

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*
MEDIANTE FUENTES NITROGENADAS Y CARBONADAS Y RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS

RUTH JOHANA RODRIGUEZ LOPEZ
ANNY CONSTANZA ROMERO HINESTROZA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PROGRAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*
MEDIANTE FUENTES NITROGENADAS Y CARBONADAS Y RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS

RUTH JOHANA RODRIGUEZ LOPEZ
ANNY CONSTANZA ROMERO HINESTROZA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico

DIRECTOR
MSc. en Bioquímica ERNESTO LUQUE TURRIAGO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PROGAMA DE QUIMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores. Artículo 1 del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1996, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A la Sección de Laboratorios de la Universidad de Nariño por facilitarnos sus instalaciones y equipos.

A CORPONARIÑO por facilitarnos las instalaciones del invernadero para el desarrollo de los ensayos de infectividad y efectividad.

A CORPOICA por obsequiarnos las semillas de arveja certificadas.

Al Profesor Ernesto Luque, nuestro Director, por su apoyo incondicional e infinita paciencia.

A la Doctora Martha Sofía Gonzáles por su colaboración en el Análisis Estadístico Multivariado.

Al Profesor Oscar Burbano, por sus sugerencias en el análisis estadístico.

A nuestros Jurados, Pablo Fernández y Jesús Cabrera, por su tiempo y las respectivas sugerencias.

A Dianita, por el material bibliográfico.

A Diego Andrés, por el diseño y presentación.

Y en general a todas las personas e instituciones que de alguna manera colaboraron para el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	19
1. OBJETIVOS	21
1.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
2. ANTECEDENTES	22
3. FUNDAMENTO TEORICO	24
3.1 FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	24
3.1.1 Proceso de infección	25
3.1.2 Bioquímica de la fijación de Nitrógeno	27
3.2 INTERACCION RHIZOBIUM-LEGUMINOSA	28
3.3 FACTORES MEDIOAMBIENTALES QUE AFECTAN LA NODULACION Y LA FIJACION DE NITRÓGENO	29
3.3.1 Acidez	30
3.3.2 Temperatura	30
3.3.3 Toxicidad del Aluminio y Manganeso	31
3.3.4 Hierro	31
3.3.5 Deficiencia de Calcio y Fósforo	32
3.4 SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIUM	32
3.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> EN FUENTES NITROGENADAS Y CARBONADAS	34
3.5.1 Nutrición en el suelo y en la rizosfera	35

3.5.2 Requerimientos nutricionales durante la simbiosis	36
3.6 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1 RECOLECCIÓN DE NÓDULOS Y AISLAMIENTO DE <i>Rhizobium</i>	41
4.2 EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES	43
4.2.1 Activación de los aislados Rhizobiales	45
4.2.2 Esterilización de la superficie de las semillas de arveja	46
4.2.3 Preparación de las materas	47
4.2.4 Inoculación y siembra de las semillas	47
4.3 EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES EN DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS Y CARBONADAS	49
4.3.1 Preparación de los medios de cultivo con fuentes nitrogenadas	49
4.3.2 Preparación de los medios de cultivo con fuentes carbonadas	50
4.4 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	51
4.4.1 Preparación de las placas con levadura manitol agar	51
4.4.2 Inoculación de las placas	51
4.4.3 Aplicación de los sensidiscos	52
4.5 EVALUCION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE UNA CEPA RHIZOBIAL MARCADA FRENTE A DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS CARBONADAS Y ANTIBIÓTICOS	53
5. RESULTADOS Y DISCUSION	55
5.1 CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS CEPAS DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	55

5.2 EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS RHIZOBIALES	57
5.3 CARACTERIZACION DE LOS AISLADOS <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> EN FUENTES CARBONADAS Y NITROGENADAS	63
5.3.1 Comportamiento de los aislados rhizobiales frente a diferentes fuentes nitrogenadas	63
5.3.2 Comportamiento de los aislados rhizobiales frente a diferentes fuentes carbonadas	68
5.4 CARACTERIZACION DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES MEDIANTE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	75
5.5 EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LA CEPA RHIZOBIAL MAS EFECTIVA EN LA FIJACION DE NITROGENO MARCADA FRENTE A FUENTES NITROGENADAS, CARBONADAS Y ANTIBIÓTICOS	78
6. CONCLUSIONES	81
7. RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFIA	84
ANEXOS	88

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Efectividad de cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	59
Cuadro 2. Matriz de cargas o eigen vectores para cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en fuentes nitrogenadas y carbonadas	72
Cuadro 3. Matriz de cargas o eigen vectores para cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en antibióticos	77
Cuadro 4. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en fuentes nitrogenadas	79
Cuadro 5. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en fuentes carbonadas	80
Cuadro 6. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en antibióticos	80

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Aislados rhizobiales inoculados	44
Tabla 2. Fuentes nitrogenadas agregadas al medio de cultivo en reemplazo de la levadura	49
Tabla 3. Diseño experimental para el aislado más efectivo en la fijación de Nitrógeno marcado con fuentes nitrogenadas	53
Tabla 4. Diseño experimental para el aislado más efectivo en la fijación de Nitrógeno marcado con fuentes carbonadas	53
Tabla 5. Diseño experimental para el aislado más efectivo en la fijación de Nitrógeno marcado con antibióticos	53
Tabla 6. Caracterización morfológica de las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> aisladas de nódulos de plantas de arveja y cultivadas en el medio base LMA a 27°C±1	56
Tabla 7. Características de la nodulación de los tratamientos inoculados con los aislados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	61
Tabla 8. Comportamiento de las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en diferentes fuentes nitrogenadas	64
Tabla 9. Comportamiento de las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en diferentes fuentes carbonadas	68

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Fases del desarrollo de los hilos de infección rizobiales en los pelos radicales de las leguminosas	26
Figura 2. Procedimiento de aislamiento utilizado por Date y Halliday	42
Figura 3. Preservación de los aislados rizobiales en perlas de porcelana	43
Figura 4. Activación de los aislados rizobiales	45
Figura 5. Procedimiento para diluciones en serie	46
Figura 6. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar	52
Figura 7. Crecimiento característico del aislado LFBN 104 en el medio base LMA	55
Figura 8. Plantas de arveja (<i>Psium sativum</i>) inoculadas con aislados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	58
Figura 9. Raíz nodulada de uno de los tratamientos más infectivos	60
Figura 10. Crecimiento de las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> RUN 07, RUN 12, T-58 y LFBN 110 en Treonina como fuente nitrogenada	63
Figura 11. Fenograma representando similitudes fenotípicas de cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> con base en la presencia y ausencia de crecimiento en fuentes de Nitrógeno y Carbono	71
Figura 12. Gráfico en dos dimensiones de PC1 y PC2 representando la posición de las 18 cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en el espacio de las variables	74
Figura 13. Resistencia y sensibilidad de la cepa LFBN 101 frente a los antibióticos evaluados	75
Figura 14. Fenograma representando similitudes fenotípicas de cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> con base en los diámetros de los halos de inhibición obtenidos frente a los antibióticos evaluados	76
Figura 15. Gráfico en dos dimensiones de PC1 y PC2 representando la posición de las 18 cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> en el espacio de las variables (antibióticos)	78

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Condiciones de asepsia recomendadas	88
Anexo B. Medios de cultivo y soluciones	88
Anexo C. Procedimiento de teñido Gram	90
Anexo D. pH de los aislados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	91
Anexo E. ANOVA para efectividad	91
Anexo F. ANOVA para infectividad	91
Anexo G. ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en fuentes de nitrógeno	92
Anexo H. ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en fuentes de carbono	92
Anexo I. ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en antibióticos	92

GLOSARIO

AEROBIO: organismo dependiente del oxígeno para la producción de energía.

AMINOACIDO: ácidos orgánicos con por lo menos un grupo amino y un grupo carboxilo por molécula, principales constituyentes de todas las proteínas.

ANTIBIOGRAMA: procedimiento de laboratorio que permite determinar la sensibilidad de un microorganismo entre diferentes antibióticos.

ANTIBIOTICO: sustancias químicas producidas principalmente por diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos.

AUXÓTROFO: microorganismo que requiere factores de crecimiento que no son necesarios para el tipo silvestre.

BACTERIA: un grupo de procariontes filogenéticamente relacionados y distinto del grupo Archea.

CARBOHIDRATO: componentes estructurales fundamentales de las plantas y desempeñan un papel esencial en el metabolismo de todos los microorganismos.

CLUSTER: agrupación estadística de datos en torno a características espectrales similares.

FENOGRAMA: representación gráfica que refleja la formación de conglomerados de un análisis cluster.

GRAM NEGATIVA: un tipo de célula procariota cuya pared contiene relativamente poca cantidad de peptidoglucano, pero que contiene una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y otras macromoléculas complejas.

GRAM POSITIVAS: un tipo de célula procariota cuya pared está compuesta básicamente por peptidoglucano y carece de la membrana externa.

INHIBICION: la reducción del crecimiento microbiano a causa de una disminución del número de organismos presentes o de alteraciones en el entorno microbiano.

METABOLISMO: todas las reacciones bioquímicas de una célula.

MICROORGANISMO: un organismo microscópico constituido por una sola célula o agrupación de células.

PEPTIDOGLUCANO: polímero complejo presente en las paredes celulares de todas las bacterias y constituido por péptidos y carbohidratos.

QUIMIOTAXIS: orientación de un organismo hacia un agente químico

RESISTENCIA ANTIBIOTICA: la capacidad adquirida por un microorganismo para crecer en presencia de un antibiótico frente al cual el microorganismo es eventualmente sensible.

SENSIDISCO: disco de papel impregnado con antibiótico.

TECNICAS ASEPTICAS: métodos para mantener estériles los medios de cultivo y otros objetos.

RESUMEN

Se aislaron y purificaron 10 aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* a partir de plantas noduladas de arveja (*Psium sativum*), procedentes de la vereda El Rosal de San Juan, Municipio de Ipiales. Además se tomó 8 aislados puros procedentes del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño. Mediante el peso seco de la parte aérea de las plantas y el número de nódulos en las raíces de las leguminosas se determinó que las cepas LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110 fueron las más efectivas en la fijación biológica de nitrógeno. Los aislados se caracterizaron por su crecimiento específico en 11 fuentes de carbono y 12 fuentes de nitrógeno diferentes, que se reemplazaron en el medio de cultivo base por el manitol y el contenido de nitrógeno de la levadura respectivamente. El análisis cluster con 23 parámetros fisiológicos basado en la similitud de las cepas rizobiales para utilizar los sustratos ensayados como fuentes de nitrógeno y carbono, agrupó las cepas LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110 dentro de un mismo cluster, estas cepas se caracterizaron por su marcada habilidad para utilizar compuestos como sacarosa, ribosa y manosa como fuentes de carbono, pero menos eficientes en la asimilación de aminoácidos de tipo no polar como valina. Como punto de comparación se evaluó la resistencia intrínseca a 6 antibióticos diferentes y se determinó que las cepas más efectivas en la fijación de nitrógeno presentaron patrones de sensibilidad altos frente a los antibióticos nitrofurantoina (300 µg/sensidisco), trimethopin (25 µg/sensidisco), penicilina (10 µg/sensidisco), tetraciclina (30 µg/sensidisco) y ampicilina 10 (µg/sensidisco). El comportamiento particular de cada cepa frente a las diversas fuentes nitrogenadas, carbonadas y antibióticos, permitió establecer diferencias entre ellas basadas en sus propiedades metabólicas, comportamiento que no afectó la capacidad infectiva y efectiva del rizobio, confirmando la utilidad de la técnica como marcador rizobial.

Palabras clave: Fijación simbiótica de nitrógeno, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, efectividad, fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, resistencia intrínseca a antibióticos

ABSTRACT

There were isolated and purified 10 isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* from noduled pea plants (*Psium sativum*), which were precedent from El Rosal de San Juan, community of Ipiales. In addition, there were taken 8 pure isolated from the Germoplasm Bank of the Universidad de Nariño, through the dry weight from the aerial part of the plants and the number of nodules on the roots of the leguminous. It was determined that the strains LFBN 101, LFBN 103 LFBN 104 and LFBN 110, were the most effective as for nitrogen biological fixation. These isolates were characterized by their specific growing in 11 different carbon sources and 12 different sources of nitrogen, which were replaced at the basic culture by the mannitol and the nitrogen contained on the yeast respectively. Cluster analysis whit 23 physiological parameters, based on the similarity of rhizobiales strains to utilize tested substrates as nitrogen and carbon sources, grouped the strains LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110 into the same cluster, these strains characterized for them marked ability to use compounds as sucrose, ribose and mannose as carbon sources, but less efficient in the amino acids assimilation of non-polar type as valine. As a comparison point it was evaluated the intrinsic resistance to 6 different antibiotics and determined that the most effective strains in the nitrogen fixation to present high sensibility pattern against nitrofurantoin (300 µg/sensidisc), trimethopim (25 µg/sensidisc), penicillin (10 µg/sensidisc), tetracycline (30 µg/sensidisc) and ampicillin (10 µg/sensidisc) antibiotics. The particular behavior of each strain against the various nitrogen and carbon sources and antibiotics, permitted to establish differences between this based into them metabolic properties, behavior that not affected rhizobio infective and effective ability, confirmming the utility of the technique as a rhizobial marker.

Key Words: Fixation nitrogen symbiotic, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, effectivity, nitrogen sources, carbon sources, intrinsic resistant antibiotics.

INTRODUCCION

El nitrógeno es esencial para todos los organismos y en las plantas, forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila¹; su adquisición es importante para la asimilación de carbono fotosintético en el desarrollo y crecimiento de la planta². Si el suelo carece del nitrógeno necesario para suplir las necesidades de las plantas, se debe agregar en forma de fertilizantes nitrogenados o suministrárselo mediante fijación biológica de nitrógeno. Debido al alto costo de los fertilizantes nitrogenados y sobre todo a los efectos contaminantes que ocasiona en el suelo, agua, animales e inclusive seres humanos, ya que sus aplicaciones se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana³, los procesos naturales de fijación biológica de nitrógeno juegan un papel muy importante en la activación de los sistemas agrícolas sustentables, por su beneficio ambiental.

Debido a que el Departamento de Nariño es una región agrícola en la cual las leguminosas de grano como la arveja (*Pisum sativum*) son esenciales en la dieta de sus habitantes por su alto contenido de proteínas, la fijación biológica de nitrógeno se constituye en una alternativa limpia, económica y poco contaminante de obtener nitrógeno del aire mediante la simbiosis de la leguminosa con la bacteria del género *Rhizobium*. Esta opción ecológica de fertilización requiere la presencia en el suelo de cepas de *Rhizobium* capaces de establecer una simbiosis efectiva con las raíces de las leguminosas, pero cuando estas cepas carecen de dicha propiedad o no están en número suficiente para optimizar la fijación, se requiere de la inoculación artificial del suelo con cepas altamente efectivas, seleccionadas en base a su capacidad de fijación biológica de nitrógeno y caracterizadas mediante una técnica que permita su identificación y reconocimiento.

Una forma de lograrlo, es mediante la utilización de las características bioquímicas que generalmente se aplican a la caracterización taxonómica de los microorganismos, pero que también se pueden utilizar para la identificación de cepas a nivel de colonias sobre agar⁴. En este estudio se evaluó la efectividad de 18 aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en plantas de arveja (*Pisum sativum*) y se caracterizaron mediante sus propiedades metabólicas y su habilidad

¹URZÚA, H. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. En : Ciencia e investigación agraria. Vol. 32, No. 2 (may-ago, 2005); p. 133. p. 133-150.

²VANCE, Carroll and GANTT, Stephen. Control of Nitrogen and Carbon metabolism in root nodules. En : Fisiología Plantarum. Vol. 85 (1992); p. 266.

³RODRÍGUEZ, J. Manual de fertilización. Santiago de Chile : Facultad Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, 1993. 362 p. Citado por: URZÚA, Op. cit., p. 135.

⁴SCHWINGHAMER E. A and DUDMAN W. F. En : Appl. Bacteriol. Vol. 36 (1973); p. 263-272. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 4.

para utilizar fuentes de nitrógeno y carbono, reflejadas en su comportamiento particular frente a cada fuente que además de permitir su diferenciación brinda una idea de aquellos compuestos específicos que suministrados a la bacteria incrementan el rendimiento de una cosecha debido a la fijación simbiótica de nitrógeno. Esta técnica de identificación se complementó con otra que le sirvió de referencia como la resistencia intrínseca a antibióticos, que se basa en la resistencia o sensibilidad de las cepas rizobiales frente a los antibióticos probados.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* mediante la utilización de diferentes fuentes nitrogenadas y carbonadas como marcadores rizobiales y la resistencia intrínseca a antibióticos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ★ Evaluar la efectividad e infectividad de diez aislados rizobiales nativos y ocho aislados procedentes del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño, mediante el peso seco de la parte aérea de las plantas y el número de nódulos en las raíces de las leguminosas.
- ★ Caracterizar los aislados rizobiales mediante su comportamiento en diferentes fuentes nitrogenadas y carbonadas.
- ★ Caracterizar los aislados rizobiales bajo patrones de resistencia y sensibilidad frente a diferentes antibióticos.

2. ANTECEDENTES

Las leguminosas han sido utilizadas en cultivos de rotación desde el tiempo de los Romanos, Teofrasto⁵ (370-258 a. C) dijo “las leguminosas no son un cultivo difícil para el suelo, incluso parecen abonarlo”. La habilidad de las leguminosas para convertir nitrógeno atmosférico en compuestos que pueden ser utilizados por la planta, fue demostrada por Hellriegel y Wilfarth⁶, quienes lo asociaron con la presencia de protuberancias o nódulos en la raíz de la leguminosa, con la presencia de una bacteria particular, pero fue Beijerinck⁷ en 1888, el primero en aislar *Rhizobium* de los nódulos y posteriormente Koch demostró las habilidades de estas bacterias para reinfectar la leguminosa y fijar N₂ en simbiosis.

Desde entonces, la fijación simbiótica de nitrógeno se constituye en un mecanismo ampliamente utilizado para la introducción de nitrógeno al suelo incrementando el rendimiento de una cosecha. Sin embargo, el suelo no siempre presenta una alta población de cepas efectivas para que ocurra una nodulación eficiente por lo cual, en esos casos, es necesario practicar una inoculación artificial con cepas de rizobio de comprobada capacidad fijadora de nitrógeno⁸.

El uso de inoculantes artificiales requiere contar con una técnica que permita diferenciar y seleccionar las cepas efectivas en la fijación de nitrógeno de las que no lo son. Una forma de lograrlo es mediante la utilización de sus propiedades metabólicas y habilidad de asimilación de sustratos. Sato y Sugawara⁹, Padmanabhan, Hirtz y Broughton¹⁰ por ejemplo, utilizaron un estudio comparativo de las características bioquímicas de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en diferentes carbohidratos como mecanismo de diferenciación. Mientras que autores como Martínez et al¹¹, Novikova et al¹², Hungria et al¹³ y Kalita y Malek¹⁴

⁵TEOFRASO citado por: GRAHAM, Peter. Biological dinitrogen fixation : symbiotic association. En: Sylvia, D. et al. Soil microorganisms in the environment. s.p.i. p. 2.

⁶HELLRIEGEL y WILFARTH, citado por: GRAHAM, Op. cit., p. 2.

⁷BEIJERINCK, citado por: GRAHAM, Op. cit., p. 2.

⁸LUQUE, Ernesto. Utilización de fuentes nitrogenadas como marcadores rizobiales. San Juan de Pasto, 1992, p. 3. Trabajo de investigación (Profesor Titular) : Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Química.

⁹SATO, Tetsuya and SUGAWARA, Shiro. Biochemical and Serological characteristics of two similar soybean rhizobia. En : Soil Sci. Plant Nutr. Vol. 34, No. 2 (1988); p. 241-246.

¹⁰PADMANABHAN, S; HIRTZ, R. D. and BROUGHTON W. J. Rhizobia in tropical legumes cultural Characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. En: Soil Biology & Biochemistry. Vol. 22 (1990); p. 23-28.

¹¹MARTINEZ, Esperanza et al. *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Tress. En : International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 41 (1991); p. 417-426.

¹²NOVIKOVA, Natalie et al. Numerical Taxonomy of *Rhizobium* Strains from Legumes of the Temperate Zone. En : International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 44 (1994); p. 734-742.

¹³HUNGRIA, Mariangela et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. En : Soil Biology & Biochemistry. Vol. 33 (2001); p. 1349-1361.

¹⁴KALITA, Michael and MALEK, Wanda. Phenotypic and genomic characteristics of Rhizobia isolated from *Genista tinctoria* Root Nodules. En : Systematic and Applied Microbiology. Vol. 27 (2004); p.707-715.

avanzaron un poco más en la caracterización de cepas de *Rhizobium* haciendo uso sus rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos con el fin de determinar sus similitudes fenotípicas representativas de diferentes especies y géneros.

Otra técnica ampliamente utilizada en la caracterización fenotípica de *Rhizobium* es la resistencia intrínseca a antibióticos, en la cual los antibióticos ensayados son diluidos en el medio base, tal como lo describe Hungria et al¹⁵ y Kalita y Malek¹⁶ y se evalúa el crecimiento de las cepas aisladas, pero también se realiza a través de sensidiscos, saturados con antibióticos prueba y la resistencia o sensibilidad se valora midiendo los diámetros de inhibición sobre la caja con agar. Autores como Rome et al¹⁷, Rivas et al¹⁸ y Villegas et al¹⁹, confirma la utilidad de la técnica como método de diferenciación, de fácil implementación y bajo costo.

Para el Departamento de Nariño se registran dos estudios relacionados con la evaluación de la efectividad y caracterización de cepas de *Rhizobium*: Cabrera y Guevara²⁰ determinaron la efectividad de tres cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* y las caracterizaron mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos por dilución de antibióticos en el medio base. Su estudio logro introducir dos nuevas técnicas para el reconocimiento de microorganismos. Por otra parte Luque²¹, utilizó el crecimiento diferencial de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* en fuentes nitrogenadas y resistencia a antibióticos como marcador rizobial, comportamiento que no afectó la capacidad infectiva y efectiva de las cepas probadas, confirmando la utilidad de este análisis en la diferenciación y caracterización de las cepas rizobiales.

¹⁵HUNGRIA et al, Op. cit., p. 1349-1361.

¹⁶KALITA and MALEK, Op. cit., p.707-715.

¹⁷ROME, Sophie et al. *Sinorhizobium medicae* sp. Nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. En : International Journal of systematic bacteriology. Vol. 46, No.4 (1996); p. 972-980.

¹⁸RIVAS, Raúl et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. Nov. that Nodulates and Fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. En : Sistematic and applied microbiology. Vol. 26 (2003); p. 47-53.

¹⁹VILLEGAS, Maria del Carmen et al. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciariata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. En : Sistematic and applied microbiology. Vol. 29 (2006); p. 526-538.

