



~~MÉTODOS~~ USADOS EN EL CIAT
PARA ESTUDIAR LA RHIZOBILOGIA DE LEGUMINOSAS
FORRAJERAS TROPICALES *

CIAT
BIBLIOTECA

Rosemary Sylvester Bradley

6867

15 SET. 1994

CIAT- Cali-Colombia

Julio 1983

* Este trabajo será revisado periódicamente. Por favor solicitar la versión más reciente.

CONTENIDO

Página

- 1 Recolección de nódulos para posterior aislamiento de Rhizobium.
- 4 Datos necesarios para la historia de los nódulos enviados a CIAT para aislamiento.
- 5 Aislamiento de la rhizobia de los nódulos.
- 6 Medio de cultivo BYMA.
- 7 Caracterización de colonias de Rhizobium después de 15 días de incubación en BYMA.
- 8 Preparación de tubos con Siratro para pruebas de nodulación.
- 9 Medio de Norris.
- 10 Sistema para evaluación de cepas de Rhizobium en suelos no perturbados.
- 13 Fertilización de cilindros de suelo no perturbado de Carimagua para selección de cepas de Rhizobium.
- 14 Inoculación de semillas de leguminosas forrajeras (resumido)
- 15 Instrucciones para la inoculación de semillas de leguminosas forrajeras tropicales con Rhizobium.
- 19 Método para evaluación de nodulación de leguminosas forrajeras en praderas.
- 20 Método para evaluación de nodulación plantas individuales de leguminosas forrajeras.
- 21 Cálculos para reducción de acetileno.
- 22 Método para evaluar la respuesta a inoculación en el campo.

DATOS NECESARIOS PARA LA HISTORIA DE LOS NODULOS ENVIADOS A CIAT PARA

AISLAMIENTO

Seccion Microbiología de Suelos, Pastos Tropicales - CIAT -

Cali-Colombia

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

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

P.D.: Para la recolección de los nódulos por favor seguir las instrucciones "Recolección de nódulos para posterior aislamiento de Rhizobium"

RECOLECCION DE NÓDULOS PARA POSTERIOR AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM

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

Un nódulo muerto es más esponjoso y su color interno es negro u oscuro. Los nódulos vivos pero inactivos tienen un color interno verde o blanco.

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

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

La localización de los nódulos en el sistema radical depende de la especie de planta. En algunas especies los nódulos son muy profundos o están solamente localizados en las raíces laterales y muy alejados de la raíz principal. Generalmente es más fácil encontrar nódulos en plantas jóvenes de 2-3 meses de edad. Sin embargo en la mayoría de las especies de uso agronómico se pueden conseguir nódulos fácilmente cavándose cuidadosamente alrededor de la raíz principal con una navaja o implemento similar. No se debe arrancar la planta porque es muy probable que así la ligación frágil de los nódulos con la raíz se romperá y se dejarán la mayoría de los nódulos en el suelo.

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

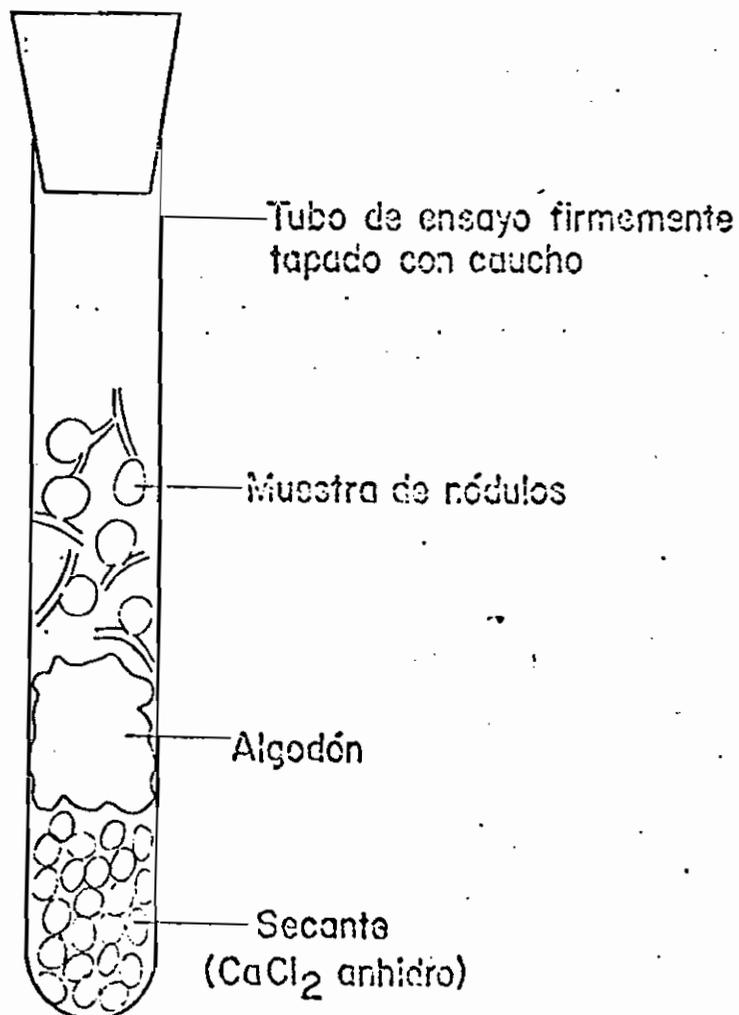
Siempre es mejor dejar una raicita fija en el nódulo para facilitar su manejo durante el aislamiento del Rhizobium. Luego después de colocar los nódulos en el frasco de vidrio se deben tapar para que empiece el proceso de desecamiento. Entre más rápido se sequen los nódulos mejor. Si aparece agua de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

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

El aislamiento de Rhizobium tiene más probabilidad de éxito durante las primeras dos semanas después de la recolección de los nódulos.

