

34369



Simbiosis Leguminosa-Rizobio

Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico

Recopilado por:

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



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



Centro Internacional de Agricultura Tropical

17 MÉTODOS PARA EVALUAR LA NODULACION

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

17.1 Leguminosas forrajeras tropicales

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

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

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

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

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

.1 Consideraciones generales sobre los parámetros que se evalúan

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

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

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

.2 Toma de las muestras

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

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

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

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

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

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

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

.3 Métodos para hacer las evaluaciones

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

a. Abundancia

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

b. Tamaño

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

c. Distribución

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

PARAMETROS PARA LA EVALUACION DE LA NODULACION

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

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

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

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

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

FECHA DE EVALUACION: _____

ENSAYO No. _____

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

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

d. Color interno

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

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

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

.4 Análisis de los datos

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

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

Tratamientos donde 50% de las plantas tienen:

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

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

17.1.3 Evaluación de la nodulación en una pradera establecida

Escoger un sitio de la pradera donde la cobertura de la leguminosa sobrepase el 60%. Estimar el porcentaje de cobertura de la leguminosa utilizando un marco de 1 m^2 dividido en cuadros de 20 por 20 cm, según una escala de 1 a 4 para cada cuadro. Luego, con un barreno de 7 cm de diámetro (Figura 17.3) que se introduce en el suelo a golpes de martillo, sacar una muestra de suelo de cada línea de cinco cuadros del marco, cada una de una columna diferente (Figura 17.4).

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

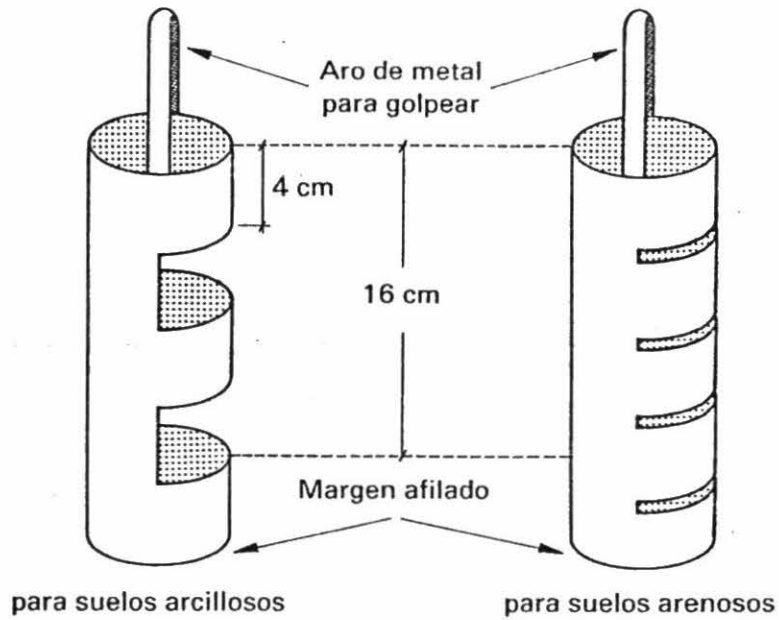


Figura 17.3. Barreno para extraer las muestras de suelo para evaluar la nodulación en praderas.

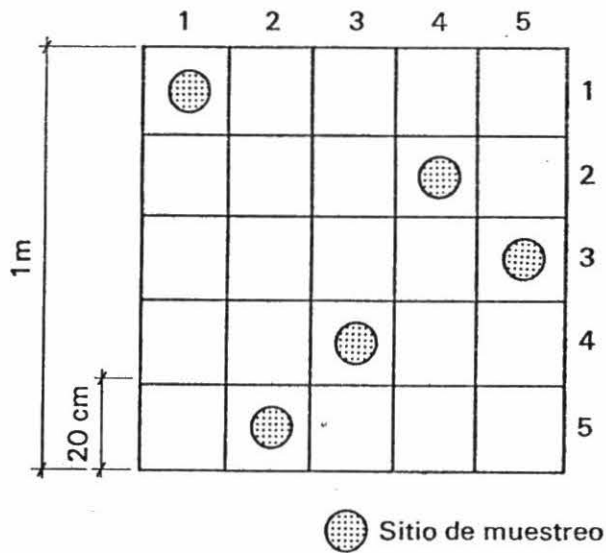


Figura 17.4. Plano de muestreo para obtener muestras de suelo.

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

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

17.2 Frijol y otras leguminosas de grano

17.2.1 Evaluación de la nodulación en ensayos de invernadero

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

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

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

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

17.2.2 Evaluación de la nodulación en el campo

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

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

.1 Nodulación temprana

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

.2 Evaluación en mitad del período de floración

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

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

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

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

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

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

a. NR = nódulos rojos; C = categoría.

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

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

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

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

.3 Senescencia tardía de los nódulos

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