²⁰CABRERA, Lucia y GUEVARA, Claudia. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum* bv. *Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. San Juan de Pasto, 2003, 75 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de química.

²¹LUQUE, Op. cit., 51. p.

3. FUNDAMENTO TEORICO

El Nitrógeno es un elemento vital para todos los seres vivos. La naturaleza tiene varias formas por las cuales este elemento se recicla biológicamente. Muchas plantas leguminosas atrapan el nitrógeno combinado, abundante en la atmósfera a través de una asociación simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno, conocidos como *Rhizobium*, los cuales forman nódulos fijadores de nitrógeno en la leguminosa. El crecimiento en regiones biogeográficas inexploradas ha proporcionado evidencia de una enorme diversidad entre la fijación de nitrógeno y la nodulación de bacterias²². Además de los grupos rizobiales tradicionales (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) pertenecientes a la clase α de Proteobacterias, pocas bacterias de la clase β y γ de proteobacterias también han sido reportadas por formar nódulos en plantas leguminosas. Por consiguiente, la simbiosis rizobial no esta restringida a las α -proteobacterias y esta ampliamente extendida en la naturaleza²³.

Hasta el momento, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) es entonces, la mejor forma de introducción de nitrógeno dentro del ecosistema²⁴ y la simbiosis leguminosa-rhizobium representa el mejor mecanismo para la fijación biológica de nitrógeno en el suelo comparada con heterótrofos fijadores de N_2 y asociaciones de bacterias²⁵ y plantas actinorhizas, por ejemplo, *Frankia-Casuarina*²⁶ y *Frankia-Atriplex*²⁷. Esta asociación simbiótica se constituye en una alternativa agronómicamente y ecológicamente importante²⁸.

3.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.

La fijación biológica de nitrógeno es una fuente eficiente de N_2 fijado, la cual juega un papel importante en la remediación del terreno. El interés en la FBN tiene un enfoque en los sistemas simbióticos de plantas leguminosas y rhizobium, porque estas asociaciones tienen un gran impacto cuantitativo en el ciclo del nitrógeno²⁹.

²²HUNG, Mei-Hua et al. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. En : Pedobiologia. Vol. 49 (2005); p. 578.

²³MOULIN et al. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. En : Nature. Vol. 411 (2001); p. 948-950. Citado por: HUNG et al, Op. cit., p. 577-578.

²⁴ZAHARAN, Hamdi. Rhizobia from wild legumes : diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. En : Journal of biotechnology. Vol. 91 (2001); p. 143.

²⁵ABDEL-GHAFFAR, A. S. Aspects of microbial activities and nitrogen fixation in Egyptian desert soils. En : Arid Soil Res. Rehabil. Vol. 3 (1989); p. 291-294. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 143.

²⁶SAYED, W. F. et al. Effect of temperature and moisture on the survival and symbiotic effectiveness of *Frankia* spp. En : Biol. Fertil. Soils. Vol. 25 (1997); p. 349-353. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 143.

²⁷CAUCAS, V. and ABRIL. A. *Frankia* sp. infects *Atriplex cordobensis*-cross-inoculation assay and symbiotic efficiency. En : Phytol. Vol. 59 (1996); p. 103-110. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 143.

²⁸CULLIMORE, J.; RANJEVA, R. and BONO, J. Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. En : Trends in Plant Science. Vol.6, No.1 (Jan. 2001); p. 24.

²⁹ZAHARAN, Op. cit., p. 144.

La deficiencia en nitrógeno mineral con frecuencia limita el crecimiento de la planta y así mismo las relaciones simbióticas que han evolucionado entre plantas y una variedad de organismos fijadores de N_2 ³⁰. El Nitrógeno fijado simbióticamente por la asociación entre especies de rhizobium y leguminosas, representa una fuente renovable de nitrógeno para la agricultura. Esto resalta el significado de la simbiosis rhizobium leguminosa como el mayor contribuyente a la fijación biológica de nitrógeno³¹.

El establecimiento de la simbiosis envuelve una completa interacción altamente específica entre huésped y simbiote, originando la formación un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa: el nódulo, el cual la bacteria coloniza como simbiontes intracelulares³² y dentro del cual fija nitrógeno atmosférico en amoniaco³³. En la nodulación, las cepas rhizobiales específicas infectan un limitado rango de plantas huésped, como es el caso de *Psium sativum* la cual es particularmente nodulada por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y aunque puede existir una considerable diversidad dentro de esta biovariedad rhizobial³⁴ la arveja no es un nodulador heterogéneo como los granos comunes,³⁵ los cuales pueden ser nodulados por múltiples especies de *Rhizobium*³⁶.

3.1.1 Proceso de infección. Una simbiosis completamente funcional requiere el cumplimiento exitoso de numerosos pasos, comenzando con el intercambio de señales de reconocimiento entre la planta y la bacteria. El proceso de señalización es iniciado por la planta que libera exudados de la raíz, incluyendo flavonoides y nutrientes. El Rhizobium es quimiotáctico hacia ellos y responde a la composición flavonoide característica de la planta iniciando la síntesis de lipocitoligosacaridos (LCO) específicos. Estos compuestos, los cuales son conocidos como factores nod³⁷, inducen una señal de nodulación específica (señal Nod), y son responsables de la activación de muchos de los eventos en el proceso de

³⁰FREIBERG, C. et al. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. En : Nature. Vol. 387 (1997); p. 394–401. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 144.

³¹ZAHARAN, H. Phenotypic characteristics, cross nodulation and nitrogen fixation of root-nodule bacteria isolated from wild leguminous plants in Egypt. En : Proceedings of the International Symposium on Biological Nitrogen Fixation and Crop Production. (1999 : Cairo); p. 77–90. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 144.

³²STACEY, Gary et al. Genetics and functional genomics of legume nodulation. En : Plant Biology. Vol. 9 (2006); p. 110.

³³BOGINO, Pablo et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. Strain in Soils Containing Indigenous Rhizobia. Curr. Microbiology. [on line], 2007. Disponible en internet : <www.journals.asm.org/search.dtl>

³⁴MUTCH, L. A. and YOUNG, J. P. W. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. En : Molecular Ecology. Vol. 13 (2004); p. 2435–2444. Citado por: CHEMINING'WA, George and VESSEY, Kevin. The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. En : Soil Biology & Biochemistry. Vol. 38 (2006); p. 295. p. 294-302

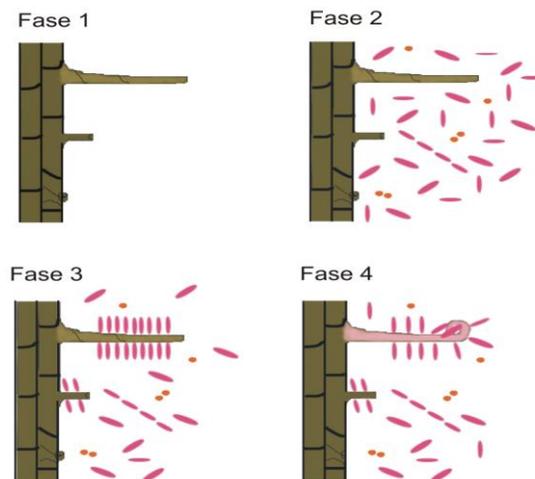
³⁵MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis : overview and perspectives. En : Plant and Soil. Vol. 252 (2003); p. 11–23. Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 295.

³⁶CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 295.

³⁷BOGINO, et al, Op. cit.

infección del pelo de la raíz³⁸, incluyendo la deformación del pelo radical, la división de la célula cortical y la morfogénesis del nódulo³⁹ (figura1).

Figura 1. Fases del desarrollo de los hilos de infección rizobiales en los pelos radicales de las leguminosas. 1, desarrollo del pelo radical: 2, colonización de la rizosfera por varios microorganismos: 3, unión del rhizobium a los pelos radicales; 4, el rhizobium induce el encrespamiento del pelo radical. Invaginación de las raíces, formación del hilo de infección, penetración rizobial etc.



Fuente: BROUGHTON⁴⁰

Durante el proceso de infección, la bacteria entra a la planta por la epidermis de la raíz e induce la reprogramación del desarrollo de la célula cortical de la raíz y la formación de un nódulo. En la mayoría de los casos estudiados, la infección ocurre a través de los pelos de la raíz. El primer suceso del proceso de infección es el encrespamiento del pelo de la raíz, el cual ocurre probablemente a través de la reorientación gradual y constante de la dirección del crecimiento del pelo radical. La bacteria queda encerrada dentro del encrespamiento del pelo radical donde la pared celular de la planta es degradada y la membrana celular es invaginada⁴¹. En la invaginación, la bacteria penetra la pared celular e induce a la pared más interna de la célula o plasmolema a crecer hacia adentro, iniciándose así una estructura tubular (hilo de infección) dentro del cual están las bacterias rodeadas

³⁸ESSELING, J. and EMONS, A. Dissection of Nod factor signaling in legumes : cell biology, mutants and pharmacological approaches. En : J. Microsoc. Vol. 214 (2004); p. 104-113. Citado por: STACEY et al, Op. cit., p. 110.

³⁹DENARIE, J.; EBELLE, F. and ROSENBERG, C. Signaling and host range variation in nodulation. En : Annual Review Microbiology. Vol. 46 (1982); p. 497-531 Citado por: BOGINO, Op. cit.

⁴⁰BROUGHTON, W. J. Control of specificity in Legume-*Rhizobium* associations. En : Journal applied Bacteriology. Vol. 45 (1978); p. 171.

⁴¹STACEY et al, Op. cit., p. 110.

de polisacáridos, en la llamada masa zooglesal⁴². Es dentro de este hilo de infección que la bacteria entra en la célula del pelo radical y finalmente se ramifica dentro del córtex radical. Antes que el hilo de infección alcance la base de la célula del pelo radical, las células corticales de la raíz son inducidas a diferenciarse, activando su ciclo celular y causando su división para formar el nódulo primordium. Además de las células corticales, las células del periciclo también son activadas y sufren algunas divisiones celulares. Cuando el hilo de infección alcanza las células del primordium en desarrollo, la bacteria es liberada dentro de las células vía endocitosis. Dentro de una célula de la planta, la bacteria es encerrada en estructuras semejantes a vacuolas (simbiosomas) dentro de las cuales se diferencian los bacteroides. Dentro de estos simbiosomas los bacteroides convierten el N₂ a NH₃⁴³; es decir, éste es el estado en el cual el rhizobium fija nitrógeno⁴⁴.

3.1.2 Bioquímica de la fijación de nitrógeno. La reducción de N₂ a NH₄⁺ es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa dentro de las células rhizobiales. La enzima consiste de dos componentes: la ferroproteína codificada por el gen nifH que es un homodímero⁴⁵ y la molibdoferroproteína, sensible al oxígeno y compuesta por cuatro subunidades de dos tipos. Es un tetrámero heteromérico⁴⁶. Esta proteína es codificada por el gen nifD y el gen nifK⁴⁷. La presencia de molibdeno en esta enzima y también en la enzima nitrato reductasa, explica el requerimiento de molibdeno para la asimilación de N₂ y NO₃⁻⁴⁸.

Bajo optimas condiciones, la reacción catalizada por la nitrogenasa se expresa de la siguiente manera:



La nitrogenasa reduce los protones para formar H₂ durante el proceso de fijación de N₂⁴⁹. Esta reducción de protones es un proceso dependiente de ATP que

⁴²NUTMAN, Citado por: GIBSON, A. H. Rhizobium, legumes and their symbiosis. Curso intensivo sobre Fixacao de Nitrogenio nos tropicos. Brasil : EMBRAPA- Universidad de Federal Rural do Rio de Janeiro, 1976. Citado por: MORA, Nelly. Fijación simbiótica de nitrógeno por plantas leguminosas : aspectos biológicos. En : SEMINARIO SOBRE MICROBIOLOGIA DE SUELOS APLICADA A LA PRODUCCION AGROPECUARIA. (2º : 1983 : Bogotá). Memorias seminario sobre microbiología de suelos aplicado a la producción agropecuaria. Bogotá : Suelos ecuatoriales. Vol. 13, No. 2. p. 23. 65 p.

⁴³STACEY et al, Op. cit., p. 110.

⁴⁴SCHULTZE M, Kondorosi. Regulation of symbiotic root nodule development. En : Annual Review Genetic. Vol. 32 (1998); p. 33-57. Citado por: BOGINO et al, Op. cit.,

⁴⁵VANCE, Carroll. Root-Bacteria interactions : Symbiotic Nitrogen Fixation. En : WAISEL, Yoav; ESHEL, Amram and KAFKAFI, Uzi. Plants roots : the hidden half. New York : Marcel Dekker, 1991. p. 688.

⁴⁶MORA, Op. cit., p. 24.

⁴⁷VANCE, Op. cit., p. 688.

⁴⁸BRADLEY, Rosemary and NOLT, Judith. The legume-Rhizobium Symbiosis : Evaluation, selection and Agronomic Management. Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1988. p. 10.

⁴⁹BURGESS, B. K. Structure and reactivity of nitrogenase-an over view. In : VEEGER, C. and NEWTON W. E. Advances in Nitrogen Fixation Research. Martinus Nijhoff, Hingham, Mass. p. 103-114. Citado por: VANCE, Op. cit., p. 690.

aparentemente representa una pérdida de energía para el nódulo. Por cada 2NH_4^+ producidos por nitrogenasa, se utilizan 4 ATP y 2 electrones para la formación de H_2 ⁵⁰. Algunas cepas de rhizobium han desarrollado un sistema hidrogenasa de captación separada que puede oxidar H_2 a agua y, en algunos casos, unir esta oxidación para la formación de ATP⁵¹, disminuyendo así el costo de energía⁵².

El proceso de reducción de N_2 por la nitrogenasa es sensible a la presencia de O_2 lo cual explica porque organismos fijadores de nitrógeno son anaerobios o desarrollaron adaptaciones para mantener un suministro de oxígeno a una baja presión parcial. Los nódulos de la leguminosa contienen leghemoglobina la cual abastece esta función⁵³, porque facilita la difusión de oxígeno para la respiración de los bacteroides⁵⁴ en concentraciones de O_2 tales, que la producción de ATP es más eficiente y en consecuencia la actividad de la nitrogenasa es mayor. Se reconoce una correlación directa entre la concentración de leghemoglobina del nódulo y la cantidad de nitrógeno fijado⁵⁵. La presencia de esta proteína en el nódulo se puede notar por la coloración característica rosada, roja o parda⁵⁶.

3.2 INTERACCIÓN LEGUMINOSA-RHIZOBIUM

La asociación leguminosa-*Rhizobium* reviste un carácter específico, que se puede apreciar no solo en la habilidad para formar nódulos, si no también en la fijación de nitrógeno. Hardson et al⁵⁷, observaron una correlación positiva significativa entre la proporción de nódulos formados por cepas efectivas y el crecimiento de la planta, así como la fijación de N_2 . La mayor parte de las leguminosas de interés agrícola nodulan, pero existen variedades no nodulantes y además no todos los rhizobios pueden nodular las leguminosas nodulantes⁵⁸. *Psium sativum* por ejemplo, es específicamente nodulada por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y aunque una considerable diversidad puede existir dentro de esta biovariedad rhizobial⁵⁹ la arveja no es un nodulador heterogéneo como el frijol común⁶⁰, el cual puede ser nodulado por múltiples especies de rhizobios⁶¹.

⁵⁰EISBRENNER, G., and EVANS, H.J. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. En : Annual Review Plant Physiology. Vol. 34 (1983); p. 105-136. Citado por: VANCE, Op. cit., p. 690.

⁵¹VANCE, Op. cit., p. 690.

⁵²BRADLEY and NOLT, Op. cit., p. 11.

⁵³Ibid.

⁵⁴ZAHARAN, Op. cit., p.149.

⁵⁵MORA, Op. cit., p. 24.

⁵⁶SOMASEGARAN, Padma y HOBEN, Heinz. Métodos en la tecnología leguminosa-Rhizobium. Hawaii : University of Hawaii NIFTAL project and MIRCEN, 1985. p. 8

⁵⁷HARDARSON, G. et al. Evaluation of alfalfa and *Rhizobium meliloti* for compatibility in nodulation and nodule effectiveness. En : Crop. Science. Vol. 21 (1981); p. 562-567. Citado por: MONTAÑEZ, A.; DANSO, S. K. A. and HARDARSON, G. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. En : Applied Soil Ecology. Vol. 2 (1995); p. 165.

⁵⁸MORA, Op. cit., p. 21.

⁵⁹MUTCH and YOUNG, Op. cit. Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 295.

⁶⁰MATINEZ-ROMERO, Op. cit., Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 295.

⁶¹CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 295.

Un segundo nivel de especificidad se relaciona con la capacidad de fijación de nitrógeno y un tercer nivel se relaciona con la cantidad de nitrógeno fijado por asociaciones relativamente efectivas⁶².

La optimización de la simbiosis entre plantas leguminosas y sus respectivos microsimbiontes rizobiales requiere la presencia en la rizosfera de cepas de rhizobium infectivas y compatibles, las cuales son altamente eficientes fijando nitrógeno y están presentes en un número suficiente para maximizar la nodulación⁶³. Además de la efectividad, el éxito de la simbiosis, reflejada por buen rendimiento en la cosecha, depende en gran parte del desempeño del rhizobium en la nodulación. La habilidad de una cepa para colonizar nódulos depende de su competitividad⁶⁴; esta capacidad es una característica inherente a cada cepa y es independiente de su efectividad simbiótica⁶⁵. Es decir, la competitividad y la efectividad simbiótica son características independientes⁶⁶.

La base más directa de la evaluación para la efectividad en la fijación de nitrógeno es el nitrógeno total obtenido por la planta a raíz de su asociación con el rhizobium específico. Cuando las condiciones experimentales son tales que el nitrógeno asimilable es el principal factor limitante del desarrollo de la planta⁶⁷, el criterio generalmente aceptado para la efectividad es la toma del peso seco de las plantas colectadas al comienzo de la floración y suministra una base aceptable para la comparación de cepas⁶⁸.

3.3 FACTORES MEDIOAMBIENTALES QUE AFECTAN LA NODULACIÓN Y LA FIJACION DE NITROGENO.

Los factores medioambientales tienen influencia en todas las etapas de la nodulación y la fijación simbiótica de nitrógeno, en algunos casos reduciendo la supervivencia rizobial en el suelo; en otros, afectando la nodulación o incluso el crecimiento de la planta hospedante⁶⁹. Las condiciones que más limitan la fijación de nitrógeno en suelos tropicales son la baja fertilidad y pH, temperatura y humedad extremos. En América Latina hay millones de hectáreas donde la

⁶²MORA, Op. cit., p. 21.

⁶³VESSEY, Kevin and CHEMININGWA, George. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* in cultivated soil of the eastern Canadian prairie. En : Soil Biology & biochemistry. Vol. 38 (2006); p. 153.

⁶⁴MRABET, Moncef et al. Competitiveness and symbiotic effectiveness of a *R. gallicum* strain isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. En : European Journal Agronomy. Vol. 22 (2005); p. 209.

⁶⁵NICOL and THORNTON, 1941. Citado por: RAMIREZ, Margarita. Capacidad competitiva de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* con trébol blanco variedad huia (*Trifolium repens*). En : Revista suelos ecuatoriales. Vol. 27 (1997); p. 218.

⁶⁶AMARGER, N. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. En : Soil Biology Biochemical. Vol. 13 (1981); p. 481-486. Citado por: MRABET et al. Op. cit., p. 209.

⁶⁷VINCENT, J. M. Manual práctico de Rizobiología. Buenos Aires, Argentina : Hemisferio Sur, 1975. p. 92.

⁶⁸SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 148.

⁶⁹GRAHAM, Op. cit., p. 11.

agricultura está limitada por estos factores, y donde las leguminosas adaptadas podrían contribuir a aumentar la producción agrícola. En países como Colombia, Venezuela y Brasil los factores limitantes son la acidez, la deficiencia de fósforo, calcio y otros nutrientes, la toxicidad del aluminio y una época seca durante 4 o 5 meses cuando el crecimiento vegetativo es muy lento⁷⁰

3.3.1 Acidez. La concentración de ión hidrogeno, *per se*, raramente tiene un efecto directo en el crecimiento de la planta⁷¹ y es frecuentemente confundido con otros factores. Sin embargo, factores relacionados con el pH (toxicidades: aluminio, manganeso y hierro; deficiencias: fósforo, calcio, magnesio, molibdeno y potasio) tienen impacto sobre la planta hospedante⁷² y en particular sobre la leguminosa nodulada⁷³. A menudo, la nodulación de leguminosas fracasa en suelos de pH < 5⁷⁴, en parte porque el número de rhizobium se ve disminuido, debido a que la acidez puede limitar el crecimiento rhizobial y su persistencia en el suelo, pero también porque el pH del suelo limita la unión⁷⁵. La etapa sensible al pH en la nodulación ocurre en la fase temprana de la infección, o en la unión de la bacteria al pelo de la raíz o en la prolongación del pelo radical⁷⁶.

3.3.2 Temperatura. El *Rhizobium* es mesófilo y la mayoría de los bacteroides rhizobiales no crece por abajo de 10°C o por encima de 37°C⁷⁷; el rango de temperatura óptima para crecer en cultivo es de 28-31°C y muchos son incapaces de crecer a 38°C⁷⁸. La temperatura durante el envío y almacenamiento del inoculante, la inoculación de la semilla y la siembra son particularmente críticas. La temperatura también afecta el crecimiento del nódulo, la fijación de nitrógeno, el periodo por el cual los nódulos permanecen activos⁷⁹ y las habilidades competitivas de las cepas para la nodulación⁸⁰. La temperatura óptima para la nodulación y la fijación de nitrógeno varía entre especies (y géneros) pero está

⁷⁰MORA, Op. cit., p. 29.

⁷¹VON UEXKULL, H. R. and MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In : DATE, R. A. et al. Plant-Soil Interactions at low pH : Principles and Management. Dordrecht, Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 5-19. Citado por: DATE, Op. cit., p. 130.

⁷²FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In : ADAMS, F. Soil Acidity and Liming. USA : American Society of Agronomy, 1984. p. 57-97. Citado por: DATE, Op. cit., p. 130.

⁷³DATE, Op. cit., p. 130.

⁷⁴MORALES, V. M.; GRAHAM, P. H. y CARVALHO, R. Influencia del metodo de inoculacion y el enclamiento del suelo de Carimagua (Llanos Orientales, Colombia) en la nodulación de leguminosas. En : Turrialba. Vol. 23 (1973); p. 52-55. Citado por: DATE, Op. cit., p. 130.

⁷⁵GRAHAM, Op. cit., p. 14.

⁷⁶MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid sensitive steps. En : Plant Soil. Vol. 28 (1968); p. 129-146. Citado por: DATE, Op. cit., p. 130-131.

⁷⁷GRAHAM, Op. cit., p. 14.