Se recomienda, entonces, no recolectar los nódulos mucho antes de establecer las condiciones requeridas para mandarlos al laboratorio.

PRESERVACION DE NODULOS PARA POSTERIOR AISLAMIENTO DE *RHIZOBIUM*



DATOS NECESARIOS PARA LA HISTORIA DE LOS NODULOS ENVIADOS A CIAT PARA

AISLAMIENTO

Seccion Microbiología de Suelos, Pastos Tropicales - CIAT -

Cali-Colombia

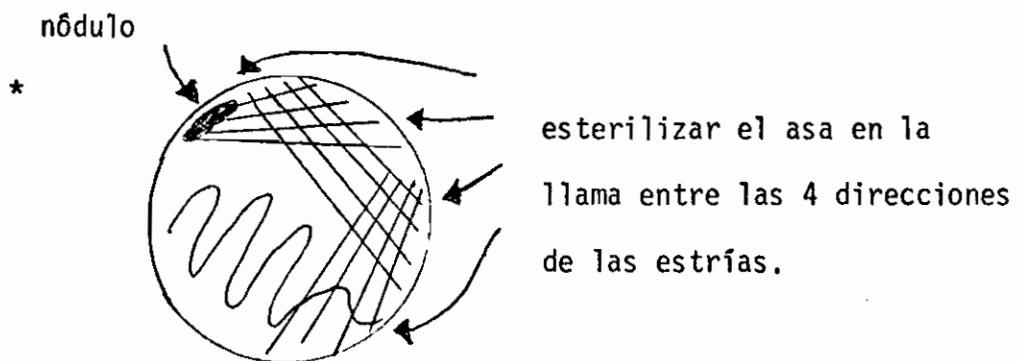
Es muy importante enviar el máximo posible de información sobre los nódulos. Se solicita adaptar la siguiente información, según el caso específico.

1. Fecha de recolección de los nódulos
2. Planta hospedera (si disponen de semilla para ensayos posteriores. Si es económicamente importante).
3. Procedencia (País, Departamento, Ciudad, Pueblo, Hacienda)
4. Clima (Lluvia, temperatura, tiempo y meses de estaciones)
5. Colector
6. Características de la planta (Tamaño y color con relación a otras de la misma especie, si es una planta aislada o varias en grupo /pradera).
7. Características del nódulo (Tamaño, forma, superficie, color)
8. Nodulación abundante, regular, esparcida.
9. Plantas inoculadas (con qué cepa?)
10. Plantas no inoculadas
11. Características de la vegetación (pradera, sabana con arbustos, sabana con árboles, sabana inundable, potrero, lado de la carretera, disturbado, natural, experimento (especificar), selva, plantación, selva desmontada y re sembrada , etc.
12. Características del suelo (humedad, pH estimado o medido (especificar), fertilización, arcilloso, arenoso, fertilidad natural alta, media, baja etc.).

P.D.: Para la recolección de los nódulos por favor seguir las instrucciones "Recolección de nódulos para posterior aislamiento de Rhizobium"

AISLAMIENTO DE LA RHIZOBIA DE LOS NODULOS

1. Si los nódulos son recogidos en el campo, es mejor dejarlos en tubos que contengan gel-silica y CaCl_2 , hasta que los rhizobios puedan ser esterilizados y aislados.
2. Antes de esterilizar los nódulos deben dejarse una o dos horas en agua estéril para que estos absorban el agua y suelten la suciedad. Sumergirlos en alcohol puro durante un minuto aproximadamente.
3. Cambiar los nódulos a una solución 0.1% HgCl_2 (HgCl_2 1 gramo; conc. HCl 5 ml, agua: un litro) dejándolos 3-4 minutos, con algunas agitaciones. Alternativamente puede usarse una solución 3-5% H_2O_2 .
4. Lavar los nódulos cinco veces con agua estéril.
5. Abrir un nódulo en una caja de petri que contenga medio de cultivo BYMA y estriar el medio con una asa de platina* .
6. Guardar los Platos 3-15 días a 28°C .
7. Volver a subcultivar para conservar la cepa.



MEDIO DE CULTIVO BYMA

10 g manitol

100 ml agua de levadura*

0.5g K_2HPO_4

0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.2 g NaCl

0.01 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

0.2g $CaCl_2$

15 g Difco Bacto agar

5 ml solución de indicador**

completar a 1000 ml con agua destilada, autoclavar y corregir el pH a 6.8
5.5 o 4.5 con HCl o NaOH estéril.

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

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

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

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

CARACTERIZACION DE COLONIAS DE RHIZOBIUM DESPUES DE 15 DIAS DE INCUBACION

EN BYMA (sólo para productores de alcalinidad).

