Las leguminosas se pueden agrupar según las combinaciones de la distribución de los niveles de evaluación dentro de cada parámetro. Para los datos cuantitativos (número y peso de nódulos por planta) se puede usar el análisis de varianza.

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 "Manual para la Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-rizobio para Incrementar la Fijación de Nitrógeno".

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	Tipos de ensayo	Tratamientos utilizados	Resultados esperados
I				
L				
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, ya que las selecciones generalmente son específicos para cada localidad. ()
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 potes) 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 en los casos en que no es factible aplicar la tecnología de inoculación y el germoplasma no nodula 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 potes 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 preservadas adecuadamente. ()
19. El máximo potencial de fijación de nitrógeno de la simbiosis se expresa en condiciones de baja disponibilidad de N mineral. ()
20. El rendimiento de N en el tejido es una medida cuantitativa del N fijado por las leguminosas. ()

BIBLIOGRAFIA Y LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- APPLEBY, C.A. (1974). Leghemoglobina. In: Quispel, A. (ed.) The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Co, American Elsevier. pp. 521-554.
- BARTHOLOMEW, W.V. (1985). 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). Mineralisation 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.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1986. Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo. En prensa.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). (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, NifTAL 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. 321^{AL}. 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.
- NIFTAL (1984). The Rizobium germplasm resource at NIFTAL. Catalogue of Strains.
- QUISPTEL, 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 N_2 -fixation in the field using ^{15}N -labelled fertilizer: some problems and solutions. Soil Biol. Biochem. 15: 631-639.