⁷⁸GRAHAM, P. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. En : Can. J. Microbiol. Vol. 38 (1992); p. 475-484. Citado por: ZAHARAN, Op. cit., p. 148.

⁷⁹GRAHAM, Biological dinitrogen fixation : symbiotic associations, Op. cit., p. 15.

⁸⁰HARDARSON, G. and Jones, D.G. Effect of temperature on competition amongst strains of *Rhizobium trifolii* for nodulation of two white clover varieties. En : Ann. Appl. Biol. Vol. 92 (1979); p. 229-236. Citado por: MONTAÑEZ, A.; DANSO, K. A. and HARDARSON, G. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. En : Applied Soil Ecology. Vol. 2 (1995); p. 165-174

dentro de un rango pequeño cerca de 30°C⁸¹. Se ha determinado que nódulos formados por una cepa efectiva a altas temperaturas (35 y 38°C) son inefectivos⁸².

En cuanto a las leguminosas, la temperatura óptima para muchas de ellas es alrededor de 25°C; la exposición a temperaturas mayores de 40°C, incluso por periodos cortos, causa perdida irreparable de la función del nódulo⁸³.

3.3.3 Toxicidad del aluminio y manganeso. Los iones tóxicos de aluminio y manganeso aparecen en suelos entre pH 4.8 y 5.5. El ion tóxico Al³⁺ incrementa enormemente entre pH 4.8 y 4.2⁸⁴. El crecimiento de pelos radiculares de la leguminosa y el rhizobio es afectado por estos iones⁸⁵, debido a que limitan los sitios disponibles para la infección de las raíces por la bacteria⁸⁶, aunque la magnitud varía entre especies⁸⁷ y genotipos⁸⁸. Las cepas de *Rhizobium* pueden ser tolerantes a altos niveles de aluminio, pero si la planta no es tolerante, no habrá condiciones para la formación de los nódulos⁸⁹. La toxicidad del aluminio y manganeso está asociada con bajos niveles de calcio y puede ser sometida encalando el suelo⁹⁰. Se han obtenido buenos resultados cubriendo con cal la semilla y posteriormente sembrando⁹¹.

3.3.4. Hierro. Es un componente de la leghemoglobina, la cual funciona en la regulación del oxígeno suministrado al bacteroide. También se encuentra en las Fe- y FeMo- proteínas del complejo nitrogenasa y es esencial para el desarrollo temprano del nódulo. Plantas deficientes en Fe desarrollan muchos nódulos

⁸¹GIBSON, A. H. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation in legumes. En : Plant Soil. Special Vol. (1971); p. 139-152. Citado por: DATE, Op. cit., p. 132.

⁸²MONTAÑEZ, A.; DANSO, S.K.A. and HARDARSON, G. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. En : Applied Soil Ecology. Vol. 2 (1995); p. 165. p. 165-174

⁸³GRAHAM, Peter H. Biological dinitrogen fixation: symbiotic associations, Op. cit., p. 15.

⁸⁴EDMEADES, D. C.; BLAMEY, F. P. C. and FARINA, M. P. W. Techniques for assessing plant responses on acid soils. In : DATE, R. A. et al. Plant-Soil Interactions at Low pH : Principles and Management. Dordrecht, Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 221-233. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁸⁵BLAMEY, P. F. C.; EDWARDS, D. G. and ASHER, C. J. Effects of aluminium, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. En : Soil Sci. Vol. 136 (1983); p. 197-207. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁸⁶MORA, Op. cit., p. 29.

⁸⁷MASCARENHAS, H. A. et al. Performance of soybean cultivars at different concentrations of manganese in solution. In : DATE, R. A. et al. Plant-Soil Interactions at Low pH : Principles and Management. Dordrecht, Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 371-373. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁸⁸HUTTON, E. M.; WILLIAMS, W. T. and ANDREW, C. S. Differential tolerance to manganese in introduced and bred lines of *Macroptilium atropurpureum*. En : Aust. J. Agric. Res. Vol. 29 (1978); p. 67-79. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁸⁹MORA, Op. cit., p. 29.

⁹⁰RIOS, V.; MARTINI, A. y TEJEIRA, R. Efecto del encalado sobre la acidez y el contenido de aluminio y hierro extraíble en nueve suelos de Panamá. En : Turrialba. Vol. 18 (1968); p. 139-146. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁹¹MORALES, V. M.; GRAHAM, P. H. and CARVALLO, R. Influencia del método de inoculación y el encalamiento del suelo de Carimagua (Llanos Orientales, Colombia) en la nodulación de leguminosas. En : Turrialba. Vol. 23 (1973); p. 52-55. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

iniciales, pero pocos funcionales. Tanto la planta hospedante y la cepa pueden diferir en la eficiencia de utilización de hierro⁹².

3.3.5. Deficiencia de calcio y fósforo. El tiempo requerido para la nodulación y eficiencia de la fijación de nitrógeno, puede estar relacionado con el suministro de calcio y fósforo⁹³. Los bajos niveles de calcio retrasan la nodulación en las diferentes leguminosas, las cuales varían en sus niveles críticos para la nodulación. El calcio también es importante para la supervivencia rhizobial a pH bajo⁹⁴.

En cuanto al fósforo, plantas leguminosas, dependientes de la fijación de N₂, comúnmente requieren más fósforo que plantas similares provistas con fertilizantes nitrogenados. Los nódulos se constituyen en un importante sumidero de fósforo, y comúnmente tienen la más alta concentración de este elemento en la planta, debido al alto costo de energía para la fijación de N₂⁹⁵.

En presencia de aluminio y pH <5 el fósforo se puede inmovilizar como un complejo aluminio-hierro. Aunque esto, puede no evitar el crecimiento del *Rhizobium*, especialmente en *Bradyrhizobium*, el cual tiene un requerimiento muy bajo de fósforo (0.01-1µm)⁹⁶, retrasa o incluso inhibe la nodulación⁹⁷. Se ha podido determinar que cultivos de leguminosas limitados en fósforo son más lentos en la formación de nódulos⁹⁸

3.4 SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIUM

El éxito de una cosecha de leguminosa de grano, depende de la capacidad de la leguminosa para establecer una simbiosis efectiva en la fijación de nitrógeno con los nódulos de la raíz y la bacteria. Cuando las cepas efectivas de rhizobium no están presentes en el suelo ellas pueden ser suministradas por inoculación de la semilla con cepas seleccionadas⁹⁹. La inoculación con cepas de Rhizobium, con el propósito de aumentar la fijación de N₂ y el rendimiento de una cosecha de leguminosas, es posiblemente el más antiguo y el más común de los métodos de

⁹²GRAHAM, Biological dinitrogen fixation : symbiotic associations. Op. cit., p. 18.

⁹³GRAHAM, P. H. and ROSAS, J. C. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. En : Agron. J. Vol. 71 (1979); p. 925-926. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁹⁴DATE, Op. cit., p. 131.

⁹⁵GRAHAM, Biological dinitrogen fixation : symbiotic associations. Op. cit., p. 16.

⁹⁶WILD, A. Plant nutrients in soil: phosphate. In : Longman Scientific (Ed.), Russell's Soil Conditions and Plant Growth. Harlow, UK : Longman Scientific, 1988. p. 695-742. citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁹⁷CASSMAN, K. G.; MUNNS, D. M. and BECK, P. Growth of Rhizobium strains at low concentrations of phosphate. En : Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 45 (1981); p. 520-523. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁹⁸MULLEN, M.D.; ISRAEL, D.W. and WOLLUM, A.G.I. Effects of Bradyrhizobium japonicum and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. En : Applied Environmental Microbiology. Vol. 54 (1988); p. 2387-2392. Citado por: DATE, Op. cit., p. 131.

⁹⁹DATE, Op. cit., p. 123.

liberación voluntaria de microorganismos dentro del medio ambiente¹⁰⁰. Idealmente se requiere inoculación con cepas seleccionadas en los siguientes escenarios¹⁰¹:

★En la ausencia de rhizobios residentes compatibles, donde la densidad de población rhizobial residente es muy baja, o donde los rhizobios residentes son menos infectivos o menos efectivos en la fijación de N₂ que cepas alternativas (inóculo)¹⁰².

★Cuando la leguminosa no ha sido cultivada previamente en el terreno o no esta simbióticamente relacionada a ningún cultivo de leguminosa en el pasado inmediato.

★Cuando la cosecha cultivada previamente en el terreno fue pobremente nodulada.

★En una rotación, cuando la leguminosa siguió a una cosecha de una no-leguminosa.

Los suelos escasos en rhizobios compatibles se encuentran en áreas donde los niveles de pH, estrés osmótico, altas temperaturas y metales pesados son perjudiciales para las poblaciones rhizobiales¹⁰³. Estos lineamientos se constituyen en el primer prerrequisito del establecimiento de un programa de selección de cepas. La determinación de la necesidad de la inoculación.

El segundo prerrequisito a tener en cuenta es el establecimiento del criterio de la necesidad de seleccionar cepas convenientes para las plantas hospederas y la región de interés¹⁰⁴.

Por conveniencia, las siguientes características propias de cada cepa pueden ser agrupadas dentro una secuencia de evaluación¹⁰⁵.

★Una cepa de rhizobium-inoculo debe ser capaz de formar nódulos altamente efectivos en la fijación de nitrógeno en el hospedante para el cual este es recomendado y debe ser capaz de hacerlo bajo un rango amplio de condiciones

¹⁰⁰CATROUX, G.; HARTMANN, A. and REVELIN, C. Trends in rhizobial inoculant production and use. En : Plant and Soil. Vol. 230 (2001); p. 21–30. Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 294.

¹⁰¹DATE, Op. cit., p. 124.

¹⁰²HANSEN, A. P. Symbiotic N₂ fixation of crop legumes : achievements and perspectives. Germany : Centre for Agriculture in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, 1994. p. 248. Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 294.

¹⁰³AMARGER, N. The microbial aspects of faba bean cultura. En : BECK, D. P. and MATERON, L. A. Nitrogen fixation by legumes in Mediterrean Agriculture. Dordrecht : Marthinus Nijhoff, 1988. p. 173-178. Citado por: CHEMINING'WA and VESSEY, Op. cit., p. 294.

¹⁰⁴DATE, Op. cit., p. 127.

¹⁰⁵DATE, R. A. Inoculation of tropical pasture legumes. Exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. En : Misc. Publ. No. 145 (1977); p. 293-311. Citado por: DATE, Op. cit., p. 127.

de campo¹⁰⁶. Usualmente el paso inicial es la evaluación en una cámara de crecimiento o un estudio de invernadero con numerosas cepas obtenidas de otras colecciones o del suelo¹⁰⁷.

★La habilidad competitiva en la rizosfera y en la formación de nódulos, la supervivencia y persistencia en el suelo, en presencia o ausencia de una planta hospedante.

★Prontitud para formar nódulos activos fijando nitrógeno a altas y bajas temperaturas, tolerancia a pesticidas, bajo pH del suelo y la habilidad para formar nódulos en plantas de semillero en presencia de un nivel alto de nitrógeno en el suelo.

★Facilidad de crecimiento en el medio de cultivo, crecimiento y supervivencia en cultivo turba y habilidad para sobrevivir en la semilla inoculada¹⁰⁸.

3.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE *Rhizobium leguminosarum*: FUENTES NITRÓGENADAS Y CARBONADAS

Las diferencias observadas entre organismos se deben a diferencias en el funcionamiento de los genes. Los organismos más estrechamente relacionados tienen pocas diferencias genéticas entre ellos, por lo cual es relativamente simple caracterizar géneros pero es más difícil distinguir cepas¹⁰⁹. Una cepa puede ser reconocida como tal por una peculiar combinación de un gran número de caracteres, o bien eligiendo una o dos de las características más específicas. La validez de este reconocimiento dependerá de la estabilidad de las características examinadas (ausencia de variaciones genéticas, reproducibilidad de la técnica) y de la certeza de que no existen otras cepas que compartan esas mismas propiedades¹¹⁰.

El reconocimiento de cepas es importante para estudios ecológicos, de competición y supervivencia, éxito y persistencia de organismos inoculados¹¹¹. Sin embargo, este proceso requiere contar con un marcador de reconocimiento que debe ser suficientemente diferente de las cepas de tipo nativo y adaptables a una detección simple pero eficiente; estable a través de cultivos repetidos o de almacenaje prolongado y no debe diferir significativamente de la cepa parental en propiedades claves tales como la nodulación o la fijación de nitrógeno¹¹².

¹⁰⁶VINCENT, J. M. Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume. Soil Nitrogen (Agronomy Series Monograph No. 10). American Society of Agronomy, 1965. p. 384-435. Citado por: DATE, Op. cit., p. 127.

¹⁰⁷GRAHAM, Biological dinitrogen fixation : symbiotic associations. Op. cit., p. 20.

¹⁰⁸DATE, Op. cit., p. 127.

¹⁰⁹LUQUE, Op. cit., p.14.

¹¹⁰VINCENT, Manual practico de rizobiología, Op. cit., p. 19.

¹¹¹BERINGER, J. E. Genetic Finger Printing as a Tool in Research on Biological Nitrogen fixation. En : GRAHAM and HARRIS. Biological Nitrogen Fixation Tecnology for Tropical Agriculture. Cali, 1981, p. 33-52. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 14.

¹¹²SCHWINGHAMER E. A. and DUDMAN W.F. En : Appl. Bacteriol. Vol. 36 (1973); 263-272. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 5.

La habilidad de los organismos para utilizar sustancias como fuentes de carbono y nitrógeno, puede ser usada para la caracterización de cepas. Dos organismos pueden o no utilizar el mismo método químico para sintetizar un determinado compuesto esencial para el metabolismo o para la consecución de moléculas¹¹³. Las características bioquímicas se aplican generalmente a la clasificación taxonómica de los microorganismos pero también se pueden utilizar para la identificación de cepas, a nivel de colonias, sobre agar¹¹⁴.

3.5.1 Nutrición en el suelo y en la rizosfera. La diversidad metabólica de rizobios esta reflejada en sus extensos y complejos genomas¹¹⁵. Muchos genes están dedicados al transporte, regulación y a un amplio rango de sistemas catabólicos¹¹⁶. Por ejemplo, *Rhizobium* tiene ~170 ATP-ligados en un sistema de transporte tipo cassette (ABC), los cuales lo habilitan para acceder a un gran rango de nutrientes presentes en bajas concentraciones en el suelo y en la rizosfera de la planta. Los exudados de la raíz de la planta contienen una enorme variedad de diferentes compuestos¹¹⁷ y pueden secretar aproximadamente el 21% del fotosintato fijado¹¹⁸. Una variedad de diferentes azúcares incluyendo ácido galacturónico, manosa y ramnosa también están presentes en los exudados y en el mucílago de la raíz de las leguminosas¹¹⁹.

De igual forma, los exudados de las raíces contienen también concentraciones relativamente altas de aminoácidos, especialmente glutamato¹²⁰. En *R. meliloti*, este argumento es especialmente fuerte porque el glutamato y glutamina son usados como grupo amino dador en un gran número de reacciones biosintéticas¹²¹, la cantidad de estos aminoácidos necesarios para el crecimiento es mucho más grande que el promedio¹²².

¹¹³PALLERONI, N. J. Principios generales de Microbiología. 2 ed. Washington : Secretaría general de la Organización de Estados Americanos, 1980. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 14.

¹¹⁴SCHWINGHAMER E. A. and DUDMAN W.F, Op. cit. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 4.

¹¹⁵PRELL, Juergen and POOLE, Philip. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. En : Trends in Microbiology. Vol. 16, No. 4 (apr. 2006); p. 161. p. 161-168

¹¹⁶BOUSSAU, B. et al. Computational inferences of scenarios for proteobacterial genome evolution. En : Proc. Natl. Acad. Sci.. Vol. 101 (2004); p. 9722-9727. Citado por: PRELL and POOLE, Op. cit., p. 161.

¹¹⁷BERTIN, C. et al. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. En : Plant Soil. Vol. 256 (2003); p. 67–83. Citado por: PRELL and POOLE, Op. cit., p. 161.

¹¹⁸WALKER, T. S. et al. Root exudation and rhizosphere biology. En : Plant Physiol. Vol. 132 (2003); p. 44–51. Citado por: PRELL and POOLE, Op. cit., p. 161.

¹¹⁹KNEE, E. M. et al. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. En : Mol. Plant Microbe Interact. Vol. 14 (2001); p. 775–784. Citado por: PRELL and POOLE, Op. cit., p. 161.

¹²⁰KAHN, M.L; KRAUS, J and SHATTERS, R.G. Bacterial catabolism of nitrogen containing compounds in symbiotic nitrogen fixation. En: O'GARA, F.; MANIAN, S. and DREVN, J. Physiological Limitations and the genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation. Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 22.

¹²¹RICHEY, B. et al. Variability of intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. En : J. Biol. Chem. Vol. 262. (1987); p. 7157-7164. Citado por: KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA; MANIAN and DREVN, Op. cit., p. 23.

¹²²KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA; MANIAN and DREVN, Op. cit., p. 23.

Realmente, la diversidad nutricional del suelo y la rizosfera donde fuentes individuales de carbono y nitrógeno no son dominantes, indica que un estilo de vida oligotrófico podría ser la estrategia más exitosa. Esto podría explicar porque el rhizobium no usa el estricto control catabólico visto en enterobacterias: incluso el rhizobium tiene una jerarquía de preferencia de fuentes de carbono¹²³.

3.5.2 Requerimientos nutricionales durante la simbiosis. En la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, la planta suministra a la bacteria el carbono y la energía y en recompensa obtiene amonio producido por fijación bacteriana de nitrógeno¹²⁴.

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, requiere de un suministro substancial de sustratos para la respiración, abastecido directa o indirectamente por la fotosíntesis, para proveer la energía para el tren metabólico asociado con la actividad nitrogenasa en los nódulos de la raíz¹²⁵. Estudios realizados con bacteroides aislados de soya indican que sustratos como glutamato y aspartato son utilizados activamente para mantener la respiración en el nódulo y la actividad de fijación de nitrógeno¹²⁶. Se ha podido determinar que mutantes de *R. meliloti* defectivos para crecer en glutamato como única fuente de carbono y nitrógeno, presentan debilitamiento en su capacidad de fijar nitrógeno, de aquí la propuesta para la determinación del glutamato como una fuente de carbono para *Rhizobium* durante la simbiosis¹²⁷.

De igual forma, en diferentes asociaciones *Rhizobium*-leguminosa, la planta huésped puede suministrar a la bacteria algunos aminoácidos tales como cisteína, metionina, arginina, glicina, triptófano y fenilalanina durante todo el proceso simbiótico¹²⁸. Mutantes auxotróficos aislados de *R. meliloti* para los aminoácidos glicina, cisteína y metionina fueron efectivos en la fijación de nitrógeno¹²⁹. Por el

¹²³PRELL and POOLE, Op. cit., p. 161.

¹²⁴EMERICH, D. W.; LEPO, J. E. and EVANS, H. J. Nodule met Nitrogen fixation. Oxford : W. J. Broughton, 1983, v. 3. p. 213-244. Citado por: KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA, F., MANIAN and DREVON, Op. cit. p. 21.

¹²⁵RYLE, G.C.A. The influence of host plant energy supplied on nitrogen fixation. En: O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p. 3.

¹²⁶KOUCHI, H. and FUKAI, K. Absorption and utilisation of aspartate and glutamate by soybean nodule bacteroids. In: BOTHE, H.; DE BRUIJN, F. J. and NEWTON W. E. Proceedings of 7th International Congress on Nitrogen Fixation. New York : Gustav Fischer, Stuttgart, 1988. p. 561. Citado por: O' GARA, F. et al. Carbon metabolism and catabolite repression in *Rhizobium* spp. En : FEMS Microbiology Reviews. Vol. 63 (1989); p. 96.

¹²⁷FITZMAURICE, A. M. and O'GARA, F. Involvement of glutamate as a carbon source in supporting nitrogen fixation activity in *R. meliloti*. In: BOTHE, H.; DE BRUIJN, F. J. and NEWTON W. E. Proceedings of 7th International Congress on Nitrogen Fixation. New York : Gustav Fischer, Stuttgart, 1988. p. 558. Citado por: O' GARA, F. et al. Op. cit., p. 96.

¹²⁸DENARIE, J.; TRUCHET, G and BERGERON, B. Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*. En : NUTMAN, P. S. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Great Britain : Cambridge University Press, 1976. p. 53. ISBN 0-521-20645-6.

¹²⁹SCHERRER, A and DÉNARIÉ, J. Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* and of their prototrophic revertants. En : Plant and Soil. Special Vol. (1971); p. 39-45. Citado por: DENARIE; TRUCHET and BERGERON. Op. cit., p. 51.

contrario, cepas demandantes de leucina fueron inefectivas. Los mutantes de leucina inducen deformaciones las cuales más tarde se convierten en pequeños nódulos completamente inefectivos. Las bacterias son incapaces de abandonar el hilo de infección a través del citoplasma hospedante. Los núcleos de células de la zona medular son pequeños y el meristemo nodular tiene una actividad muy limitada. Es interesante notar que mutantes demandantes de aminoácidos son frecuentemente efectivos. Por lo tanto parece que la leucina juega un papel particular. Pueden considerarse tres hipótesis: i) el requerimiento de leucina por el *Rhizobium* es mucho mayor en la planta que para cualquiera de los otros aminoácidos, ii) la permeabilidad de la membrana es más débil para la leucina que para otros aminoácidos, o iii) la bacteria suministra a las plantas leucina para permitir el desarrollo del nódulo¹³⁰.

El suministro de carbono a los bacteroides se considera un paso crítico y limitante para la fijación de nitrógeno¹³¹. La función del nódulo incluye mantenimiento y actividad nitrogenasa, lo cual depende de un adecuado suministro de carbohidrato a la planta. Durante la fase vegetativa, la actividad de fijación de nitrógeno alcanza un máximo y disminuye como la competición por carbohidratos al comienzo de la formación de la semilla¹³².

Inicialmente, los componentes de la superficie de la célula bacterial, tales como oligo y polisacáridos son reconocidos por ser señaladores cruciales para muchas relaciones microorganismo-hospedero. Carbohidratos simbióticamente relacionados con rhizobio incluyen exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), y β -glucanos cíclicos¹³³. Una serie de estudios de diferentes asociaciones rhizobio-leguminosa mostraron que mutantes defectuosos en la síntesis de cualquiera de estos carbohidratos son incapaces de infectar el hospedero exitosamente y/o formar nódulos efectivos en la fijación de dinitrógeno. Los resultados indican que los poli-y oligosacáridos rhizobiales podrían jugar un papel importante en el proceso de nodulación probablemente como señales para la planta hospedante. La ausencia de LPS y β -glucanos cíclicos, correlacionada con nódulos inefectivos y no-funcionales, soporta esta hipótesis¹³⁴.