- A. POCO o ningún crecimiento
- B. Colonias pequeñas o medianas aparentemente puras (especificar diámetro, apariencia y textura (secas, gomosas y cremosas).
- C. Colonias pequeñas o medianas que son inconsistentes pero podrían ser puras, porque no hay diferencias entre colonias. La goma no es líquida y las colonias son más opacas que en H. (Entre B y H).
Ca. C con poca inconsistencia donde hay más crecimiento..
- D. Muchas colonias pequeñas con pocas grandes transparentes separadas.
- E. Muchas colonias pequeñas con pocas grandes transparentes no separadas.
Ea. E con más colonias grandes transparentes no separadas. No llega a ser H ni Ha.
- F. Colonias pequeñas y grandes separadas y diferentes, en mas o menos igual proporción.
- G. Muchas colonias grandes con pocas pequeñas y diferentes separadas.
- H. Colonias conteniendo goma e inconsistencias no simétricas y no separadas. La apariencia puede ser casi consistente pero en este caso la goma es líquida.
Ha. H con colonias diferentes por causa de edad o que todavía no se han definido como diferentes.
- I. Colonias conteniendo goma e inconsistencias no simétricas y no separadas. Algunas cubren todo el medio.
Ia. I donde las inconsistencias se ven como colonias bien definidas dentro de la goma.

PREPARACION DE TUBOS CON SIRATRO* PARA PRUEBAS DE NODULACION

Método de HgCl₂ acidificado

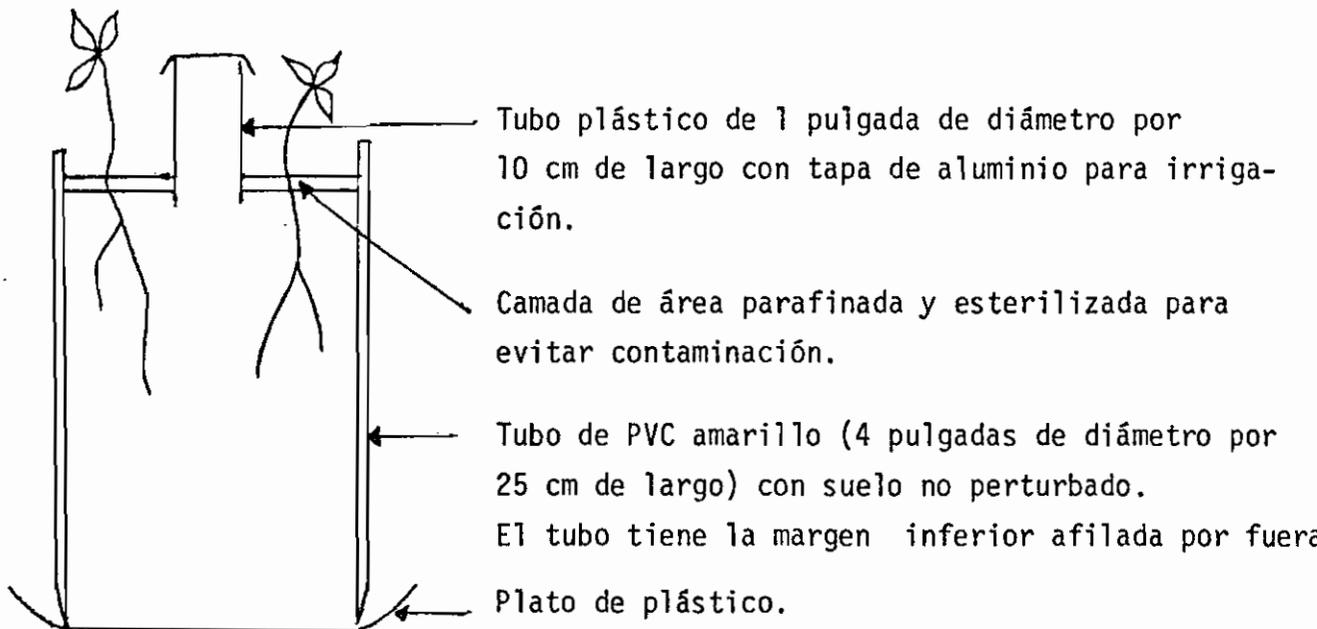
1. Poner las semillas en un tubo o en un frasco adecuado (no olvidar que las semillas van a embeber y a crecer después de ser esterilizadas). Corrientemente sirve un tubo de rosca.
2. Cubrir las semillas en etanol a 95%, 3 minutos agitando el tubo durante este tiempo.
3. Después de vaciar el etanol llenar de nuevo con HgCl₂ acidificado, (HgCl₂ 1 gramo HCl conc. 5 ml agua destilada 500 ml). Agitar periódicamente durante 3 minutos y después vaciar el HgCl₂. Tomar precauciones para asepsia.
4. Lavar 5-6 veces con agua estéril.
5. Hacer un corte pequeño en la testa de cada semilla con un bisturí esterilizado.
6. Asepticamente traspasar las semillas hasta un plato de Petri que contiene dos láminas de papel de filtro todo estéril o para dextrosa agar (PDA).
7. Dejar las semillas 24-48 horas para que germinen.
8. Trasplantar una semilla por tubo de medio Norris y dejar crecer 5-7 días para luego inocular con 1 ml de suspensión del cultivo a ser probado, dejando que la parte aérea salga por un lado del tapón.
9. Dejar crecer 4 semanas en una cámara con luces y temperatura de 25-30°C. Evaluar la nodulación.

* La semilla debe ser recién cosechada

MEDIO DE NORRIS

	Stock (g/l)	ml Stock/l de medio
1- KCl	29.8	2.5
2- K_2HPO_4	4.35	2.5
3- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	98.6	2.5
4- Micronutrientes:		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.978	} 0.5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.022	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.03	
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.01	
H_3BO_3	1.43	
5- Citrato Ferrico	1.43	1.0
6- Disuelva y adicione	0.068 g/l de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	
7- Completar a 1000 ml con agua destilada.		
8- Adicionar 10 g. de agar/l de medio para medio Neutro (pH 6.8)		
9- Adicionar 20 g. de agar/l de medio para medio ácido (pH 4.5)		
10- Distribuir en tubos en tubos ensayo con tapas de espuma, y autoclavar.		
Dejar solidificar en posición vertical o inclinado.		

SISTEMA PARA EVALUACION DE CEPAS DE RHIZOBIUM EN SUELOS NO PERTURBADOS



Se puede usar este sistema en experimentos donde se quiere comparar tratamientos con diferentes cepas de Rhizobium con un testigo sin inoculación y sin nitrógeno y otro testigo con nitrógeno. La ventaja de usar suelo no perturbado es que la perturbación del suelo puede causar un aumento en la tasa de mineralización resultando la liberación de nitrógeno mineral, que puede inhibir la nodulación. Otros cambios causados por la perturbación pueden afectar la respuesta a la inoculación también.

Se introducen los cilindros por golpeo en el suelo del sitio seleccionado, protegiendo el cilindro con un pedazo de madera, y sacándolo con una pala. Se puede irrigar el suelo antes, en el caso de ser demasiado duro, pero cuidando de que el agua se distribuya igualmente en el área que será

muestrada, Los cilindros se introducen en el suelo hasta aproximadamente 2 cm. de su margen superior, dejando así espacio suficiente para la arena parafinada. Se pueden dejar los cilindros enterrados en el sitio y sacarlos luego antes del experimento, para que se conserven bajo condiciones naturales. Antes de empezar en ensayo se debe pesar cada uno y determinar la humedad del suelo de algunos cilindros. Se dividen los cilindros en 5 grupos, cada grupo de un rango de peso. Cada grupo forma un bloque del ensayo. Se deben cubrir los cilindros con un plato o algo parecido para evitar contaminación por Rhizobium hasta que se plante el experimento. Se deben mantener los cilindros en capacidad de campo, con agua libre de contaminación, y pesándolos periódicamente durante el ensayo.

Para montar el experimento se plantan las semillas inoculadas y recubiertas con la misma metodología que se usaría en el campo, pero teniendo cuidado de que se proporcione mas o menos el mismo número de células de Rhizobium por semilla en todos los tratamientos. Se deben aplicar un mínimo de 300 células por semilla y se puede aumentar esta cantidad hasta 5000 células por semilla. Alternativamente se pueden sembrar semillas pregerminadas, poniendo el inoculante (aprox 0,5g) debajo de cada semilla.

Se aplican los niveles de nutrientes recomendados, revolviendo los primeros 5 centímetros del suelo. La primera aplicación de nitrógeno se aplica dos semanas después de la germinación a través del tubo de irrigación. Se divide la aplicación de nitrógeno, por ejemplo en el caso de tener dos testigos con la aplicación de 75 y 150 kg N ha⁻¹ durante un experimento de

más o menos 3 meses de duración, se podría aplicar el equivalente de 15 y 30 kg N ha⁻¹ respectivamente, cada dos semanas durante las 10 primeras semanas del experimento. Se debe tener cuidado de que la cantidad de solución aplicada no sea tan grande que se encharque el suelo, y siempre igualizar con agua los pesos de los tratamientos que no reciben N.

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

Al final del experimento se evalúa el peso seco y contenido de nitrógeno de la parte aérea, y la nodulación por número, peso seco, o por categorías (ver hoja anexa), dependiendo del tamaño de los nódulos. Se puede expresar la eficiencia de las cepas como aumento del nitrógeno de la parte aérea con relación al testigo sin nitrógeno.

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

* Arena parafinada : Se prepara la arena parafinada así : Se disuelven 4g de parafina sólida en 100 mls de benzol, y se mezclan vigorosamente con 1 kg. de arena de cuarzo seca. Una vez evaporado el benzol, se esteriliza la arena durante dos horas en un horno de aire caliente a 160°C, en frascos tapados.

FERTILIZACION DE CILINDROS DE SUELO NO PERTURBADO DE CARIMAGUA PARA SELECCION
DE CEPAS DE RHIZOBIUM

Elemento	Kg/ha	Fuente	Kg fuente/ha	mg/cilindro (88.3 cm ²)
* { Ca	60	roca fosfórica Huila	150	133
P ₂ O ₅	33			
* { Ca	61	Calfos	165	146
P ₂ O ₅	25			
** S	43	-	-	-
*** { K ₂ O	20	K ₂ SO ₄	37	32
Mg	10	MgSO ₄ ·7H ₂ O	103	90
Zn	5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22	19.4
Cu	1	CuSO ₄ ·2H ₂ O	3.9	3.5
B	0.5	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	4.3	3.8
Mo	0.4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.88	0.8
**** N	30	urea	65.2	58

* Mezclado con 5,0g suelo molido/cilindro y aplicado con salero.