Todas estas observaciones indican un papel esencial para EPS, LPS y β -glucanos cíclicos o moléculas derivadas de estos carbohidratos, como compuestos señaladores, actuando posiblemente como supresores de reacciones de defensa de la planta en la simbiosis. Aunque estos efectos parecen ser específicos y

¹³⁰DENARIE, J.; TRUCHET, G and BERGERON, B. Op. cit., p. 51-54.

¹³¹RYLE, G. J. A.; POWELL, C. E. and GOREDON, A. J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. I. Nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root. En : J. Exp. Bot. Vol. 30 (1979); p. 135-144. Citado por: O' GARA et al, Op. cit., p. 93.

¹³²BRADLEY and NOLT, Op. cit., p. 17.

¹³³BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. En : Trends Plant Science. Vol. 1 (1996); p. 233-240. Citado por: MITHÖFER, Axel. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. En : Trends in Plant Science. Vol. 7, No. 10 (oct. 2002); p. 441.

¹³⁴MITHÖFER, Op. cit., p. 440.

probablemente restringidos para distintas interacciones rizobio-hospedero, este modelo implicaría la existencia de receptores específicos de plantas envueltos en el reconocimiento de las señales¹³⁵.

Otros compuestos de carbono más simples, liberados en el nódulo son principalmente monosacáridos y disacáridos, especialmente glucosa y sacarosa¹³⁶. Sin embargo fuertes argumentos indican que estos compuestos no son fuentes de carbono primarias para los bacteroides¹³⁷. Por lo tanto, estos azúcares probablemente son convertidos por las plantas en otros compuestos los cuales son liberados al bacteroide a través de la membrana peribacteroidal (MPB)¹³⁸. Al contrario, se ha podido determinar que ácidos orgánicos, no hexosas son transportados activamente a través de la MPB y las membranas del bacteroide¹³⁹. Los ácidos orgánicos parecen ser la mejor fuente de energía para los bacteroides¹⁴⁰, porque se constituyen en los sustratos más efectivos para la respiración y desarrollo de la fijación de nitrógeno por los bacteroides aislados¹⁴¹. Mutantes dependientes de hexosas y sacarosa y mutantes defectivos en el metabolismo de hexosas formaron todos nódulos efectivos en la fijación de nitrógeno indicando que el transporte y metabolismo de estos compuestos no es un prerequisite para la operación de una simbiosis funcional¹⁴². En cambio, mutantes defectivos en el transporte de ácido dicarboxílico, generalmente son incapaces de fijar nitrógeno¹⁴³.

3.6 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Cuando un inoculo de alta densidad rizobial se introduce en un medio que contiene antibióticos, unas pocas cepas pueden exhibir resistencia como resultado de cambios genéticos o mutaciones. Esta resistencia del *Rhizobium* a un antibiótico particular es una característica útil como marcador porque se constituye en una herramienta válida para el reconocimiento de cepas rizobiales¹⁴⁴; además

¹³⁵MITHÖFER, Op. cit., p. 440.

¹³⁶EMERICH; LEPO and EVANS. Op. cit. Citado por: KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA, F., MANIAN and DREVON, Op. cit. p. 21.

¹³⁷DILWORTH, M. J. and GLENN, A. R. En : LUDDEN, W. and BURRIS, J. E. Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. New York : Elsevier, 1985. p. 53-61. Citado por: KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA; MANIAN and DREVON. Op. cit., p. 21.

¹³⁸KAHN; KRAUS and SHATTERS. Op. cit., En: O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p. 21.

¹³⁹DE VRIES, G.E.; VAN BRUSSEL, A. N. and QUISPEL, A. Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*. En : J. Bacteriology. Vol. 149 (1982); p. 872-879. Citado por: O' GARA et al. Op. cit., p. 94.

¹⁴⁰FINAN, T.M; WOOD, J. M. and JORDAN, D. C. Succinate transport in *Rhizobium leguminosarum*. En : J. Bacteriology. Vol. 148 (1981); p. 193-202. Citado por: O' GARA et al. Op. cit., p. 94.

¹⁴¹BURRIS, R. H. and WILSON, P. W. Respiratory enzyme systems and symbiotic nitrogen fixation. En : Cold Spring Harbor symp. Quant. Biolo. Vol. 7 (1939); p. 349-361. Citado por: O' GARA et al. Op. cit., p. 95.

¹⁴²ARIAS, A.; GARDIOL, A. and MARTINEZ-DRETS, G. Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium melliloti*. En : J. Bacteriology. Vol. 151. (1982); p. 1069-1072. Citado por: O' GARA et al. Op. cit., p. 94.

¹⁴³O' GARA et al. Op. cit., p. 94.

¹⁴⁴SOMASEGARAN and HOBEN, Op. cit., p. 71.

el uso de marcadores resistentes a antibióticos es una técnica relativamente económica y no requiere de equipo sofisticado¹⁴⁵. Sin embargo, se precisa que el mutante sea estable durante los procesos de infección, nodulación, fijación de nitrógeno y subsiguiente reaslamiento¹⁴⁶.

Los antibióticos más comúnmente usados con este propósito son estreptomina, espectinomicina y rifampicina¹⁴⁷. La resistencia a estreptomina se usa frecuentemente como marcador rizobial. Los mutantes resistentes a este aminoglicósido son estables, tienen una baja incidencia de resistencia cruzada y no es frecuente la pérdida de su capacidad simbiótica¹⁴⁸.

Un estudio de la asociación entre la resistencia a antibióticos y la modificación de la efectividad en mutantes espontáneos de *R. leguminosarum*, *R. meliloti* y *R. trifolii* diferenció tres grupos de antibióticos acorde a la modificación de las propiedades simbióticas. En el grupo I, resistentes a cloranfenicol, espectinomicina, espiramicina y estreptomina, la mayoría de los mutantes no pierden su efectividad. Estos antibióticos inhiben la síntesis de proteína. Estas mutaciones pueden ser usadas como marcadores genéticos en estudios ecológicos¹⁴⁹. En el grupo II resistentes a novobiocina, penicilina y vancomicina, hay pérdida parcial o total de la efectividad en alrededor del 50% de los mutantes. Estos antibióticos son conocidos por inhibir la síntesis de la pared celular o membrana celular. En el grupo III, resistentes a neomicina y viomicina, la mayoría de los mutantes son completamente inefectivos. El modelo de acción de estos antibióticos involucra la inhibición de síntesis de proteína¹⁵⁰.

Las fuentes potenciales de error descritas por Luque¹⁵¹ al usar esta técnica son:

★Composición del medio: la composición de todos los constituyentes del medio de crecimiento, debe ser constante y el medio se debe preparar usando el mismo grado y marca de reactivos. El número de iones presentes en un extracto de levadura puede ser ampliamente diferente de los presentes con otra marca y esto puede afectar en forma diferencial el crecimiento de las cepas y la resistencia a antibióticos.

★Esterilización del medio y fusión: el medio de crecimiento se debe esterilizar siempre y fundir en la misma forma. Si el medio se calienta durante diferentes

¹⁴⁵SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 74.

¹⁴⁶Ibid., p. 71.

¹⁴⁷SCHWINGHAMER E. A and DUDMAN W. F., Op. cit. Citado por: LUQUE, Op. cit., p.11.

¹⁴⁸SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 71.

¹⁴⁹IMSHENETSKII, A. A; PARIISKAYA, A. N. and ERRAIZ LOPEZ, L. Experimental production of mutants of *Rhizobium meliloti* with increased activity. *En* : Microbiology. Vol. 39 (1970); p. 294-297. Citado por: DENARIE; TRUCHET and BERGERON. Op. cit., p. 48.

¹⁵⁰DENARIE; TRUCHET and BERGERON. Op. cit., p. 51.

¹⁵¹LUQUE, Op. cit., p. 12.

períodos de tiempo o a temperaturas diferentes, su composición puede variar también, lo cual afecta el crecimiento.

★Antibióticos: Se debe usar el mismo proveedor ya que la fuerza y formulación de los antibióticos puede variar entre diferentes fabricantes. La potencia de todos los antibióticos decrece con la edad. El congelamiento y el deshielo repetido de los antibióticos, se debe evitar tanto como sea posible.

★Condición del inóculo: La sensibilidad de algunos antibióticos (tal es el caso de la penicilina) puede depender de la fase de crecimiento celular por lo cual es aconsejable usar un inóculo en un estado razonablemente uniforme de crecimiento. Las células en fase estacionaria pueden sobrevivir a la exposición a un antibiótico al cual normalmente se consideran sensibles y luego, comenzar a crecer de nuevo después de que la concentración del antibiótico en el medio ha decrecido por debajo del valor umbral contra esa cepa particular.

★Espesor de la placa: Si el espesor de la placa varía, variará también la morfología de la colonia; por ejemplo, la goma sólo se puede producir por colonias grandes haciendo difícil establecer la diferencia entre el control y las placas con antibióticos, si son de distinto espesor. También se deben descartar las placas con burbujas debido a su carencia de homogeneidad.

★Secado de placas: Como las placas se deben usar inmediatamente, no se debe practicar el secado a menos que se disponga de una cabina de flujo laminar estéril. Si las placas se secan, se debe utilizar el mismo procedimiento en cada ocasión.

★Contaminación: Las placas contaminadas se deben descartar ya que los productos residuales pueden ser sinérgicos con, o destruir, los antibióticos y estos efectos pueden ser permeables a la placa total y no sólo a la región donde el contaminante está creciendo. Por la misma razón las cepas de *Rhizobium* de crecimiento rápido y de crecimiento lento no se deben examinar en la misma placa¹⁵².

¹⁵²RUPELA, O. P. et al. Application of Inherent Antibiotic Resistance to Ecological Studies of Rhizobia. En : GRAHAM and HARRIS. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Cali : CIAT, 1981. p. 625-629. Citado por: LUQUE, Op. cit., p. 14.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCION DE NODULOS Y AISLAMIENTO DEL RHIZOBIUM

Para el aislamiento de bacterias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* a partir de nódulos, se seleccionaron diez plantas de arveja (*Psium sativum*) procedentes de la vereda El Rosal de San Juan, Municipio de Ipiales. En campo, las plantas se eligieron por su apariencia vigorosa, hojas verdes y sanas¹⁵³, gran cantidad de nódulos de coloración rosada, roja o parda como característica de la presencia de leghemoglobina en los nódulos activos y fijadores de nitrógeno¹⁵⁴ presentes en la raíz principal y raíces laterales de la planta. El muestreo se realizó con una distancia de 10 metros entre planta y planta, y se extrajo cuidadosamente la raíz principal y las laterales. Cada planta completa se colocó en una bolsa plástica y se llevó al Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Universidad de Nariño.

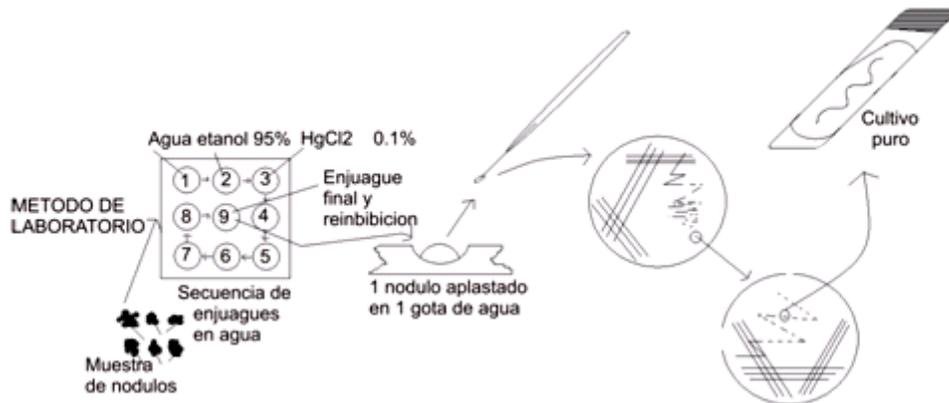
En el laboratorio, se siguió la metodología descrita por Somasegaran y Hoben¹⁵⁵ para el aislamiento; las raíces se lavaron con agua del grifo hasta remover completamente el suelo y se separaron los nódulos de la raíz, posteriormente los nódulos seleccionados por planta se desinfectaron exteriormente con etanol al 95 %, durante 5 minutos e hipoclorito de calcio al 3% durante 5 minutos y se enjuagó en 5 cambios de agua estéril. Los nódulos estériles seleccionados por su tamaño y color rosado se comprimieron con ayuda de una pinza sobre una gota de agua estéril en una caja petri con medio de cultivo levadura-manitol-agar (LMA) conteniendo rojo congo (anexo B); se estrió el contenido del nódulo en el medio y se incubó en posición invertida en la oscuridad a 27°C, durante cinco (5) días, como se indica en la figura 2.

¹⁵³CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Simbiosis Leguminosa-Rhizobio : manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali : Artes graficas del CIAT, 1988. p. 2-1.

¹⁵⁴SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 7-8.

¹⁵⁵Ibid., p. 8-9.

Figura 2. Procedimiento de aislamiento utilizado por Date y Halliday



Fuente: SOMASEGARAN y HOBEN¹⁵⁶

Se seleccionaron colonias individuales típicas de *Rhizobium* y se subcultivaron en LMA con azul de bromotimol (BTA) (anexo B), LMA con Rojo Congo (anexo B) y peptona glucosa agar (anexo B), hasta observar un crecimiento homogéneo de las colonias y poder considerar el aislado libre de contaminantes. A los diez aislados puros obtenidos se les realizó la prueba de tinción Gram (anexo C) como método para confirmar su pureza y entonces se denominaron como LFBN* 101, LFBN 102, LFBN 103, LFBN 104, LFBN 105, LFBN 106, LFBN 107, LFBN 108, LFBN 109 y LFBN 110 y se almacenaron en tubos de ensayo de tapa rosca con agar inclinado. Finalmente, los cultivos de *Rhizobium* se preservaron en perlas de porcelana.

Para la conservación sobre perlas de porcelana, se inoculó un erlenmeyer que contenía 10 ml de Medio de Levadura Manitol (LM) con el aislado puro suspendido en agar inclinado, se tapó con un tarugo de algodón y se incubó hasta alcanzar la turbidez máxima (5 días), en un agitador rotatorio. Las perlas de porcelana se lavaron, se esterilizaron en autoclave y se secaron en el horno a 150°C, durante 1 hora al cabo de la cual se transfirieron asépticamente al caldo de cultivo en el erlenmeyer y se dejaron remojar durante 3 horas.

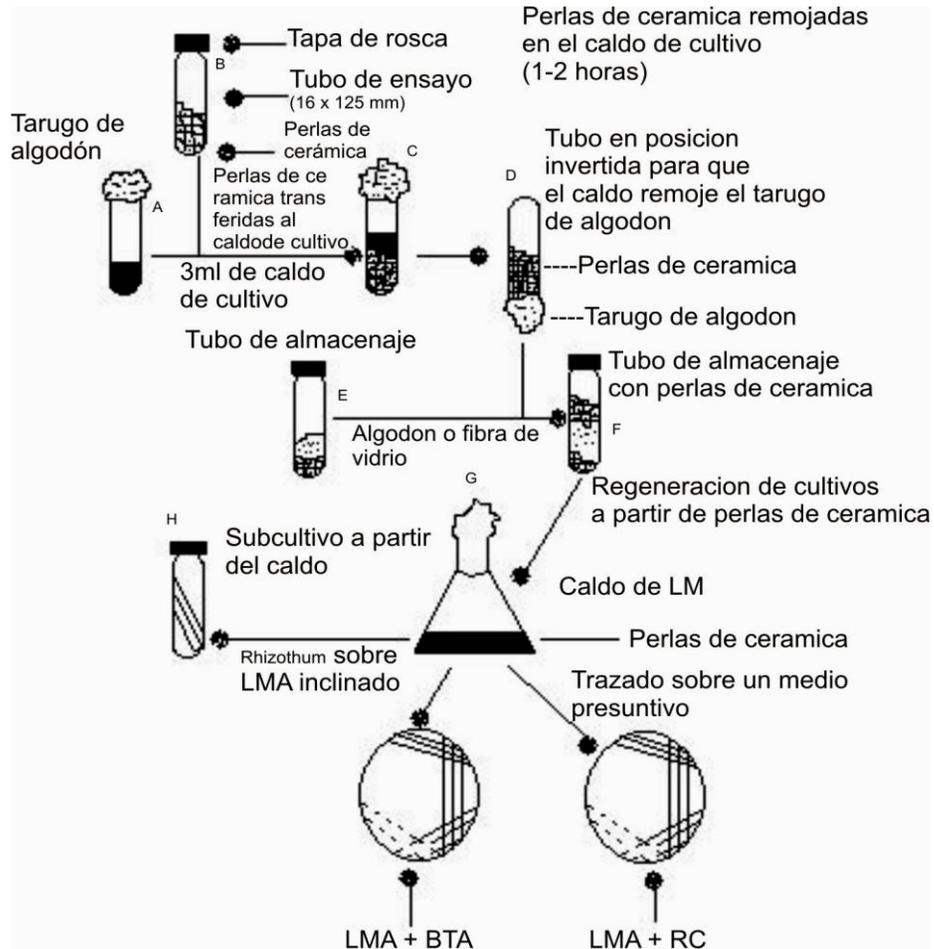
De igual forma, los tubos tapa rosca se lavaron, esterilizaron y secaron en el horno; dentro de cada uno de ellos se depositó silica gel hasta aproximadamente la tercera parte del tubo y algodón estéril para mantener la silica gel en su lugar y se tapó con papel aluminio; la humedad residual se removió en la estufa a 150 ° C. Se invirtió el erlenmyer correspondiente a cada aislado para eliminar el exceso del

¹⁵⁶DATE, R. and HALLIDAY, J. In handbook for the collection, preservation and characterization of tropical forage germplasm resources, CIAT, Colombia 1979 p. 21-26. Citado por: SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 12.

Sigla que corresponde al laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno.

caldo de cultivo y se transfirieron al tubo de almacenaje asépticamente las perlas impregnadas con rhizobio. El tubo se tapó y selló con papel aluminio¹⁵⁷ (figura 3).

Figura 3. Preservación de los aislados rhizobiales en perlas de porcelana



Fuente: SOMASEGARAN y HOBEN¹⁵⁸.

4.2 EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES

Para verificar la autenticidad de los diez aislados obtenidos junto con ocho aislados puros tomados del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño denominados RUN 07, RUN 06, RUN 12, RUN 10, F-107-B, C-89, T-58 y I-37 se evaluó su infectividad y efectividad mediante su habilidad para formar nódulos con

¹⁵⁷SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 16.

¹⁵⁸Ibid, p. 17.

las raíces de la arveja (*Psium sativum*) y su capacidad para fijar nitrógeno, indicio de la autenticidad de los aislados.

Se utilizó como criterio para la efectividad en la fijación de nitrógeno, el peso seco de la parte aérea de las plantas colectadas al comienzo de la floración y el número de nódulos¹⁵⁹.

Para considerar un aislado rhizobial como infectivo el criterio utilizado fue la aparición de nódulos en la raíz de la planta de arveja inoculada y se consideró efectivo un aislado rhizobial si el peso seco promedio de la parte aérea de la plantas de arveja inoculadas alcanzó por lo menos un 60% del peso seco promedio de la parte aérea de las plantas de arveja del tratamiento control¹⁶⁰

Se evaluaron veinte tratamientos así: un testigo absoluto (T1) sin nitrógeno y sin aislado rhizobial, un testigo control (T2) con nitrógeno en forma de KNO₃ (0.05% de KNO₃ = 70 ppm de nitrógeno) y 18 tratamientos del T3 al T20 con aislados puros como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Aislados rhizobiales inoculados

Tratamiento	Aislado
T3	LFBN 101
T4	LFBN 102
T5	LFBN 103
T6	LFBN 104
T7	LFBN 105
T8	LFBN 106
T9	LFBN 107
T10	LFBN 108
T11	LFBN 109
T12	LFBN 110
T13	C-89
T14	I-37
T15	RUN 06
T16	RUN 07
T17	RUN 12
T18	RUN 10
T19	F-107B
T20	T-58

¹⁵⁹SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 16.

¹⁶⁰LUQUE, Op. cit., p. 23.

Por cada tratamiento se realizó cuatro repeticiones, para un total de 80 unidades experimentales y el análisis estadístico utilizado correspondió a un diseño completamente al azar.

4.2.1 Activación de los aislados rizobiales. Se prepararon 18 erlenmeyers cada uno con 10 ml de medio de cultivo LM. Con ayuda de una asa se inoculó cada aislado rizobial en su respectivo erlenmeyer y se adicionó 5 perlas de porcelana para asegurar una dispersión homogénea de las células de rhizobium. Se incubó durante 5 días a temperatura ambiente en un agitador rotatorio, a 20 rpm (figura 4). Al quinto día se realizó un recuento del número de células viables en cada suspensión bacteriana con el fin de asegurar que se hallaban en número suficiente (alrededor de 1×10^9 células/ml) para producir una buena infección de las raíces de la leguminosa¹⁶¹.

Figura 4. Activación de aislados rizobiales.

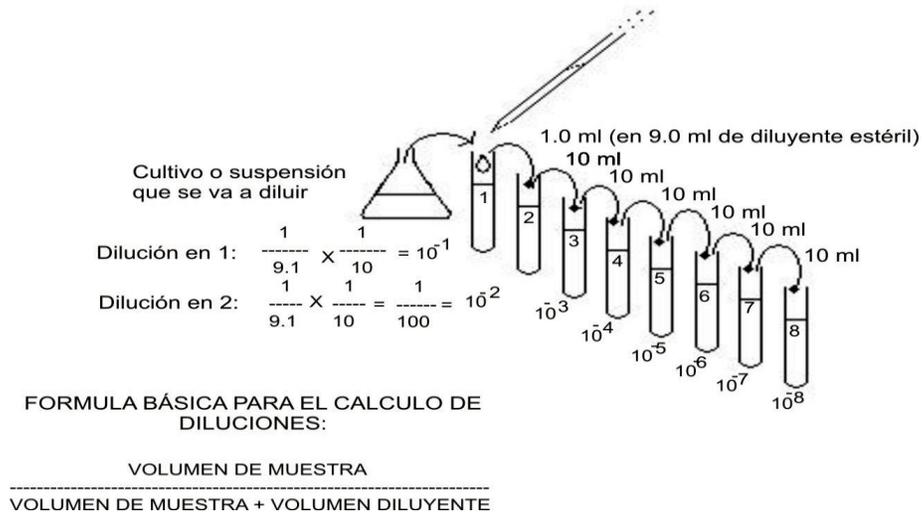


Para obtener un rango contable de 30-300 células/ml para conteo en cajas se dispuso de 8 tubos, cada uno con 9 ml de caldo LM diluido a $\frac{1}{4}$ y con pH de 6.8; se tomó 1 mililitro (ml) de la suspensión bacteriana y se adicionó al tubo número 1 para obtener una dilución de 10^{-1} , de este tubo se tomó 1 ml y se adicionó al tubo número 2 resultando una dilución de 10^{-2} , el mismo procedimiento se realizó hasta obtener una dilución final de 10^{-8} para el tubo número 8, para cada uno de los 18 aislados rizobiales puros. Este procedimiento se describe más detalladamente en la figura 5

Con una pipeta y comenzando con la mayor dilución, 10^{-8} se transfirió 1 ml asépticamente del cultivo diluido a una caja petri estéril. La caja petri se abrió solo lo suficiente para permitir que la pipeta entre y libere la muestra, se inocularon dos cajas petri por cada dilución.