** Se aplica el S con el K (13.58 kg/ha), Mg (26.66), Zn(2.45) y Cu (0.01).

*** Se aplica dos veces, una en la siembra y otra después de aproximadamente 6 semanas. Estas dos aplicaciones son equivalentes a 182 kg sulpomag/ha.

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

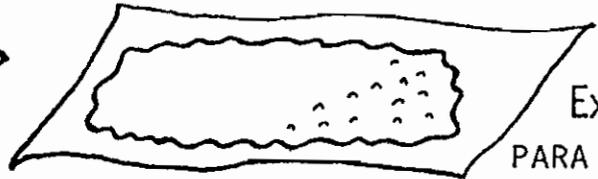
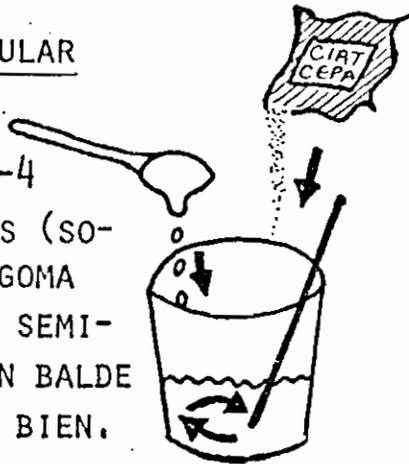
1. SI LAS SEMILLAS ESTAN TRATADAS CON FUNGICIDAS, LAVAR Y SECARLAS.

2.  PREPARAR UNA SOLUCION DE GOMA ARABIGA EN AGUA CALIENTE (1 POCILLO GRANDE DE AGUA CON 80 G DE GOMA) UN DIA ANTES DE LA SIEMBRA.

EL DIA DE LA SIEMBRA :

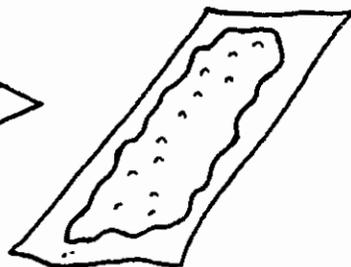
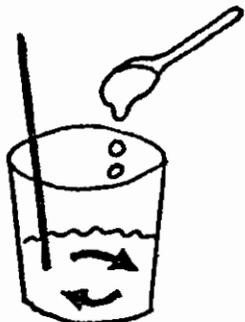
3. INOCULAR AGREGAR 50 G INOCULANTE ESPECIFICO POR KG DE SEMILLAS Y MEZCLAR BIEN.

AGREGAR 1-4 CUCARADAS (SOPERAS) DE GOMA POR KG DE SEMILLAS EN UN BALDE Y MEZCLAR BIEN.



EXTENDER PARA SECAR EN LA SOMBRA 5-10 MINUTOS.

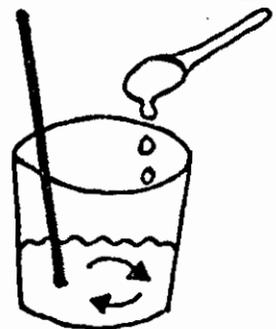
4. 2A. CAPA DE GOMA



EXTENDER PARA SECAR 5-10 MINUTOS.



5. PELETIZACION



DEVOLVER AL BALDE, AGREGAR OTRA DOSIS DE GOMA. MEZCLAR.

DEVOLVER AL BALDE Y MEZCLAR CON OTRA DOSIS DE GOMA.



SECAR OTRA VEZ 20 MINUTOS.



6. SIEMBRA

SEMBRAR LO MAS PRONTO POSIBLE (EN MENOS DE 12 HORAS).

ADICIONAR 200-400 G DE ROCA FOSFORICA CON OXIDO DE MOLIBDENO POR KG SEMILLA, Y MEZCLAR MUY SUAVEMENTE CON LA MANO, ROTANDO EL BALDE PARA RECUBRIR LAS SEMILLAS.

SECCION DE MICROBIOLOGIA DE SUELOS, PASTOS TROPICALES - CIAT -

Junio de 1983

INSTRUCCIONES PARA LA INOCULACION DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS
TROPICALES CON RHIZOBIUM

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

Se llama de "inoculante" la mezcla de un cultivo de la cepa de Rhizobium seleccionada para la leguminosa a ser sembrada con turba (un suelo con alto contenido de materia orgánica) molida (malla #100), u otro soporte. Se puede aplicar el inoculante pegándolo en la semilla o directamente en el suelo. Aquí solamente consideraremos la inoculación de la semilla. CIAT puede suministrar pequeñas cantidades de inoculantes para ensayos. Se espera que en el futuro próximo se montará una planta productora de inoculantes en Bogotá.

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

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

Se puede inocular la semilla simplemente mezclando el inoculante con a-

gua y agregándolo a la semilla, pero el número de Rhizobium/semilla y su sobrevivencia es mucho mayor si se pega el inoculante en la semilla con un adhesivo y si se cubre la semilla inoculada con un material protector como roca fosfórica o cal. Este proceso se llama "peletización" y el recubrimiento se llama "pelet". Para la peletización de la mayoría de las leguminosas forrajeras tropicales se usa la roca fosfórica.

Para mejorar la respuesta a la inoculación se puede agregar MoO_3 a la roca fosfórica en una proporción de 1:3. No se debe utilizar Na_2MoO_4 como fuente de Mo en el pelet, porque es tóxico cuando entra en contacto directo con el Rhizobium.

El pegante más apropiado es la goma arábiga comercial, disponible en cualquier droguería. También se puede usar una solución a 5% de metilcelulosa. Ni azúcar ni leche son adecuados como pegantes.

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

INSTRUCCIONES

1. Preparación de la semilla

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

2. Preparación de la goma

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

3. Inoculación

En el día de la siembra o la noche anterior, se deben poner las semillas en un balde o recipiente similar, y agregar un volumen de la solución de goma arábiga, suficiente para que se cubran todas las semillas pero que no sean demasiado húmedas. La cantidad de goma necesaria para 1 kg. de semillas varía de 10 ml. para semillas grandes a 40 ml. para semillas pequeñas o rugosas (1-4 cucharadas tamaño soperas).

Revolver bien y agregar inmediatamente 50g inoculante específico/kg semilla (ver Tabla 1). Mezclar vigorosamente para que el inoculante se distribuya uniformemente entre las semillas. Las semillas deben despegarse una de la otra cuando se adiciona el inoculante.

Cuando el inoculante forma grumos y las semillas se mantienen pegadas una en la otra, es debido al exceso de goma. Extender las semillas en la sombra durante 5-10 minutos para secarlas.

4. Agregar segunda capa de goma

Devolver las semillas al balde y agregar una segunda dosis de goma, revolver bien, y extender para secar.

5. Peletización

Devolver las semillas al balde, agregar una tercera dosis de goma, revolver bien, y adicionar inmediatamente 200-400 g/kg semillas (la cantidad depende del tamaño de las semillas), de la mezcla de 1:3 de MoO_3 con roca fosfórica. Revolver el recipiente muy suavemente, para que forme una capa firme encima de cada semilla. Una semilla bien peletizada se ve completamente cubierta por la roca fosfórica.

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

6. Siembra

Evitar guardar las semillas peletizadas más de 12 horas antes de la siembra, pues el Rhizobium puede perder su efectividad debido a toxinas producidas por la semilla, y desecamiento de las células.

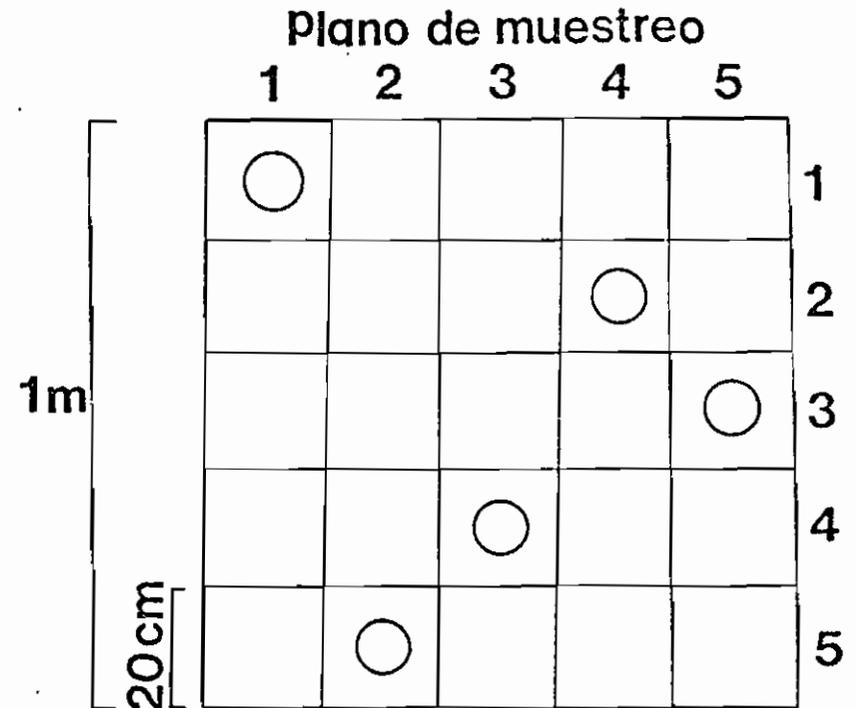
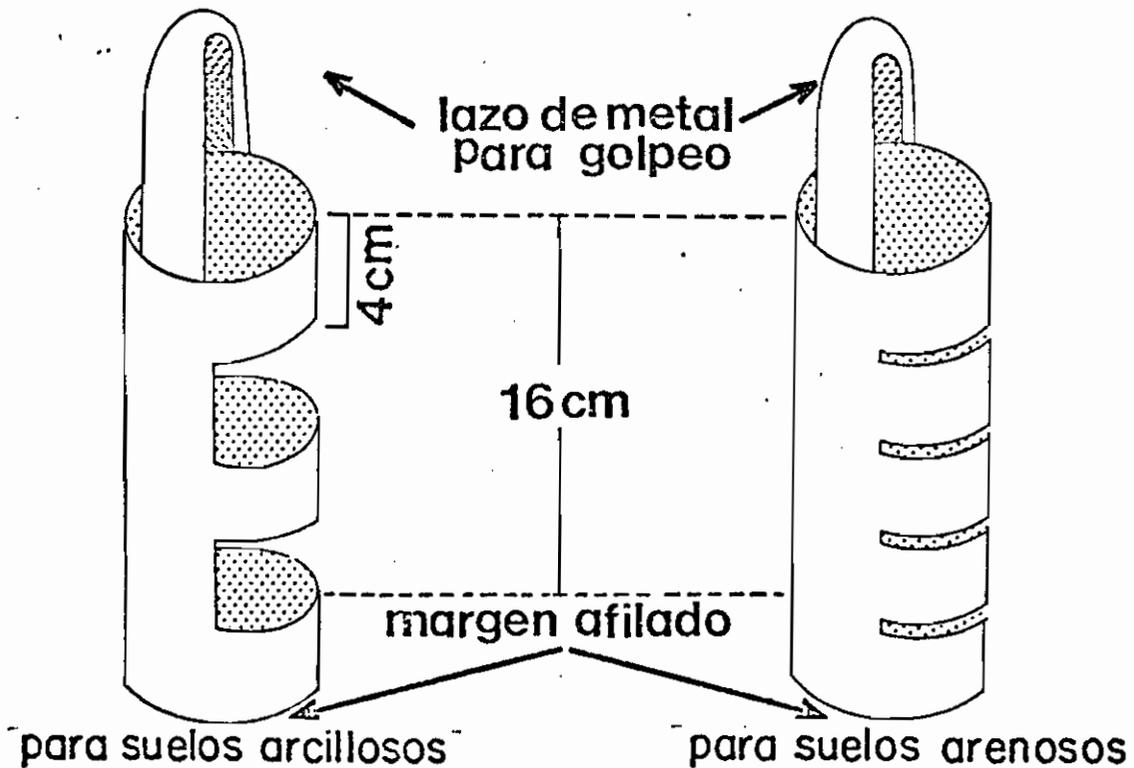
TABLA 1