¹⁶¹SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 45.

Figura 5. Procedimiento para diluciones en serie



Fuente: SOMASEGARAN y HOBEN¹⁶²

Similarmente se transfirieron alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-7} y 10^{-6} por duplicado en más cajas petri y sobre cada una de las suspensiones celulares en las cajas se vertió asépticamente 20 ml del caldo de cultivo LMA. Para asegurar la dispersión uniforme de las células, cada caja petri se movió en forma suave y en diferentes direcciones. Se dejó que el agar solidificara y se incubaron invertidas a 26-28°C. Para calcular la concentración del caldo de cultivo original se multiplicó el número promedio de colonias por el factor de dilución¹⁶³.

4.2.2 Esterilización de la superficie de las semillas de arveja. Se utilizaron semillas certificadas de la variedad Obonuco Andina, donadas por Corpoica, a las cuales se les determinó el porcentaje de germinación. Posteriormente se seleccionaron semillas sanas, de tamaño y forma similar, se lavaron y secaron; posteriormente se colocaron en un erlenmeyer y se enjuagaron con alcohol al 95%, durante 10 segundos, se escurrió el alcohol y se adicionó hipoclorito de sodio al 1% hasta que las semillas quedaron totalmente inmersas. Después de 5 minutos se escurrió el esterilizante y se enjuagó con 6 cambios de agua estéril. Después del sexto enjuague se agregó suficiente agua para sumergir las semillas y se dejaron en el refrigerador durante 4 horas para que las semillas se embebieran. Al cabo de las 4 horas, se enjuagaron las semillas con dos cambios de agua y se colocaron en cajas de petri las cuales contenían agar agua (0.75% p/v). Se colocaron 25 semillas por cada caja petri y se incubaron invertidas a 27°C hasta que las radículas alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1.5

¹⁶²SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit. p. 46.

¹⁶³Ibid., p. 45-47.

centímetros (cm) de longitud¹⁶⁴. La esterilización y germinación de las semillas se realizó con dos días de anterioridad a la inoculación.

4.2.3 Preparación de las materas. Se llenaron 80 materas plásticas con 1kg de arena de río, la cual previamente se lavó, esterilizó y secó al aire. Un día antes de la inoculación se humedeció la arena de 72 materas por primera vez con 100 ml de solución Jensen (anexo B) y 10 ppm de nitrógeno en forma de KNO_3 , para los tratamientos inoculados con los aislados rizobiales y para los tratamientos testigo y absoluto la arena se humedeció solo con agua estéril.

4.2.4 Inoculación y siembra de las semillas. Cuando las semillas estuvieron germinadas y la concentración de células viables de rhizobium alcanzó un valor aproximado de 1×10^9 células/ml, se procedió a inocular las semillas. Aquí se hizo una modificación en la metodología propuesta por Somasegaran y Hoben¹⁶⁵ en cuanto a la inoculación. Esta se realizó por primera vez en las cajas petri con agar y no en el momento de la siembra. Se inoculó cada una de las cajas petri con 5 ml de la suspensión rizobial (una caja petri por cada aislado rizobial) y se incubó a una temperatura de 27°C durante 24 horas. Al día siguiente se inoculó e incubó nuevamente 24 horas y entonces se colocaron dos semillas por cada matera en los tratamientos del T3 al T20 y en los tratamientos absoluto T1 y control T2 las semillas solo germinadas.

Las plantas se situaron en el invernadero de Corponariño previamente acondicionado para este tipo de ensayo, bajo condiciones óptimas de temperatura, humedad, aireación y entrada de luz. Una semana después cuando salió la primera hoja, se seleccionó la planta más vigorosa de cada matera.

Una vez por semana, se adicionaron a los tratamientos inoculados 100 ml de solución Jensen, a los testigos control 100 ml de nitrógeno en forma de KNO_3 y 100 ml de agua destilada a los testigos absolutos. Las plantas se dejaron crecer en el invernadero a condiciones ambientales, hasta el período de floración, periodo en el que la nodulación y la tasa de fijación del nitrógeno alcanzan niveles máximos; además, en ese momento, el contenido de nitrógeno está correlacionado generalmente con el que la planta tendrá cuando llegue a su madurez según lo expuesto por el CIAT¹⁶⁶.

Se cortó la parte aérea de cada una de la plantas, se depositó en una bolsa de papel y se secó a 70°C durante dos días. El secado detiene las reacciones enzimáticas que puedan ocurrir en el material vegetal, y permite determinar la producción de materia seca¹⁶⁷. Se determinó el peso seco de la parte aérea de todas las plantas y con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza. El

¹⁶⁴SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 289-290.

¹⁶⁵Ibid., p. 151-152.

¹⁶⁶CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Op. cit., p. 14-5.

¹⁶⁷Ibid., p. 18-1.

peso seco de la parte aérea de la planta se utilizó como un indicador de la efectividad en la fijación de nitrógeno por parte de los aislados. El nitrógeno total de la parte aérea y la actividad de la nitrogenasa son otros parámetros que están altamente relacionados con el peso seco de la parte aérea de la planta¹⁶⁸.

Los nódulos se separaron de la raíz cuidadosamente y se contaron como un indicador de la infectividad de los aislados rhizobiales, además se utilizaron cuatro parámetros para describir las características de nódulación en cada uno de los tratamientos evaluados según lo sugerido por el CIAT¹⁶⁹:

Abundancia: este parámetro clasifica el número de nódulos por planta en:

Muy abundante	más de 100
Abundante	50 – 100
Mediana	10 – 50
Poca	1 – 10
No hay	0

Tamaño: los nódulos fueron clasificados según el diámetro aproximado. Diámetros de 1 a 2 mm como pequeños (P), de 2.5 a 3 mm como medianos (M) y 4 mm como grandes (G). En este parámetro se tuvo en cuenta el tamaño más predominante de los nódulos (más de la mitad de los nódulos con la misma característica).

Color interno: los nódulos se clasificaron por su coloración roja o rosada, rosado tenue, y blanca de acuerdo a su coloración más predominante. El color rosado de los nódulos se debe a la presencia de la leghemoglobina, que es otro indicativo de la efectividad de los nódulos ya que se encarga de controlar los niveles de oxígeno dentro del nódulo, asegurando así el buen funcionamiento de la nitrogenasa. Los nódulos blancos no contienen leghemoglobina por lo tanto se puede decir que son inefectivos, porque la nitrogenasa no puede actuar en presencia de oxígeno. Los nódulos de coloración rosada tenue contienen leghemoglobina pero en cantidades bajas.

Nodulación en la raíz principal: la distribución de los nódulos entre la raíz principal y las secundarias es un parámetro importante que se tuvo en cuenta. Las categorías de clasificación fueron:

Predominante P: quiere decir que la mayoría de los nódulos estaban en la raíz principal.

¹⁶⁸SOMASEGARAN y HOBEN, Op cit., p. 160.

¹⁶⁹CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Op. cit., p. 17-3.

Regular R: los nódulos se encontraban distribuidos en las raíces laterales y distantes de la raíz principal.

No hay nódulos N¹⁷⁰

De igual forma con el resultado obtenido del número de nódulos se realizó otro análisis de varianza con el fin de determinar los aislados rizobiales más infectivos.

4.3 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES EN DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS y CARBONADAS

Para la diferenciación y caracterización de los 18 aislados rizobiales, se modificó la composición del medio de crecimiento básico LMA haciendo uso de doce fuentes nitrogenadas y once fuentes carbonadas diferentes, en reemplazo de la levadura y el manitol respectivamente.

4.3.1 Preparación de los medios de cultivo con fuentes nitrogenadas. Se determinó el contenido de nitrógeno en la levadura utilizada para preparar el medio LMA, mediante el método microkeldahl. El resultado fue de 2.02%. Para preparar un litro de medio LMA se agregó 0.5 g de levadura, lo que significa que el contenido total de nitrógeno por litro de medio de cultivo, fue de 0.0101g. Cada una de las fuentes nitrogenadas se agregó al medio de cultivo en reemplazo de la levadura, en tal proporción que permitió obtener este mismo contenido final de nitrógeno en cada uno de los medios (tabla 2).

Tabla 2. Fuentes nitrogenadas agregadas al medio en reemplazo de la levadura

Fuente	Peso Molecular	Cantidad en gramos (g) necesaria para preparar 1 litro de medio de cultivo
Nitrato de amonio	79.97	0.0288
Valina	117.03	0.0844
Serina	105	0.0758
Alanina	89.01	0.0642
Cisteína	121.07	0.873
A. aspártico	132	0.095
Lisina	146.04	0.0527
A. glutámico	147.01	0.1061
Arginina	174.04	0.0314
Leusina	131.04	0.0945
Asparagina	132.01	0.0476
Treonina	119.01	0.0859

¹⁷⁰CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Op. cit., p. 17-3-17-7.

Los medios se esterilizaron a 120 °C y 15 psi, durante 30 minutos. Inmediatamente después de autoclavar se adicionó a cada medio Nistatina como fungicida, en forma de suspensión de Micostatín (100.000 unidades/ml), en proporción de 0.25 ml de suspensión por litro de medio de cultivo¹⁷¹. Se procedió a verter las cajas, dos por cada aislado rizobial por medio de cultivo y dos cajas con el medio de cultivo base LMA, con extracto de levadura como fuente nitrogenada. Este fue el control estándar de referencia positivo, el cual indicó la mayor estimulación de crecimiento rizobial. Cuando el medio control y los medios de cultivo con las diferentes fuentes nitrogenadas estuvieron completamente sólidos, y cuando el número de células viables en cada suspensión bacteriana alcanzó el número suficiente (alrededor de 1×10^9 células/ml), se repicó cada uno de los aislados rizobiales por duplicado en cada medio y se incubó a 25 °C. Posteriormente se comparó el crecimiento en los diferentes medios después de 3, 6 y 9 días. De acuerdo con el grado de desarrollo de las colonias se clasificaron en¹⁷²:

- no hubo ningún desarrollo.
- = desarrollo de colonias incipiente.
- + desarrollo escaso de colonias.
- ++ desarrollo abundante de colonias.
- +++ desarrollo muy abundante de colonias.

4.3.2 Preparación de los medios de cultivo con fuentes carbonadas. Inicialmente se prepararon soluciones al 10% (1g de carbohidrato en 10 ml agua destilada) de cada uno de los carbohidratos evaluados. Los carbohidratos considerados lábiles como arabinosa, galactosa, manosa, maltosa, rafinosa y dulcitol se esterilizaron por filtración por membrana, con filtros de nitrocelulosa de 0.2 μ . Posteriormente se preparó el medio base libre de carbohidratos, que es similar al medio LMA (anexo B), pero con un contenido de levadura de 0.05 g/l. Se tomaron 90 ml de este medio en erlenmeyers de 250 ml, se adicionó 1.5 g de agar polvo a cada erlenmeyer, y se esterilizó cada frasco a 120°C y 15 psi, durante 30 minutos. Luego se agregaron las soluciones de carbohidratos lábiles a cada frasco, mientras que las soluciones compuestas de carbohidratos estables como glucosa, lactosa y sacarosa se esterilizaron en autoclave junto con el medio base. Al igual que en las fuentes nitrogenadas, se utilizó un control estándar de referencia positivo pero con manitol como fuente carbonada. Posteriormente se procedió a verter las cajas petri con cada uno de los medios; de la misma forma como se

¹⁷¹LUQUE, Op. cit., p. 18.

¹⁷²Ibid., p. 20.

describió en el punto 4.3.1, se repicó, incubó y se evaluó el crecimiento en todos los aislados rizobiales¹⁷³.

Los resultados de crecimiento y no crecimiento de todas las cepas rizobiales en las diferentes fuentes nitrogenadas y carbonadas se analizaron mediante el programa estadístico NTSYS¹⁷⁴ y el fenograma se realizó con el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) y el coeficiente Jaccard (J).

4.4 RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Para determinar la sensibilidad o resistencia de todos los aislados rizobiales frente a los antibióticos evaluados, se utilizó el método de difusión de sensidiscos en agar como se describe a continuación¹⁷⁵:

4.4.1 Preparación de las placas con LMA. Inicialmente se preparó el medio LMA como se describe en el anexo B; una vez esterilizado se procedió a verter las cajas petri (3 cajas por aislado) de manera que el grosor del agar en la placa fuera de 4 mm, lo que correspondió a 20 ml del agar, se dejó solidificar en una cabina de flujo laminar estéril, de tal forma que las placas estuvieran completamente secas. Adicionalmente, se incubó 2 placas por lote a 37°C durante 24 horas, como prueba de esterilidad de los medios¹⁷⁶.

4.4.2. Inoculación de las placas. Cada uno de los 18 aislados rizobiales se activó en medio LM como se describió anteriormente, cuando el número de células viables en cada suspensión bacteriana alcanzó el número suficiente (alrededor de 1×10^9 células/ml), se sumergió en ella una tórula de algodón, se rotó varias veces y se presionó firmemente contra la pared interna del tubo con el fin de remover el exceso de inóculo. Se inoculó la superficie seca de la placa de agar LMA estriando en tres direcciones diferentes como se indica en la figura 6 para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de colocar los sensidiscos para permitir la absorción del exceso de líquido.

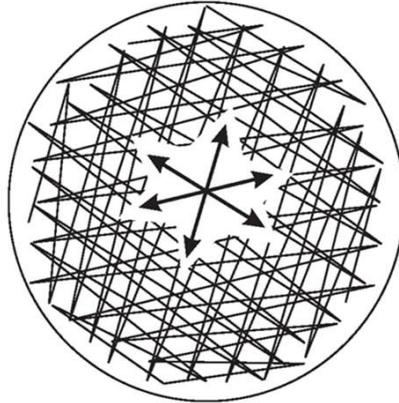
¹⁷³SOMASEGARAN, Padma and HOBEN, Heinz. Handbook for Rhizobia : Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York : Springer-Verlag, 1994. p. 39–41. ISBN 0-387-94134-7.

¹⁷⁴NTSYS. Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System.[CD-ROM]. Versión 2.1. [New york].

¹⁷⁵SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 127.

¹⁷⁶SACSAQUISPE, Rosa y VELASQUEZ, Jorge. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima, Perú : Ministerio de Salud, 2002. p. 16.

Figura 6. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.



Fuente: SACSAQUISPE y VELASQUEZ¹⁷⁷

4.4.3 Aplicación de los sensidiscos. Se utilizaron sensidiscos marca Oxoid con los diferentes antibióticos cuya concentración en microgramos fue: estreptomina 10 µg/sensidisco, nitrofurantoina 300 µg/sensidisco, trimethopin 25 µg/sensidisco, penicilina 10 µg/sensidisco, tetraciclina 30 µg/sensidisco y ampicilina 10 µg/sensidisco. Cabe anotar que las concentraciones de los sensidiscos fueron las que se encontraron disponibles en el laboratorio de la Universidad de Nariño. Se dividió la placa en tres secciones y en cada una de ellas, con la ayuda de una pinza estéril, se colocó un sensidisco diferente presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Cada sensidisco se depositó a una distancia aproximada de 15 mm del borde de la caja y a 24 mm del otro sensidisco¹⁷⁸. Cada una de las placas se preparó por duplicado y además se inoculó una caja sin antibiótico alguno como control de crecimiento del aislado. Las cajas se incubaron a 25 °C durante un periodo comprendido entre 2 y 8 días y se observó la presencia o ausencia de las colonias de rhizobio alrededor de los sensidiscos.

Para leer los halos de inhibición se colocaron las placas invertidas sobre un fondo oscuro e iluminado y se midió con ayuda de una regla, el diámetro de la zona de inhibición completa de crecimiento producido por los sensidiscos en milímetros. Los valores de los halos de inhibición recolectados para cada uno de los 18 aislados rhizobiales se analizaron también en el programa estadístico NTSYS y el fenograma se elaboró con el método UPGMA y el coeficiente Distancia Taxonómica Promedio (DIST).

¹⁷⁷SACSAQUISPE y VELASQUEZ, Op. cit., p. 18.

¹⁷⁸Ibid, p.16.

4.5 EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE UNA CEPA RHOZOBIAL MARCADA FRENTE A DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS, CARBONADAS Y ANTIBIOTICOS

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la evaluación de la infectividad y efectividad de aislados rizobiales, se realizó un nuevo ensayo con el fin de determinar si la marcación de los aislados en las diferentes fuentes nitrogenadas, carbonadas y en los antibióticos probados afectó de alguna manera su capacidad de fijación de nitrógeno.

Se realizaron tres diseños experimentales independientes. Cada diseño constituido de cinco tratamientos: un testigo absoluto (T1) sin nitrógeno y sin aislado rizobial, un testigo control (T2) con nitrógeno en forma de KNO_3 y 3 tratamientos inoculados con el aislado puro desarrollado en fuentes nitrogenadas, carbonadas y antibióticos, como se describe en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Diseño experimental para el aislado mas efectivo en la fijación de nitrógeno marcado con fuentes nitrogenadas

Tratamiento	Variable
T3	Aislado más efectivo + Valina
T4	Aislado más efectivo + Leucina
T5	Aislado más efectivo + Cisteína

Tabla 4. Diseño experimental para el aislado mas efectivo en la fijación de nitrógeno marcado con fuentes carbonadas

Tratamiento	Variable
T3	Aislado más efectivo + Sacarosa
T4	Aislado más efectivo + Rafinosa
T5	Aislado más efectivo + Manosa

Tabla 5. Diseño experimental para el aislado más efectivo en la fijación de nitrógeno marcado con antibióticos

Tratamiento	Variable
T3	Aislado más efectivo + Estreptomicina
T4	Aislado más efectivo + Trimethopin
T5	Aislado más efectivo + Penicilina

Después de determinar mediante el análisis estadístico el aislado más efectivo en la fijación de nitrógeno, se lo tomó como referencia para verificar la persistencia de su efectividad e infectividad después de la marcación en las diferentes fuentes y antibióticos evaluados.

El tratamiento con el Aislado más efectivo + Valina corresponde al aislado más efectivo en la fijación de nitrógeno que se desarrolló en el medio de cultivo con valina como fuente nitrogenada, de igual forma el Aislado más efectivo + Leucina y el Aislado más efectivo + Cisteína, para un total de 3 fuentes nitrogenadas evaluadas. Los tratamientos de la tabla 4 corresponden al aislado más efectivo desarrollado en sacarosa, rafinosa y manosa como fuente de carbono respectivamente y los tratamientos de la tabla 5 pertenecen al mismo aislado rhizobial pero en tres antibióticos diferentes.

Las fuentes nitrogenadas y carbonadas ensayadas se seleccionaron al azar entre las que mostraron un resultado abundante y escaso en cuanto al desarrollo de colonias, mientras que la selección de los antibióticos fue completamente al azar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DE LAS CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*.

Para describir los aislados de *Rhizobium leguminosarum* en base a su crecimiento en medio sólido, se utilizaron características como el tamaño, la forma, el color, la textura y la habilidad para alterar el pH del medio, parámetros, generalmente estables usados para definir las cepas o los aislados según Somasegaran y Hoben¹⁷⁹.

Cada uno de los 18 aislados rhizobiales obtenidos presentaron colonias típicas, cuyas características predominantes fueron colonias de formas aplanadas y abombadas, de color blanco, lechoso y translúcidas, algunas opacas, otras brillantes, colonias de textura cremosa y elástica (figura 7), modelos de crecimiento descritos por el CiAT¹⁸⁰ y Somasegaran y Hoben¹⁸¹. La rata de crecimiento a una temperatura de incubación de $27^{\circ}\pm 1$ osciló entre 3 y 5 días. Todas estas características particulares se pueden observar en la tabla 6.

Figura 7. Crecimiento característico del aislado LFBN 104 en el medio base LMA



¹⁷⁹SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 34.

¹⁸⁰CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Op. cit., p. 5-1.

¹⁸¹SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 34-35.

Tabla 6. Caracterización morfológica de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* aisladas de nódulos de plantas de arveja y cultivadas en el medio base LMA a 27°C±1

Cepa	Forma	Textura	Color	Rata de crecimiento 27° ± 1
LFBN 101	Aplanada	Elástica	Blanca Opaca	4 días Rápido
LFBN 102	Redondeada	Creмоса	Lechosa Brillante	4 días Rápido
LFBN 103	Redondeada	Creмоса	Blanca Brillante	4 días Rápido
LFBN 104	Redondeada	Creмоса	Blanca Brillante	3 días Rápido
LFBN 105	Redondeada	Elástica	Blanca Opaca	5 días Rápido
LFBN 106	Redondeada	Elástica	Opaca Translúcida	4 días Rápido
LFBN 107	Aplanada	Elástica	Blanca Brillante	5 días Rápido
LFBN 108	Redondeada	Elástica	Brillante Translúcida	4 días Rápido
LFBN 109	Plana	Elástica	Blanca Opaca	4 días Rápido
LFBN 110	Aplanada	Creмоса	Blanco Brillante	3 días Rápido
I-37	Aplanada	Creмоса	Blanco Opaca	4 días Rápido
C-89	Aplanada	Creмоса	Lechosa Opaca	3 días Rápido
RUN 06	Redondeada	Creмоса	Blanco Brillante	5 días Rápido
RUN 07	Aplanada	Creмоса	Blanco Brillante	4 días Rápido
RUN 12	Redondeada	Elástica	Blanco Opaca	4 días Rápido
RUN 10	Aplanada	Elástica	Opaca Brillante	3 días Rápido
F-107 B	Redondeada	Elástica	Brillante Translúcida	4 días Rápido
T-58	Aplanada	Creмоса	Lechosa Brillante	4 días Rápido

Cuando se repicó cada uno de los aislados en el medio LMA con rojo congo se observó solo la presencia de colonias blancas y gelatinosas, por lo cual se pudo descartar la presencia de organismos contaminantes en el medio, por cuanto ellos son capaces de absorber el tinte a diferencia del *Rhizobium*. En el medio peptona-glucosa no se pudo observar crecimiento de ninguna de las cepas confirmándose la pureza de todos los cultivos rizobiales. En todos los aislados, el medio de cultivo LMA de pH 6.8 con ABT cambio de coloración verde a amarillo por la producción de acidez en el medio, evidencia de aislados de *Rhizobium* de crecimiento rápido.