Recomendaciones actuales (Junio 1983) para la inoculación de algunas leguminosas forrajeras.

<u>CIAT cepa recomendada</u>	<u>Leguminosa CIAT No.</u>
1780 o 1670	<u>Centrosema macrocarpum</u> 5065
1780	<u>Centrosema</u> sp. 5112
1670	<u>C. brasilianum</u> 5234
590	<u>C. pubescens</u> 438
2434	<u>Pueraria phaseoloides</u> 9900
2487	<u>Desmodium canum</u> 13032
1502	<u>D. canum</u> 3005
2469	<u>D. heterophyllum</u> 349
2335	<u>D. ovalifolium</u> 350, 3666 y 3784
1460	<u>Stylosanthes capitata</u>
no inocular	<u>Zornia</u> spp
no inocular	<u>Stylosanthes guianensis</u> 1283
no inocular	<u>S. macrocephala</u>

METODO PARA EVALUACION DE NODULACION DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN PRADERAS (DIC.1980)

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

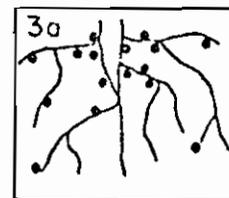


METODO PARA EVALUACION DE NODULACION EN PLANTAS INDIVI-
DUALES DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS (dic. 1980)

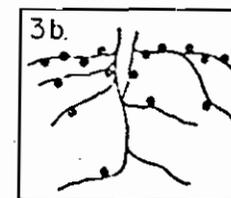
Se puede evaluar la nodulación de plantas individuales sin dañarlas, usando una navaja y cavando cuidadosamente en derredor de las raíces de la planta. En los casos donde no importa la supervivencia de la planta, se puede remover la planta entera del suelo usando un azadón, pero sin arrancarla, pues así muchos nódulos pueden quedar en el suelo. Se evalúa la nodulación según las categorías del formato adjunto. Los números representan niveles de nodulación (0 = nada; 1 = baja; 2 = regular; 3 = buena) y las letras representan diferencias en la distribución. Nuevas categorías de distribución pueden ser creadas, pero siempre usando los mismos niveles (1, 2 y 3). Es importante evaluar la nodulación tanto en la raíz principal, como en las secundarias. No se deben incluir nódulos secos ni muertos. Se debe tomar nota del color interno de los nódulos. La evaluación es más fácil con plantas jóvenes de 1 - 4 meses de edad.

BIBLIOTECA
CITA

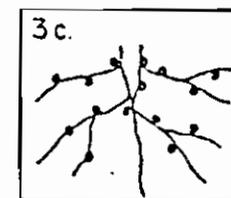
CATEGORIAS PARA
EVALUACION DE DISTRIBUCION DE NODULOS
EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS



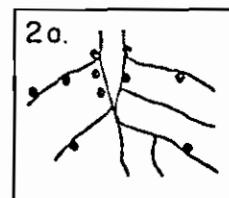
3a.
BUENA NODULACION
ESPECIALMENTE CERCA
DE LA RAIZ PRINCIPAL



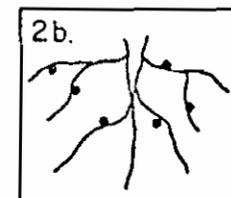
3b.
BUENA NODULACION
ESPECIALMENTE
EN LAS RAICES
SUPERFICIALES



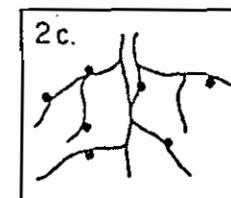
3c.
BUENA NODULACION,
NODULOS DISTRIBUIDOS
UNIFORMEMENTE



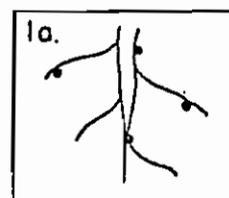
2a.
REGULAR NODULACION
ESPECIALMENTE EN
LA RAIZ PRINCIPAL



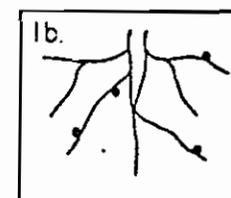
2b.
REGULAR NODULACION
SIN NODULOS EN
LA RAIZ PRINCIPAL



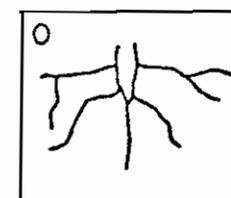
2c.
REGULAR NODULACION,
NODULOS DISTRIBUIDOS
UNIFORMEMENTE



1a.
MALA NODULACION
CON POR LO MENOS
1 NODULO EN LA
RAIZ PRINCIPAL



1b.
MALA NODULACION
SIN NODULOS EN
LA RAIZ PRINCIPAL



0
SIN NODULOS

CALCULOS PARA REDUCCION DE ACETILENO

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

$$= 10^6 \mu\text{mol}$$

$$1 \text{ ml C}_2\text{H}_4 = \frac{1 \times 10^6}{24 \times 10^3} = 41.7 \mu\text{moles}$$

Para la curva de calibración se inyecta 2ml de C₂H₄ a 995 ppm en un vacutainer de 13 ml y se toma el promedio de altura de los picos de 5 inyecciones de 0.5 ml de la dilución.

El volumen inyectado:

$$\frac{1}{2} \times \frac{2}{13} \times \frac{995}{10^6} \text{ mls. C}_2\text{H}_4$$

$$= \frac{1}{2} \times \frac{2}{13} \times \frac{995}{10^6} \times 41.7 = 3191 \times 10^{-6} \mu\text{moles C}_2\text{H}_4$$

3191 x 10⁶ μmoles C₂H₄ produce un pico de altura X U G C.

Suponiendo que X=10 en una atenuación especificada el factor de calibración F=319.1 x 10⁻⁶ μmoles C₂H₄/UCG, en esta atenuación(x4)

Si se están usando diferentes atenuaciones para el C₂H₄ en el ensayo es mejor expresar el F en atenuación x1 ($\frac{F \text{ aten } x 4}{4} = F \text{ aten } x 1$), y multiplicar los picos de las muestras por la atenuación.

Para calcular μmoles C₂H₄/muestra/hora

$$\text{volumen botella} \frac{240}{0.5} \times \frac{\text{UCG} \times F}{h \times \text{no.de muestras}} = \mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{muestra/hora}$$

volumen inyectado / horas incubación por ejemplo no.plantas o peso en g. para calcular actividad/g.

Ejemplo : F= 531 x 10⁻⁶ μmoles

Pico 48 UCG/3h
 = con dos plantas/botella
 = 2.04 μmoles/planta/h

METODO PARA EVALUAR LA RESPUESTA A INOCULACION EN EL CAMPO

Para evitar la contaminación entre parcelas y para reducir la variabilidad se necesitan de parcelas grandes en un sitio donde no se ha sembrado antes con leguminosas. Puede ser sabana nativa o una pradera vieja de gramínea sola. Debe ser un sitio uniforme y plano. Se quema la sabana o guadaña la gramínea y se hacen surcos a una distancia de 2 m y de 25 m de largo, atravesando el pendiente (si hay pendiente). Se forma cada surco con dos escardillos a una distancia de 40 cm, con una pala pequeña para cada parcela. También se pueden hacer los surcos con azadón. Normalmente dos bloques son suficientes. Se incluyen dos testigos (no inoculado y fertilizado con N) con los tratamientos inoculados. Se fertiliza en el surco, aplicando la cantidad necesaria para 1 m^2 para cada m lineal del surco (para Carimagua se aplican g/10m lineares de surco) 330 calfos, 91 sulphomag (2 veces), 5 Zn, 2 Cu y 1B). Se aplica el inoculante en forma peletizada con RF/MoO₃. Los tratamientos sin inocular también se peletizan con RF/MoO₃. Se siembra en el centro del surco, tapando las semillas con el pié, usando una tasa de siembra para tener aproximadamente 5 plantas/m lineal.

Se evita la contaminación entre parcelas lavando las herramientas con alcohol y poniéndose botas plásticas al entrar en la parcela. En los tratamientos con N se aplican 15 kg/ha de N(932 kg urea) cada 2 semanas (32 g urea/10 m lineares).

Tres veces durante el establecimiento se cortan 3 muestras/parcela, cada muestra de 2 m lineares, a una altura de 0cm, en sitios escogidos de los dos surcos centrales al azar. Cada corte se hace en un sitio diferente. Se colocan las muestras inmediatamente en una bolsa plástica, dentro de una caja de icopor

con hielo. Se pesan las bolsas para determinar peso verde, se toma una submuestra de 100 g, se separan las hojas y los tallos y se secan separadamente para determinar peso seco y % N. En cada corte también se evalúa la nodulación.

Se calcula kg N producidos de hojas y tallos/2 m lineares usando el promedio de las tres muestras y comparando los tratamientos inoculados con los dos testigos.

Una vez establecido el ensayo se puede guadañar y seguir evaluando el rebrote para determinar la persistencia del efecto de inoculación.