Mediante la tinción Gram¹⁸² se pudo determinar que todos los aislados de *Rhizobium* eran bacilos Gram negativos por su coloración rojo claro al ser observadas bajo el microscopio. Adicionalmente se tomó el pH a los diferentes aislados rizobiales como criterio de pureza. Un pH final menor de 5.5 o mayor de 8 del medio LM líquido fue la condición utilizada para determinar la presencia o ausencia de organismos contaminantes¹⁸³, los valores de pH obtenidos verificaron que los aislados se encontraron dentro del rango de cepas rizobiales libres de contaminantes (anexo D).

5.2 EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS RHIZOBIALES.

En la selección de aislados rizobiales más efectivos en la fijación biológica de nitrógeno, las plantas de arveja inoculadas con los 18 aislados rizobiales (figura 8) se recolectaron durante la floración, como lo recomienda el CiAT, porque es el período en que la nodulación (número y masa de los nódulos) y la tasa de fijación del nitrógeno alcanzan niveles máximos; además, en ese momento el contenido de nitrógeno esta correlacionado generalmente con el que la planta tendrá cuando llegue a su madurez¹⁸⁴.

La evaluación final de la simbiosis se basó en dos parámetros; infectividad y efectividad de los aislados rizobiales. El criterio aceptado para la efectividad en la fijación de nitrógeno fue el peso seco de la parte aérea de las plantas y para la infectividad, la presencia y el número de nódulos en la raíz de la planta de arveja inoculada.

Con los datos del peso seco de la parte aérea de las plantas se realizó un análisis de varianza con un límite de confianza del 95 y 99% (anexo E), el cual mostró diferencias altamente significativas entre los aislados rizobiales en cuanto a su capacidad fijadora de nitrógeno. Se utilizó como prueba de significancia la prueba de Tukey al 99% de confianza.

¹⁸²SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 32.

¹⁸³CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL, Op. cit., p. 6-3.

¹⁸⁴Ibid, p. 14-5

Figura 8. Plantas de arveja (*Pisum sativum*) inoculadas con aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*



El cuadro 1 muestra el promedio de las cuatro replicas realizadas por cada tratamiento. Valores con literales iguales significan que no existen diferencias significativas entre ellos. Se puede observar que los tratamientos inoculados con las cepas rizobiales 101, 103, 104, 110 y el testigo control presentan literales iguales A, lo que indica que no existen diferencias significativas entre ellos. Estas cepas, se consideraron altamente efectivas en la fijación de nitrógeno porque los tratamientos son estadísticamente similares al testigo control, el cual, al ser fertilizado con nitrógeno en forma de KNO_3 presenta el mayor porcentaje de nitrógeno. Además, se consideró efectiva una cepa si su porcentaje de efectividad fue superior al 60%¹⁸⁵. De igual forma características como tamaño de la planta y color verde de las hojas observadas en los tratamientos efectivos similares al testigo control comprueba su capacidad fijadora de nitrógeno.

Solo el tratamiento inoculado con la cepa I-37 y el testigo absoluto (sin aislado rizobial y sin nitrógeno), con literales iguales G, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero tratamientos inoculados con las cepas T-58 y el F-107B también se caracterizaron por presentar índices de efectividad muy bajos. Los tratamientos inoculados con estas tres cepas presentan un contenido insuficiente de nitrógeno en la planta similar al contenido de nitrógeno en el testigo absoluto y por ende se consideraron como inefectivas en la fijación de nitrógeno.

¹⁸⁵LUQUE, Op. cit., p. 37.

Cuadro 1. Efectividad de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*

Tratamiento		Peso seco parte aérea	Porcentaje de efectividad
T1	TESTIGO ABSOLUTO	0.42 G	
T2	TESTIGO CONTROL	4.83 A	
T3	LFBN 101	4.22 A	87.3
T4	LFBN 102	2.37 B	49
T5	LFBN 103	4.41 A	91.2
T6	LFBN 104	4.58 A	94.8
T7	LFBN 105	2.34 B	48.4
T8	LFBN 106	1.90 CB	39.2
T9	LFBN 107	0.85 GFDE	17.5
T10	LFBN 108	1.47 CD	30.4
T11	LFBN 109	1.42 CDE	29.4
T12	LFBN 110	4.07 A	84.2
T13	C-89	1.01 GFDE	20.8
T14	I-37	0.43 G	8.9
T15	RUN 06	2.50 B	51.6
T16	RUN 07	0.96 GFDE	19.9
T17	RUN 12	1.31 CFDE	27.1
T18	RUN 10	1.00 GFDE	20.6
T19	F-107B	0.52 GF	10.7
T20	T-58	0.63 GFE	13

Letras distintas difieren estadísticamente.

Los tratamientos con porcentajes de efectividad más bajos, corresponden a la mayoría de los aislados tomados del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño; podría pensarse que el tiempo de almacenamiento y la repicación continua de las cepas con el fin de lograr su purificación pudieron de algún modo afectar su capacidad efectiva, puesto que un largo tiempo de almacenamiento incrementa la

contaminación y las mutaciones debido a los subcultivos mas frecuentes¹⁸⁶. Se pudo observar que el tamaño de las plantas en estos tratamientos, fue muy inferior comparado con el tamaño de las plantas inoculadas con las cepas efectivas y el testigo control.

De igual forma las plantas correspondientes a los tratamientos considerados como infectivos se caracterizaron por presentar una coloración verde pálido tanto en los tallos como en las hojas. Los demás tratamientos, presentaron una efectividad regular.

La infectividad de cada uno de los aislados rizobiales se determinó mediante la presencia, ausencia y número de nódulos en la raíz de las plantas de arveja inoculadas (figura 9). Las observaciones de campo realizadas inicialmente permitieron describir las características de nodulación en cada tratamiento, como se indica en la tabla 7.

Figura 9. Raíz nodulada de uno de los tratamientos más infectivos



Para establecer los aislados rizobiales más infectivos, se utilizó el mismo diseño experimental que en la evaluación de la efectividad, pero sin los testigos absoluto y control, porque en ellos no se produjo nodulación alguna. La población de datos comprendió entonces el número de nódulos de las 4 réplicas de cada uno de los 18 tratamientos. El análisis estadístico determinó que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados con un límite de confianza del 99% (anexo F). La prueba de significancia Tukey al 99% de confianza permitió establecer que los tratamientos inoculados con las cepas LFBN 104, LFBN 101, LFBN 103, LFBN 110 y LFBN 105 son estadísticamente iguales (tabla 7) y presentaron los promedios más altos, con nódulos de coloración roja

¹⁸⁶SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 61.

indicativo de la efectividad en la fijación de nitrógeno, y constituyen el 28% de los tratamientos con nodulación abundante (entre 50 y 100 nódulos por planta), lo que indica que son las cepas más infectivas del grupo.

Tabla 7. Características de la nodulación de los tratamientos inoculados con los aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*

Tratamiento	Promedio	Abundancia	Tamaño Predominante	Color interno	Nodulación En la raíz Principal
T3 LFBN 101	55 A	Abundante	Mediano	Rojo	Regular
T4 LFBN 102	24 CEBD	Mediana	Pequeño	Rosado Tenue	Regular
T5 LFBN 103	53 A	Abundante	Grande	Rojo	Regular
T6 LFBN 104	62 A	Abundante	Pequeño	Rojo	Regular
T7 LFBN 105	51 A	Abundante	Mediano	Rosado Tenue	Regular
T8 LFBN 106	36 B	Mediana	Pequeño	Rosado tenue	Regular
T9 LFBN 107	21 GCEFD	Mediana	Pequeño	Blanco	Regular
T10 LFBN 108	32 B	Mediana	Pequeño	Rosado Tenue	Regular
T11 LFBN 109	19 GHEFD	Mediana	Mediano	Blanco	Regular
T12 LFBN 110	51 A	Abundante	Pequeño	Rojo	Regular
T13 C-89	21 CEFD	Mediana	Grande	Rosado tenue	Regular
T14 I-37	9 GH	Poca	Mediano	Blanco	Regular
T15 RUN 06	27 CBD	Mediana	Pequeño	Blanco	Regular
T16 RUN 07	11 GHF	Mediana	Pequeño	Rosado Tenue	Regular
T17 RUN 12	16 GHEFD	Mediana	Mediano	Rosado Tenue	Regular
T18 RUN 10	20 GCEFD	Mediana	Mediano	Blanco	Regular
T19 F-107B	13 GHEF	Mediana	Grande	Blando	Regular
T20 T-58	6 H	Poca	Pequeño	Blanco	Regular

De la misma forma se determinó que el tratamiento inoculado con la cepa T-58 presentó el menor número de nódulos, por lo tanto, es la cepa con menor capacidad infectiva seguida de cepas como la I-37, RUN 07, F-107B, RUN 12 y LFBN 109 correspondientes a cepas inoculantes de tratamientos con características de abundancia entre mediana y poca, color de los nódulos en su mayoría blanca y rosado tenue indicio de nódulos no fijadores de nitrógeno. Estas cepas se consideraron como las menos infectivas. El 61% de los tratamientos presentaron nódulación mediana, es decir un número de nódulos entre 10 y 50, de coloración rosado tenue y blanca y solo el 11% presentó nódulación poca (entre 1 y 10) y de coloración blanca.

Cabrera y Guevara¹⁸⁷, reportan valores extremadamente diferentes del número de nódulos de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* y evaluadas a nivel de laboratorio. Los promedios sobrepasan los 400 nódulos por tratamiento. Probablemente la simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium* y esta leguminosa es más efectiva.

Las bajas desviaciones estándar obtenidas para cada tratamiento indican que las diferencias entre las réplicas de cada tratamiento son mínimas lo que significa que el proceso de infección se dió en igual proporción.

Cabe anotar que se realizó una modificación a la metodología descrita por Somasegaran y Hoben¹⁸⁸ relacionada con la inoculación de las semillas. Se pudo determinar que al realizar la inoculación con los aislados en las cajas petri donde estaban contenidas las semillas germinadas se producía una mejor infección de las raíces de la leguminosa.

En cuanto a la desinfección de las semillas, Cabrera y Guevara¹⁸⁹, obtuvieron buenos resultados con la esterilización utilizando ácido sulfúrico concentrado y un tiempo de contacto más prolongado; en nuestro caso este método no funcionó, probablemente porque la corteza de las semillas de arveja es más suave y el ácido sulfúrico causó su destrucción.

Siguiendo la modificación a la metodología de Somasegaran y Hoben realizada por Cabrera y Guevara, se adicionaron 10 ppm de KNO₃ en la solución Jensen utilizada para regar por primera vez las materas proporcionando una pequeña fuente de nitrógeno para las bacterias mientras se establecía la simbiosis.

¹⁸⁷CABRERA y GUEVARA, Op. cit., p. 45.

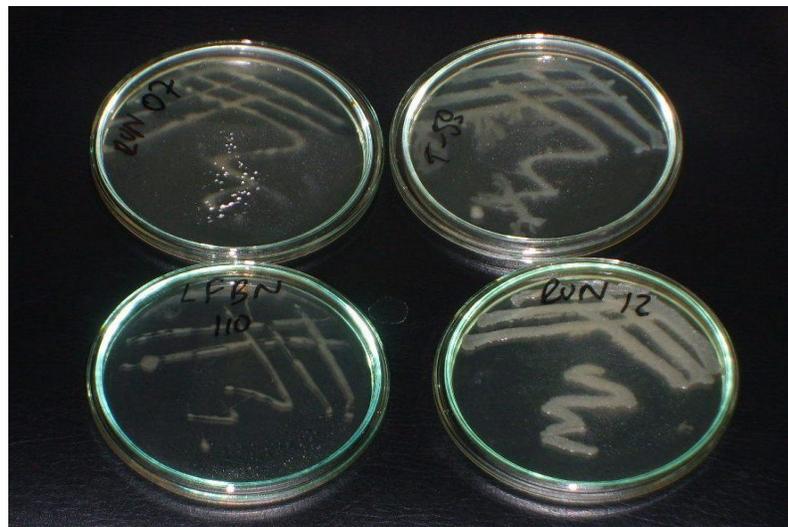
¹⁸⁸SOMASEGARAN Y HOBEN, Op. cit., p. 151-152.

¹⁸⁹CABRERA Y GUEVARA, Op. cit., p. 45.

5.3 CARACTERIZACION DE LOS AISLADOS DE *Rhizobium leguminosarum* EN FUENTES CARBONADAS Y NITROGENADAS.

5.3.1 Comportamiento de los aislados rizobiales frente a diferentes fuentes nitrogenadas. El comportamiento de todos los aislados rizobiales frente a los medios de cultivo enriquecidos con las diferentes fuentes nitrogenadas ensayadas, se evaluó mediante su crecimiento a los tres, seis y nueve días de incubación. La figura 10, muestra un ejemplo del crecimiento de las cepas de *Rhizobium* RUN 07, RUN 12, T-58 y LFBN 110 en treonina como fuente de nitrógeno, a los tres días de incubación. Se puede observar que aunque todas las cepas presentaron un desarrollo positivo en el medio enriquecido con esta fuente, existe una diferencia en la proporción del crecimiento de cada cepa frente al aminoácido evaluado.

Figura 10. Crecimiento de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* RUN 07, RUN 12, T-58 y LFBN 110 en treonina como fuente nitrogenada.



Para tener una visión de conjunto se elaboró la tabla 8, en la cual se muestran los resultados del desarrollo de los aislados después de tres días de incubación. Se puede observar una marcada diferencia en el crecimiento de los diferentes aislados rizobiales frente a las diferentes fuentes nitrogenadas. Utilizando el nitrato de amonio como fuente nitrogenada se pudo observar un desarrollo de las colonias que oscilo entre muy escaso y nulo, mientras que Luque¹⁹⁰, utilizó el nitrato de amonio como fuente nitrogenada (0.094 g/l) y obtuvo buenos resultados en el crecimiento de cepas de *Rhizobium leguminosarum*, posiblemente la cantidad adicionada de este compuesto al medio de cultivo en nuestro estudio

¹⁹⁰LUQUE, Op. cit., p.19.

Tabla 8. Comportamiento de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en diferentes fuentes nitrogenadas

Cepa	FUENTES NITROGENADAS											
	Valina	Cisteina	Serina	A. glutámico	Lisina	Leucina	Asparagina	Nitrato de amonio	A. aspártico	Alanina	Treonina	Arginina
LFBN 101	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
LFBN 102	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
LFBN 103	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
LFBN 104	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
LFBN 105	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
LFBN 106	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
LFBN 107	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
LFBN 108	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
LFBN 109	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
LFBN 110	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
RUN 10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
RUN 06	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
RUN 07	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
RUN 12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
F-107 B	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
C – 89	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
T – 58	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
I – 37	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+

+Crecimiento positivo de la cepa

-Crecimiento negativo de la cepa

(0.0288 g/l) no fue la suficiente para promover el crecimiento de los aislados. Por otro lado, estudios realizados con cepas de *Rhizobium* indican que la tolerancia al nitrato es variable y esta influenciada por la cepa de *Rhizobium* y la planta hospedante¹⁹¹. Otros autores argumentan que la presencia de nitrato inhibe la fijación simbiótica de nitrógeno. Diferentes procesos simbióticos son afectados incluyendo la actividad nitrogenasa, la cual disminuye después de la adición de nitrato al medio¹⁹².

Los aminoácidos utilizados como fuentes nitrogenadas se clasificaron de acuerdo a la naturaleza química del radical, es decir de acuerdo a la polaridad del grupo R. En los aminoácidos alanina, valina y leucina, el crecimiento de las colonias en los diferentes aislados fue escaso, esto posiblemente debido al carácter no polar de las moléculas, comportamiento similar al descrito por Luque¹⁹³ para cepas de *Rhizobium leguminosarum* en los aminoácidos alanina y valina y por Novikova et al¹⁹⁴ para cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *tifolli*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* y cepas de *Rhizobium* sp. en medios de cultivo enriquecidos con valina. En esta investigación se observó un mayor crecimiento de las colonias en los medios de cultivo enriquecidos con alanina y valina. El 61.11% de los aislados fueron capaces de utilizar estos compuestos como fuente de nitrógeno, seguido por la leucina con el 38.8%, aunque el porcentaje de crecimiento en alanina y valina no indica alguna diferencia; esta fue evidente en la proporción del crecimiento de los aislados en los medios con alanina, probablemente porque este aminoácido es el más polar o el menos hidrófobo de este grupo.

Se ha podido determinar que cepas de *Rhizobium* con requerimientos nutricionales de leucina son inefectivas en la fijación de nitrógeno¹⁹⁵. Esto es coherente con los resultados obtenidos en esta investigación, puesto que tres de las cepas de *Rhizobium* consideradas efectivas en la fijación de nitrógeno LFBN 101, LFBN 103 y LFBN 110 presentaron crecimiento negativo cuando fueron evaluadas en los medios enriquecidos con este aminoácido como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la cepa LFBN 104 presentó un desarrollo de colonias mínimo pero que se considero positivo, lo cual posiblemente permite establecer que aunque el comportamiento metabólico de las cepas rizobiales exhibe cierta tendencia frente al consumo de aminoácidos, es una característica particular de cada cepa que no permite generalización alguna.

¹⁹¹MURPHY, P. M. Variacion in nodulation ability by strains of *R. trifolli* in the presence of nitrate. En : O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p.107.

¹⁹²HECKMANN, M.O. and DREVON, J. Inhibition of symbiotic nitrogen fixation by nitrate. En : O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p. 97.

¹⁹³LUQUE, Op. cit., p. 30.

¹⁹⁴NOVIKOVA et al, Op. cit., p. 734-742.

¹⁹⁵DENARIE; TRUCHET and BERGERON, Op. cit., p. 51 y 54.

Los aminoácidos polares como la asparagina, cisteína, treonina y serina son compuestos relativamente más solubles en el agua que los aminoácidos con radicales no polares. En estas fuentes nitrogenadas se evidenció un mayor crecimiento de las colonias debido a que contienen grupos funcionales polares neutros. El 88.8% de los aislados rizobiales crecieron bien con cisteína como fuente de nitrógeno. La presencia del grupo tiol (-SH) en la estructura de la cisteína determina su polaridad y, según los resultados obtenidos, esta característica en los aminoácidos tiene influencia favorable en el crecimiento del rizobio. Según Skinner¹⁹⁶ la cisteína posiblemente actúe como un ligante de azufre para la nitrogenasa, una molécula con un alto contenido de este elemento¹⁹⁷.

Dentro de los aminoácidos serina y treonina, se observó un mayor crecimiento de los aislados rizobiales en los medios enriquecidos con serina, aunque la polaridad de estos dos aminoácidos es semejante, en la serina la cadena lateral de menor tamaño aumenta su polaridad y favorece el consumo de este sustrato. Nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por Novikova et al¹⁹⁸ para la serina como fuente de nitrógeno; en su estudio, las cepas de *Rhizobium* presentaron un desarrollo escaso de las colonias; de seis cepas estudiadas solo dos de ellas mostraron un crecimiento positivo frente a este aminoácido. Al contrario, estudios realizados con cepas de *Bradyrhizobium* evidencian su habilidad de asimilación de serina como fuente nitrogenada¹⁹⁹.

Todos los aislados de *Rhizobium* evaluados fueron capaces de utilizar la asparagina como fuente de nitrógeno; este resultado es coherente con el papel que cumple la asparagina en el transporte de amonio hacia la superficie de la planta leguminosa²⁰⁰ y con su polaridad, esta molécula es más polar que las tres anteriores.

Los ácidos aspártico y glutámico contienen un segundo grupo carboxilo que se halla completamente ionizado y por tanto cargado negativamente; los grupos funcionales presentes en la molécula de estos ácidos como el grupo amino y los grupos carboxilo favorecen la polaridad de la misma y por ende el buen desarrollo de los aislados de rizobio. Además, se ha propuesto que un compuesto de carbono que contiene nitrógeno también podría ser importante como una fuente de energía o carbono para el bacteroide²⁰¹. Como se puede observar en la tabla 8,

¹⁹⁶SKINNER, K. Nitrogen Fixation. En : Chemical and Engineering news, Washington (1976); p. 23-25. Citado por: LUQUE, Op. cit. p. 30.

¹⁹⁷STREICHER, S. and VALENTINE, R. Comparative Biochemistry of Nitrogen Fixation, buscar elementos citado por: LUQUE, Op. cit., p. 30.

¹⁹⁸NOVIKOVA et al. Op cit., p. 738

¹⁹⁹KALITA and MALEK, Op. cit., p. 710.

²⁰⁰BRADLEY and NOLT, Op. cit., p. 17.

²⁰¹KAHM, M. L.; KRAUS, J. and SOMERVILLE, J. E. A model for nutrient exchange in the Rhizobium-legume symbiosis. In : EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J. and NEWTON, W. J. Nitrogen fixation research progress. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 1985. p. 193-199. Citado por: KAHN, M. L.; KRAUS, J and SHATTERS, R.G.

todos los aislados crecieron en el medio enriquecido con ácido glutámico y la proporción del crecimiento se describió como abundante; esto tiene explicación en la importancia de este aminoácido como componente de muchas proteínas y haciendo parte de la formación de otros aminoácidos. En *Rhizobium meliloti* por ejemplo, este aminoácido tiene gran importancia, porque el glutamato y glutamina se utilizan como grupos amino donores en un número de reacciones biosintéticas²⁰².

De igual forma que con el ácido glutámico, el desarrollo de las colonias del 89% de los aislados rizobiales ensayados en ácido aspártico presentaron un crecimiento positivo y de forma abundante; solo las cepas como la LFBN 106 y la RUN 10 presentaron deficiencia para utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno. Este crecimiento favorable, posiblemente está vinculado con la activa utilización del glutamato y aspartato para mantener la respiración en el nódulo y la actividad de fijación de nitrógeno²⁰³ a nivel de las plantas.

Con lisina como fuente de nitrógeno, solo 5 de los 18 aislados estudiados no fueron capaces de crecer en los medios enriquecidos con este aminoácido, se podría pensar que también la lisina debe desempeñar una función importante, no determinada aun, en el metabolismo del rizobio²⁰⁴. En la bacteria, la lisina probablemente se sintetiza a partir del ácido diaminopimélico, un componente de la pared celular²⁰⁵.

Por otra parte, la arginina presentó una marcada influencia en el desarrollo de las colonias en todos los aislados de *Rhizobium* evaluados, comportamiento similar al descrito por Novikova *et al* para cepas de *Rhizobium leguminosarum*²⁰⁶. Se ha podido establecer que la arginina forma parte de un grupo de aminoácidos que la planta huésped puede suministrar a la bacteria durante todo el proceso simbiótico²⁰⁷.

De lo anterior, se pudo determinar que los aminoácidos no polares tienen una influencia negativa en el desarrollo de las cepas, es decir que el crecimiento de las colonias en el medio enriquecido con alanina, leucina y valina como fuente nitrogenada es deficiente y solo en algunas de las cepas se pudo observar el desarrollo de las colonias. Esta característica contribuye enormemente a su diferenciación e identificación y por ende determina la utilidad de estos

Bacterial catabolism of nitrogen containing compounds in symbiotic nitrogen fixation. En : O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p. 22.

²⁰²RICHEY, B. et al. Op. cit. Citado por: O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p. 22.

²⁰³KOUCHI and FUKAI, Op. cit., Citado por: O' GARA et al. Op. cit. p. 96.

²⁰⁴LUQUE, Op. cit., p. 30.

²⁰⁵PALLERONI, N.J. Principios generales de Microbiología. 2 ed. Washington : Secretaria General de la Organización de Estados Americanos, 1980. Citado por: LUQUE, Op. cit. p. 30.

²⁰⁶NOVIKOVA, Op. cit., p. 738.

²⁰⁷DENARIE; TRUCHET and BERGERON, Op. cit., p. 52.

aminoácidos no polares como marcadores rizobiales. A diferencia de los aminoácidos no polares, en los polares como ácido glutámico, arginina y asparagina, todas las cepas rizobiales mostraron su gran habilidad para usarlos como fuentes nitrogenadas, originando un gran desarrollo de las colonias y evitando establecer diferencias significativas entre las cepas y por ende limitando su diferenciación, lo que confirma que no son adecuados como marcadores rizobiales, al igual que el nitrato de amonio en el cual no se desarrollo ninguna de las cepas rizobiales estudiadas.

Finalmente, los resultados obtenidos indican que cada una de las cepas rizobiales evaluadas presenta un comportamiento particular frente a cada fuente nitrogenada y que la polaridad de los aminoácidos tiene una influencia marcada en el crecimiento del rizobio, razón por la cual esta propiedad define de alguna manera las características y proporciones del crecimiento de las cepas de rizobio. Por lo tanto, se puede concluir que las fuentes de nitrógeno son útiles como marcadores rizobiales porque establecen diferencias entre las cepas en relación a su alta o baja capacidad de crecer con cada fuente nitrogenada, como resultado de sus propiedades metabólicas.

5.3.2 Comportamiento de los aislados rizobiales frente a diferentes fuentes carbonadas. En la tabla 9 se observa el comportamiento de todos los aislados rizobiales con los diferentes fuentes carbonadas, el signo + corresponde al crecimiento positivo de la cepa y el signo – corresponde al crecimiento negativo o no crecimiento de la cepa. De los monosacáridos evaluados como fuentes de carbono, la glucosa se constituyó en el compuesto carbonado de mayor asimilación por parte de todos los aislados de *Rhizobium* ensayados. Este comportamiento puede tener explicación en el papel central de la glucosa como molécula de combustible para la respiración y por ende para obtención de energía²⁰⁸.

Con manosa el 78 % de los aislados crecieron eficientemente, pero en el medio de cultivo enriquecido con galactosa hubo poco desarrollo de las colonias. Solo el 22% de ellos fueron capaces de usar este carbohidrato como fuente de carbono. Mientras que, cepas de *Rhizobium* de crecimiento lento tienen mayor afinidad por la galactosa, aunque su consumo es lento con un periodo de retardo prolongado²⁰⁹. Novikova et al²¹⁰ y Hungría et al²¹¹ describen un comportamiento similar con cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium sinorrhizobium fredii* respectivamente, en cuanto a su capacidad para crecer en glucosa, pero difieren en los resultados descritos para la manosa; en estos estudios todas las cepas evaluadas fueron capaces de asimilar este monosacárido. A diferencia de las

²⁰⁸LUQUE, Ernesto. Bioquímica : Metabolismo y Genética molecular. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 1995. p. 80.

²⁰⁹SATO and SUGAWARA, Op. cit., p. 245.

²¹⁰NOVIKOVA, et al ,Op. cit., p. 738.

²¹¹HUNGRIA et al, Op. cit., p. 1349-1361.

Tabla 9. Comportamiento de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en diferentes fuentes carbonadas

Cepa	FUENTES CARBONADAS										
	Sacarosa	Glucosa	Manosa	Galactosa	Lactosa	Almidón	Rafinosa	Arabinosa	Ribosa	Maltosa	Dulcitol
LFBN 101	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
LFBN 102	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
LFBN 103	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
LFBN 104	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
LFBN 105	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
LFBN 106	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
LFBN 107	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
LFBN 108	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LFBN 109	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
LFBN 110	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
RUN 10	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
RUN 06	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
RUN 07	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
RUN 12	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
F-107 B	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
C - 89	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
T - 58	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
I - 37	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+

investigaciones realizadas con *Rhizobium*, las bacterias del genero *Bradyrhizobium* presentaron un comportamiento diferente cuando fueron evaluadas con glucosa, manosa y galactosa; el 96% de las cepas fueron capaces de utilizar eficientemente la galactosa y manosa como fuente de carbono, mientras que se presentó una gran variación en las cepas en la utilización de la glucosa como fuente de carbono²¹².

Los disacáridos maltosa, sacarosa y lactosa tienen en común la glucosa como uno de los componentes estructurales de las moléculas y en este ensayo la glucosa es una de las hexosas de mayor asimilación por parte de los aislados. En la maltosa se observó un desarrollo abundante de las colonias en todos los aislados de *Rhizobium* estudiados, posiblemente la unión de dos moléculas de glucosa favorece aun más el desarrollo de las colonias.

En cuanto a la sacarosa el 83% de los aislados fueron capaces de crecer en el medio enriquecido con este carbohidrato. Sin embargo, se ha podido determinar que esta no es una fuente de carbono primaria para el bacterioide²¹³ y aunque es la mejor fuente de carbono reducido que entra al nódulo, es metabolizada a ácidos orgánicos y la energía para la fijación de nitrógeno se deriva principalmente de la oxidación de estos ácidos²¹⁴.

Los resultados indican que de todos los carbohidratos probados, la hexosa galactosa, la pentosa arabinosa y el azúcar alcohol dulcitol promovieron el desarrollo de solo algunas de las cepas estudiadas; esta característica particular de cada cepa basada en su capacidad de catabolizar o no dichos carbohidratos permite su diferenciación y caracterización, confirma la utilidad de estas fuentes de carbono como marcadores rizobiales y por ende garantiza la confiabilidad del método.

A partir del comportamiento de las cepas rizobiales con las fuentes de nitrógeno y carbono (tablas 8 y 9), se construyó una matriz fenotípica con 23 parámetros teniendo en cuenta la presencia de crecimiento valorada como 1 o la ausencia valorada como 0. El análisis de la matriz en el programa estadístico NTSYS y el índice Jaccard (J) como coeficiente de similitud, arrojó un fenograma (figura 11) basado en la similaridad de las cepas rizobiales para utilizar los sustratos ensayados como fuentes de nitrógeno y carbono. Cabe anotar que el índice de similitud usado solo considera la presencia comparativa de las características y no la ausencia.

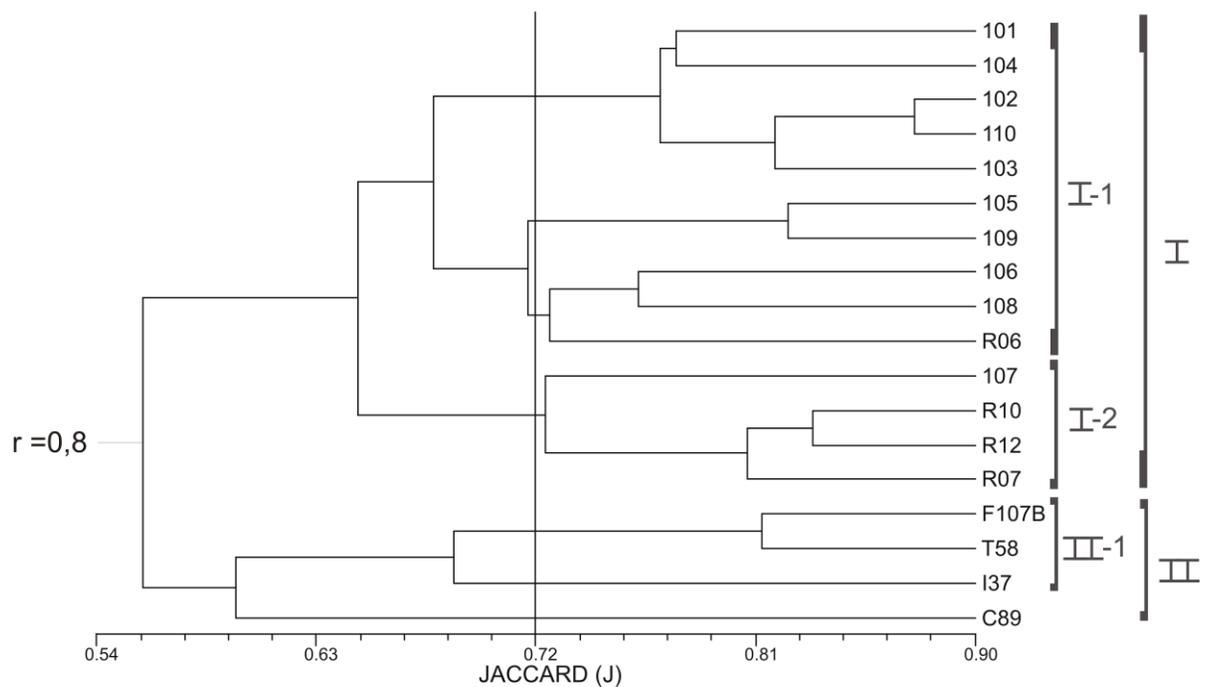
²¹²PADMANABHAN; HIRTZ and BROUGHTON, Op. cit., p. 25.

²¹³DILWORTH and GLENN, Op. cit. Citado por : KAHN; KRAUS and SHATTERS. En: O'GARA; MANIAN and DREVON. Op. cit., p. 21.

²¹⁴O'GARA et al. Dicarboxylic acid utilisation and nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium*-Legume Symbiosis. En : O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p.149.

El análisis cluster, produjo dos grandes grupos unidos a 0.558 niveles de similaridad relativa. Dentro del cluster I dos subclusters están unidos a un nivel de similaridad de 0.648, el subcluster I-1 formado por 9 de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* aisladas de suelos cultivados con arveja procedentes de la vereda El Rosal de San Juan, Municipio de Ipiales. La mayoría de estas cepas se caracterizaron por su habilidad para crecer con varias fuentes de carbono y nitrógeno. Estudios realizados confirman que cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos procedentes de suelos tradicionalmente cultivados con leguminosas son más efectivas usando fuentes de carbono y nitrógeno²¹⁵. El subcluster I-1 presenta dos pequeños subcluster con 0.679 nivel de similaridad: el de la parte superior conformado por 5 cepas, cuatro de ellas consideradas las más efectivas en la fijación simbiótica de nitrógeno y con buenas características de crecimiento en los medios enriquecidos con fuentes carbonadas y nitrogenadas y la cepa LFBN 102 que aunque no establece simbiosis que se pueda considerar como efectiva (49%) con la leguminosa arveja es la menos inefectiva de las seis cepas restantes.

Figura 11. Fenograma representando similitudes fenotípicas de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* con base en la presencia y ausencia de crecimiento en fuentes de nitrógeno y carbono.



²¹⁵HUNGRIA et al, Op. cit., p. 1355.

El cluster II incluye cuatro de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* tomadas del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño y procedentes de diferentes áreas geográficas del Departamento. Esta conformado por tres de las cepas mas inefectivas en la fijación simbiótica de nitrógeno la I-37, F-107B y T-58 ubicadas dentro de un mismo subcluster y la cepa C-89 separada del grupo al nivel de 0.594. Estas cepas presentaron baja capacidad para usar fuentes de carbono, pero un mejor consumo de aminoácidos de carácter no polar como fuente de nitrógeno. El valor cofenético obtenido para la matriz de consumo de fuentes de carbono y nitrógeno por las cepas rhizobiales fue de 0.80, lo que indica un buen ajuste del agrupamiento a la serie de datos.

Con el fin de establecer la razón de los agrupamientos de los clusters, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales PCA, usando como coeficiente de similitud una correlación entre variables. La salida del programa (cuadro 2), mostró la existencia de tres componentes principales y las correlaciones de cada componente principal con cada variable.

Cuadro 2. Matriz de cargas o Eigen Vectores para cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en fuentes nitrogenadas y carbonadas

Fuente	Componente		
	C1	C2	C3
Valina	0.6451	0.3084	0.0397
Serina	-0.3648	0.2976	0.4456
Cisteina	-0.2915	0.3239	-0.1249
Acido glutámico	0.0000	0.0000	0.0000
Lisina	-0.3181	0.2053	-0.4758
Leusina	0.4441	0.5452	0.2342
Asparagina	0.0000	0.0000	0.0000
Nitrato de amonio	0.0000	0.0000	0.0000
Acido aspártico	0.0978	-0.5868	0.2966
Alanina	0.5336	0.5357	-0.2640
Treonina	0.2853	0.3056	-0.0316
Arginina	0.0000	0.0000	0.0000
Sacarosa	-0.8839	0.1480	0.0052
Glucosa	0.0000	0.0000	0.0000
Manosa	-0.6383	-0.0043	-0.1356
Galactosa	-0.3281	0.1267	-0.1194
Lactosa	0.3144	-0.6224	0.3565
Almidón	-0.4913	-0.6115	-0.1195
Rafinosa	-0.5242	-0.0085	-0.5667
Arabinosa	0.4427	-0.2780	-0.5950
Ribosa	-0.6430	0.3833	0.1277
Maltosa	0.0000	0.0000	0.0000
Ducitol	0.3480	-0.1683	-0.7973

Se pudo determinar que el componente principal PC1 presentó mayor correlación positiva con valina como fuente nitrogenada y correlación negativa alta con sacarosa y en menor proporción con ribosa y manosa.

PC2 tuvo una correlación negativa con lactosa y almidón como fuentes carbonadas.

Por su parte el componente principal PC3 presentó una correlación negativa alta con dulcitol, lo cual confirma la poca afinidad de las cepas rizobiales por azúcares y alcoholes como fuentes de carbono.

En el gráfico de componentes principales en dos dimensiones (figura 12), el eje X corresponde al componente número 1 (PC1) y el eje Y al componente número 2 (PC2) y representa la posición de las 18 cepas rizobiales en el espacio de las variables.

Se pudo observar que en el primer componente (eje X), la mayoría de las observaciones se sitúan en valores negativos, con algunos datos que sobresalen por su carácter positivo, mientras que en el segundo componente las observaciones se dispersan hacia valores centrales, aunque hay algunos datos que destacan por sus valores distintos especialmente positivos.

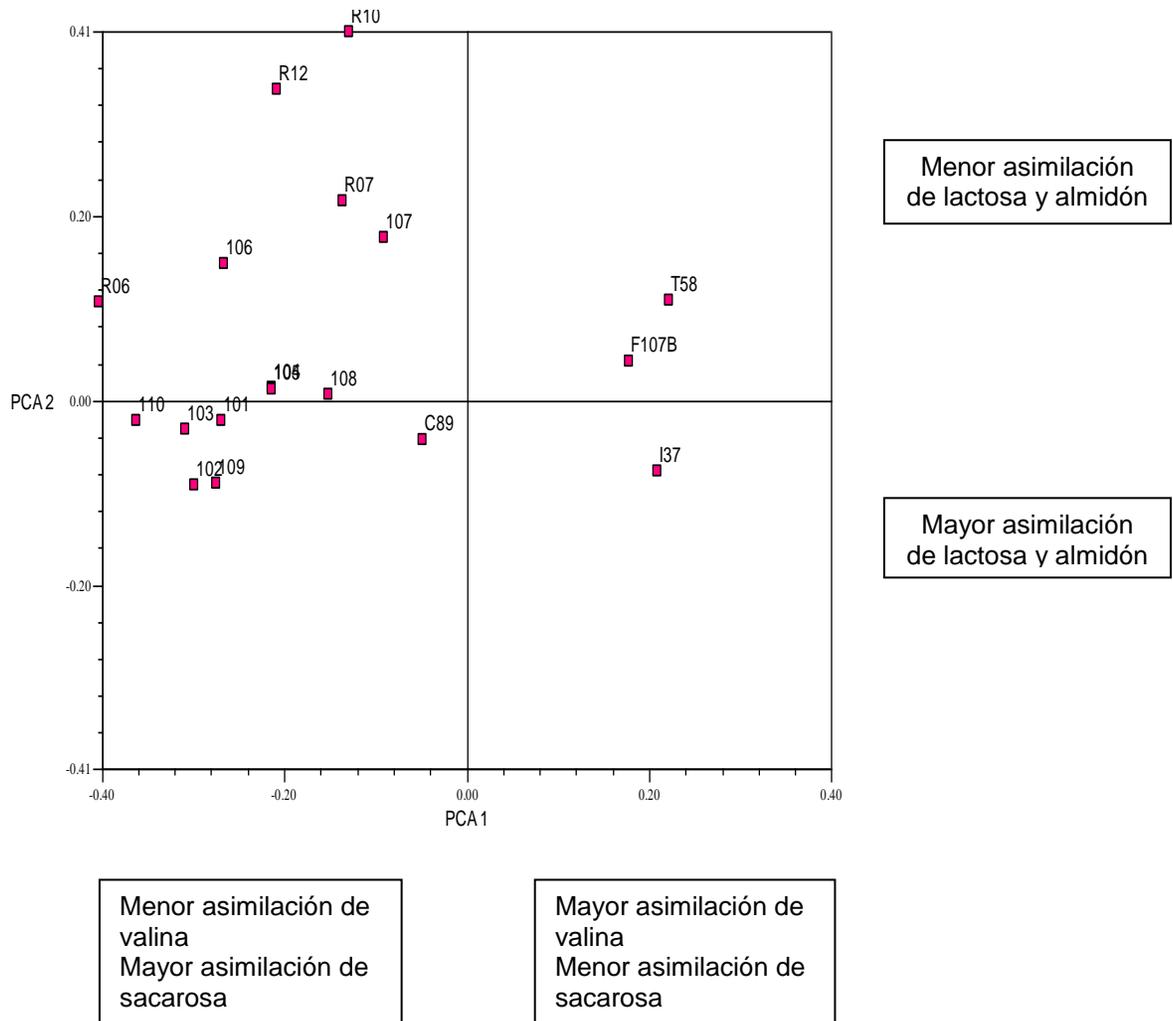
La correlación positiva presentada por PC1 con valina y negativa con sacarosa, ribosa y manosa determinó que las cepas rizobiales situadas en el lado derecho del gráfico presentan mayor capacidad de asimilación del aminoácido valina como única fuente de nitrógeno, pero menor afinidad por sacarosa, ribosa y manosa como fuentes de carbono, como es el caso de las cepas T-58, F-107B y I-37, consideradas las más inefectivas en la fijación simbiótica de nitrógeno, mientras que en el lado izquierdo del gráfico, se disponen el resto de las cepas, incluidas las más efectivas en la fijación de nitrógeno. Estas cepas efectivas (LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110) se destacaron por presentar patrones de crecimiento en valina especialmente bajos entre ausencia de crecimiento y crecimiento muy escaso. Por el contrario, las colonias se desarrollaron eficientemente en los medios enriquecidos con sacarosa, ribosa y manosa.

Parece que la afinidad de cepas de *Rhizobium leguminosarum* por aminoácidos de tipo no polar está relacionada con sus propiedades simbióticas. Existe evidencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* dependientes nutricionales de leucina, isoleucina y valina totalmente inefectivas en la fijación de nitrógeno²¹⁶. Mientras que el consumo de sacarosa como fuente de carbono, fue relevante en las cepas aisladas en esta investigación (cepas LFBN), posiblemente porque este azúcar concentrado en los nódulos es un producto de la reciente actividad fotosintética de las plantas de las cuales fueron aisladas estas bacterias. Por otro lado la sacarosa

²¹⁶BERINGER, J.E. Citado por: DENARIE; TRUCHET and BERGERON. Op. cit., p. 51.

es metabolizada en los nódulos a ácidos orgánicos y la energía para la fijación de nitrógeno es derivada de la oxidación de estos ácidos²¹⁷. Esta afirmación fundamenta el consumo de este sustrato por las cepas de *Rhizobium* efectivas.

Figura 12. Grafico en dos dimensiones de PC1 y PC2 representando la posición de las 18 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en el espacio de las variables.



En cuanto a PC2, la correlación negativa indica que las cepas rhizobiales ubicadas en la parte inferior del gráfico presentan buena capacidad de asimilación de los sustratos como lactosa y almidón. Este consumo por almidón, puede estar relacionado con papel de los polisacáridos rhizobiales actuando como antagonistas en la regulación negativa de la inducción de defensa de la planta²¹⁸.

²¹⁷O'GARA et al. Op. cit. En : O'GARA; MANIAN and DREVON, Op. cit., p.149.

²¹⁸MITHÖFER, Op. cit., p. 440.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS RHIZOBIALES MEDIANTE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

Con los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los 18 aislados rizobiales en los antibióticos estreptomycin, nitrofurantoina, trimethopin, penicilina, tetraciclina y ampicilina se construyó una matriz fenotípica que se analizó en el programa estadístico NTSYS y el coeficiente Distancia Taxonomica Promedio (DIST). Un ejemplo de los modelos de resistencia y sensibilidad presentados por la cepa LFBN 101 frente a los antibióticos evaluados se puede observar en la figura 13.

Figura 13. Resistencia y sensibilidad presentado por LFBN 101 frente a los diferentes antibióticos evaluados.



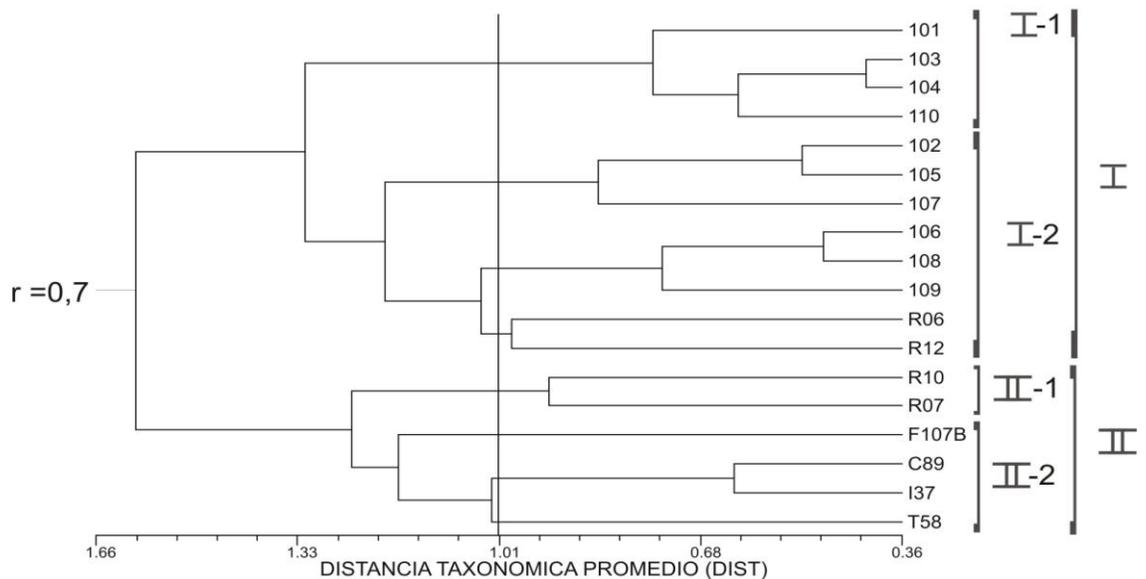
El análisis permitió agrupar las cepas en dos grandes grupos (figura 14) unidos a 1.594 niveles de similaridad. El cluster I compuesto de todas las cepas de *Rhizobium* aisladas en esta investigación y de dos cepas del Banco de Germoplasma: la RUN06 y RUN12. El cluster II está compuesto de seis cepas de diferentes orígenes geográficos.

El subcluster I-1, compuesto por las cepas 101, 103, 104 y 110, con 0.754 niveles de similaridad, consideradas las cepas más efectivas en la fijación de nitrógeno, se caracterizaron por ser resistentes a estreptomycin y presentaron patrones de sensibilidad altos frente a antibióticos como penicilina y ampicilina.

El subcluster I-2, formado por ocho cepas unidas a 1.189 niveles de similaridad, se subdivide en dos cluster más pequeños. El primero de ellos constituido por tres cepas; 102, 105 y 107, presentaron valores altos en los diámetros de los halos de inhibición frente a los antibióticos; nitrofurantoina, ampicilina y penicilina. Sin embargo, la relación con su efectividad no es consistente porque la cepa 107 es la menos efectiva en la fijación de nitrógeno de todas las cepas aisladas en este trabajo, mientras que las cepas 102 y 105 presentaron porcentajes de efectividad

parecidos de 49% y 48.4% respectivamente. Por otro lado, se observa que las cepas: RUN 06 y RUN 12 se encuentran más estrechamente relacionadas con las cepas 106, 108 y 109, a 1.042 niveles de similitud. Todas estas cepas presentaron altos valores de sensibilidad frente al antibiótico trimethopim, pero no se pudo establecer alguna relación con la efectividad en la fijación de nitrógeno.

Figura 14. Fenograma representando similitudes fenotípicas de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* con base en los diámetros de los halos de inhibición obtenidos frente a las antibióticos evaluados.



El cluster II, está formado por seis de las ocho cepas provenientes del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño, con un nivel de similitud de 1.244. Son cepas provenientes de diferentes lugares de origen y presentaron los valores mas pequeños para los halos de inhibición frente a antibióticos como nitrofurantoina y ampicilina.

Finalmente, el valor cofenético obtenido para la matriz de resistencia y sensibilidad de las cepas rizobiales fue de 0.70, lo que indica un buen ajuste del agrupamiento a la serie de datos.

Para establecer la razón de los agrupamientos de los clusters, se llevo a cabo un Análisis de Componentes Principales PCA, usando como coeficiente de similitud una correlación entre variables. La matriz de correlación (cuadro 3), determinó tres componentes principales y las correlaciones de cada componente principal con cada variable.

Cuadro 3. Matriz de cargas o Eigen Vectores para cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en antibióticos.

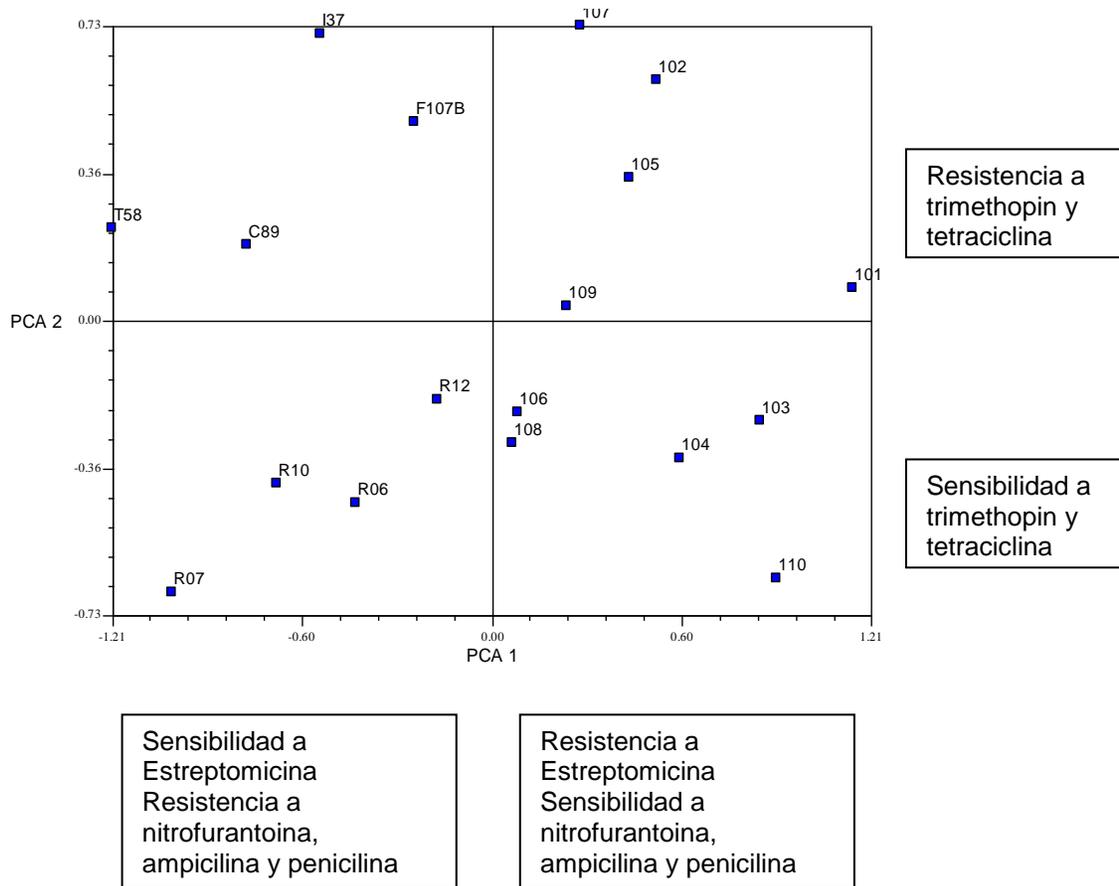
Antibiótico	Componente		
	C1	C2	C3
Nitrofurantoina	0.7962	0.2462	0.4288
Estreptomina	-0.7802	0.2838	-0.2289
Trimethopin	-0.2030	-0.8163	0.4622
Ampicilina	0.8561	0.0039	0.1136
Tetraciclina	0.4227	-0.6203	-0.6211
Penicilina	0.7940	0.1493	-0.3286

El componente PC1 tuvo alta correlación positiva con los antibióticos ampicilina, nitrofurantoina y penicilina y alta correlación negativa con estreptomina. Esto significa, que las cepas rizobiales dispuestas al lado derecho del gráfico en dos dimensiones de PC1 y PC2 (figura 15) presentaron grandes diámetros de los halos de inhibición, indicio de cepas sensibles a las concentraciones de los antibióticos nitrofurantoina, ampicilina y penicilina, pero resistentes a estreptomina. En esta figura, se observa que las 10 cepas aisladas en esta investigación se ubicaron al lado derecho, mientras que las otras cepas al lado izquierdo.

El PC2 presento correlación negativa alta con el antibiótico trimethopin, seguido de la tetraciclina, esto sugiere que las cepas rizobiales dispuestas en la región negativa del gráfico (parte inferior) son mas sensibles a las concentraciones evaluadas para estos antibióticos. A este grupo corresponden tres de las cepas consideradas las más efectivas en la fijación biológica de nitrógeno (104, 103 y 110) y las cepas RUN 07, RUN 10, RUN 06, RUN 12, mientras que las cepas más inefectivas (I-37, T-58 y F-107B) junto con el resto se caracterizaron por presentar diámetros menores para los halos de inhibición; por ende, son cepas más resistentes a las concentraciones de los antibióticos probados.

El gráfico reveló gran dispersión en ambos componentes, pero también es evidente que las cepas se encuentran totalmente sectorizadas. Aquellas cepas consideradas efectivas se encuentran en posición totalmente opuesta a las inefectivas, si bien es cierto que no existen estudios que soporten alguna relación entre la efectividad y la resistencia intrínseca frente a algún antibiótico en particular, es indudable que tanto las cepas efectivas como las inefectivas en la fijación biológica de nitrógeno en este estudio, poseen patrones de resistencia y sensibilidad específicos frente a los antibióticos evaluados.

Figura 15. Grafico en dos dimensiones de PCI y PC2 representando la posición de las 18 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en el espacio de las variables (antibióticos).



5.5 EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD DE LA CEPA RHIZOBIAL MAS EFECTIVA EN LA FIJACION DE NITROGENO MARCADA FRENTE A FUENTES NITROGENADAS, CARBONADAS Y ANTIBIOTICOS.

Como el análisis estadístico previo determinó que la cepa LFBN 104 presentó el porcentaje de efectividad más alto, se tomo esta cepa como referencia para verificar la persistencia de su efectividad e infectividad después de la marcación en las diferentes fuentes y antibióticos evaluados.

La evaluación final de la simbiosis se basó en los mismos parámetros utilizados para la determinación de la infectividad y efectividad de las 18 cepas rhizobiales: el peso seco de la parte aérea de las plantas y el número de nódulos en la raíz de la planta de arveja inoculada respectivamente.

Se utilizaron tres diseños completamente al azar, cada uno con cinco tratamientos y cuatro replicas por tratamiento, con el fin de determinar la efectividad de la cepa LFBN 104 después de su crecimiento en las fuentes nitrogenadas, carbonadas y antibióticos. Con los datos del peso seco de la parte aérea de las plantas recolectadas se realizó un análisis de varianza con un límite de confianza del 99% (anexos G, H e I) y como prueba de significancia, la prueba de Tukey al 99% de confianza para cada diseño experimental.

Los valores presentados en los cuadros 4, 5 y 6 son la media de cuatro replicas por tratamiento para cada experimento. Los valores con literales iguales significan que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Del cuadro 4, se puede observar que los tratamientos T3, T4 y T5 correspondientes a la cepa LFBN 104 marcada con valina, leucina y cisteína respectivamente, no son aparentemente similares al testigo control porque no presentan literales iguales, sin embargo los porcentajes de efectividad mayores del 60% indican que la cepa es efectiva en la fijación de nitrógeno, y que esta propiedad se conservó aun después de ser tratada con estas fuentes de nitrógeno. Por otra parte los cuadros 5 y 6 muestran que los tratamientos correspondientes a la cepa LFBN 104 desarrollada en sacarosa, rafinosa y manosa como fuente de carbono y en estreptomycin, trimethopin y penicilina como antibióticos presentan literales iguales (A) al testigo control, enriquecido con KNO_3 durante su desarrollo, esto significa que son estadísticamente similares a él y por ende que su capacidad de fijar nitrógeno no se vio afectada por su crecimiento en estas fuentes de carbono y en los antibióticos probados.

Cuadro 4. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en fuentes nitrogenadas.

TRATAMIENTOS		Peso seco parte aérea	Porcentaje de efectividad
T1	TESTIGO ABSOLUTO	0.3750 C	
T2	TESTIGO CONTROL	4.5275 A	
T3	LFBN 104 + Valina	4.1225 AB	91
T4	LFBN 104 + Leucina	4.0775 AB	90
T5	LFBN 104 + Cisteína	3.9200 B	87

Letras distintas difieren estadísticamente

Cuadro 5. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en fuentes carbonadas.

TRATAMIENTOS		Peso seco parte aérea	Porcentaje de efectividad
T1	TESTIGO ABSOLUTO	0.3875 B	
T2	TESTIGO CONTROL	4.7700 A	
T3	LFBN 104 + Sacarosa	4.2525 A	89
T4	LFBN 104 + Rafinosa	4.3750 A	92
T5	LFBN 104 + Manosa	4.5225 A	95

Letras distintas difieren estadísticamente

Cuadro 6. Efectividad de la cepa LFBN 104 marcada por su crecimiento en antibióticos.

TRATAMIENTOS		Peso seco parte aérea	Porcentaje de efectividad
T1	TESTIGO ABSOLUTO	0.2600 B	
T2	TESTIGO CONTROL	4.5875 A	
T3	LFBN 104 + Estreptomina	4.0800 A	89
T4	LFBN 104 + Trimethopin	4.2075 A	92
T5	LFBN 104 + Penicilina	4.1925 A	91

Letras distintas difieren estadísticamente

De igual forma, la infectividad de cepa LFBN 104, se determinó mediante la presencia, ausencia y número de nódulos en la raíz de las plantas de arveja inoculadas. Todos los tratamientos inoculados con excepción de los tratamientos absoluto y control (T1 y T2) presentaron nodulación abundante en la raíz de la planta y nódulos de coloración roja indicio de la presencia de leghemoglobina, que es otro indicativo de la efectividad de los nódulos.

6. CONCLUSIONES

★ Se aislaron y purificaron 10 aislados rizobiales procedentes del Rosal de San Juan y se purificaron 8 aislados más procedentes del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño. De los 18 aislados evaluados cuatro de ellos LFBN 101 (87.3%), LFBN 103 (91.2%), LFBN 104 (94.8%) y LFBN 110 (84.2%) fueron efectivos en la fijación biológica de nitrógeno y pueden ser utilizados como inoculantes en campo.

★ Las cepas provenientes del Banco de Germoplasma de la Universidad de Nariño presentaron los porcentajes más bajos de efectividad e infectividad de todas las cepas estudiadas, dentro de las cuales se destaca la cepa I-37 (8.9%), T-58 (13%) y F-107B (10.7%).

★ Se pudo determinar que cada rizobial presenta un comportamiento particular frente a cada fuente nitrogenada y que la polaridad de los aminoácidos tiene una influencia marcada en el crecimiento del *Rhizobium*, razón por la cual esta propiedad define de alguna manera las características y proporciones del crecimiento de las cepas rizobiales. Por lo tanto las fuentes de nitrógeno son útiles como marcadores rizobiales porque establecen diferencias entre las cepas en relación a su alta o baja capacidad de crecer con cada fuente nitrogenada, como resultado de sus propiedades metabólicas diferentes.

★ Carbohidratos como galactosa, arabinosa y el azúcar alcohol dulcitol, promovieron el desarrollo de solo algunas de las cepas estudiadas así: galactosa (LFBN 103, LFBN 108, RUN 06, RUN 12); arabinosa (LFBN 104, LFBN 105, LFBN 106, LFBN 108, LFBN 109, F-107B, T-58 e I-37); dulcitol (LFBN 106, LFBN 107, LFBN 108 LFBN 109, F-107B e I-37), esta característica particular de cada cepa basada en su capacidad de metabolizar o no dichos carbohidratos permitió su diferenciación y caracterización y confirmó la utilidad de estas fuentes de carbono como marcadores rizobiales y por ende garantiza la confiabilidad del método.

★ Se pudo determinar que las cepas LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110 consideradas efectivas en la fijación de nitrógeno presentaron una marcada tendencia al consumo de compuestos de carbono como sacarosa, ribosa y manosa y menos afinidad por valina como fuente de nitrógeno, determinando que la asimilación de fuentes carbonadas y nitrogenadas está relacionada con sus propiedades simbióticas.

★ Los patrones de resistencia y sensibilidad particulares presentados por cada cepa, permitieron establecer el grado de similaridad y diferencia entre ellas, dando lugar a su reconocimiento e identificación

★Las cepas efectivas LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110 fueron sensibles a los antibióticos: nitrofurantoina 300 µg/sensidisco, trimethopin 25 µg/sensidisco, penicilina 10 µg/sensidisco, tetraciclina 30 µg/sensidisco y ampicilina 10 µg/sensidisco, comportamiento totalmente opuesto a las cepas inefectivas en la fijación de nitrógeno

★El crecimiento de las cepas en diferentes fuentes carbonadas, nitrogenadas y antibióticos no produjo alteración alguna en la capacidad infectiva y efectiva de las cepas.

7. RECOMENDACIONES

- ★Evaluar bajo condiciones de campo la capacidad efectiva de las cepas LFBN 101, LFBN 103, LFBN 104 y LFBN 110, con el fin de implementar este tipo de biofertilización para incrementar la producción de un cultivo.
- ★Evaluar la capacidad de resistencia de las cepas efectivas a factores adversos, con el fin de seleccionar las más competitivas para ser utilizadas en bioabonos.
- ★Optimizar medios de cultivo para la producción de biomasa rizobial.

BIBLIOGRAFIA

BOGINO, Pablo et al. Competitiveness of a *Bradyrhizobium sp.* Strain in Soils Containing Indigenous Rhizobia. *Curr. Microbiology*. [on line], 2007. Disponible en internet : www.journals.asm.org/search.dtl.

BRADLEY, Rosemary and NOLT, Judith. The legume-Rhizobium Symbiosis : Evaluation, selection and Agronomic Management. Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1988. 77 p.

BROUGHTON, W. J. Control of specificity in Legume-*Rhizobium* associations. En : *Journal applied Bacteriology*. Vol. 45 (1978); p. 165-194.

CABRERA, Lucia y GUEVARA, Claudia. Caracterización de cepas de *Rhizobium Leguminosarum bv. Phaseoli* mediante la técnica de ELISA y resistencia a antibióticos. San Juan de Pasto, 2003, 75 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de química.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Simbiosis Leguminosa–Rhizobio : manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali : Artes graficas del CIAT, 1988. 178 p.

CULLIMORE, J.; RANJEVA, R. and BONO, J. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. En : *Trends in Plant Science*. Vol.6, No.1 (Jan. 2001); p. 24-30.

CHEMINING'WA, George and VESSEY, Kevin. The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. En : *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 38 (2006); p. 294-302

GRAHAM, Peter. Biological dinitrogen fixation : symbiotic association. En: Sylvia, D. et al. *Soil microorganismos in the environment*. s.p.i. 39 p.

HUNG, Mei-Hua et al. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. En : *Pedobiologia*. Vol. 49 (2005); p. 577-584.

HUNGRIA, Mariangela et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. En : *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 33 (2001); p. 1349-1361.

KALITA, Michael and MALEK, Wanda. Phenotypic and genomic characteristics of Rhizobia isolated from *Genista tinctoria* Root Nodules. En : Systematic and Applied Microbiology. Vol. 27 (2004); p. 707-715.

LUQUE, Ernesto. Bioquímica : Metabolismo y Genética molecular. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 1995. 249 p.

_____. Utilización de fuentes nitrogenadas como marcadores rizobiales. San Juan de Pasto, 1992. 51 p. Trabajo de investigación (Profesor Titular) : Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Programa de Química.

MARTINEZ, Esperanza et al. *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Tress. En : International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 41 (1991); p. 417-426.

MITHÖFER, Axel. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. En : TRENDS in Plant Science. Vol. 7, No. 63 (oct. 2002); p. 440-444.

MONTAÑEZ, A.; DANSO, K. A. and HARDARSON, G. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. En : Applied Soil Ecology. Vol. 2 (1995); p. 165-174.

MRABET, Moncef et al. Competitiveness and symbiotic effectiveness of a *R. gallicum* strain isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. En : European Journal Agronomy. Vol. 22 (2005); p. 209-216.

NUTMAN, P. S. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Great Britain : Cambridge University Press, 1976. 584 p. ISBN 0-521-20645-6.

NOVIKOVA, Natalie et al. Numerical Taxonomy of *Rhizobium* Strains from Legumes of the Temperate Zone. En : International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 44 (1994); p. 734-742.

NTSYS. Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System.[CD-ROM]. Versión 2.1. [New York].

O'GARA, F., MANIAN, . And DREVON, . J.J. Physiological Limitations and the genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation. Boston : Kluwer Academic Publishers, 1987. 209 p.

_____, F. et al. Carbon metabolism and catabolite repression in *Rhizobium* spp. En : FEMS Microbiology Reviews. Vol. 63 (1989); p. 93-102.

PADMANABHAN, S; HIRTZ, R. D. and BROUGHTON W. J. Rhizobia in tropical legumes cultural Characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. En: Soil Biology & Biochemistry. Vol. 22 (1990); p. 23-28.

PRELL, Juergen and POOLE, Philip. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. En : Trends in Microbiology. Vol. 16, No. 4 (apr. 2006); p. 161-168

RAMIREZ, Margarita. Capacidad competitiva de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* con trébol blanco variedad huia (*Trifolium repens*). En : Revista suelos ecuatoriales. Vol. 27 (1997); p. 217-224.

RIVAS, Raúl et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. Nov. that Nodulates and Fixes Nitrogen in Simbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. En : Systematic and applied microbiology. Vol. 26 (2003); p. 47-53.

ROME, Sophie et al. *Sinorhizobium medicae* sp. Nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. En : International Journal of systematic bacteriology. Vol. 46, No.4 (1996); p. 972-980.

SACSAQUISPE, Rosa y VELASQUEZ, Jorge. Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima, Perú : Ministerio de Salud, 2002. 68 p.

SATO, Tetsuya and SUGAWARA, Shiro. Biochemical and Serological characteristics of two similar soybean rhizobia. En : Soil Sci. Plant Nutr. Vol. 34, No. 2 (1988); p. 241-246.

SEMINARIO SOBRE MICROBIOLOGIA DE SUELOS APLICADA A LA PRODUCCION AGROPECUARIA. (2º : 1983 : Bogotá). Memorias seminario sobre microbiología de suelos aplicado a la producción agropecuaria. Bogotá : Suelos ecuatoriales. Vol. 13, No. 2. 65 p.

SOMASEGARAN, Padma y HOBEN, Heinz. Métodos en la tecnología leguminosa-Rhizobium. Hawai : University of Hawaii NIFTAL project and MIRCEN, 1985. 360 p.

_____. Handbook for Rhizobia : Methods in Legume-Rhizobium Technology. New York : Springer-Verlag, 1994. 450 p. ISBN 0-387-94134-7.

STACEY, Gary et al. Genetics and functional genomics of legume nodulation. En : Plant Biology. Vol. 9 (2006); p. 110-121.

URZÚA, H. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. En : Ciencia e investigación agraria. Vol. 32, No. 2 (may-ago, 2005); p. 133. p. 133-150.

VANCE, Carroll and GANTT, Stephen. Control of Nitrogen and Carbon metabolism in root nodules. En : Physiology Plantarum. Vol. 85 (1992); p. 266-274.

_____. Root-Bacteria interactions : Symbiotic Nitrogen Fixation. En : WAISEL, Yoav; ESHEL, Amram and KAFKAFI, Uzi. Plants roots : the hidden half. New York : Marcel Dekker, 1991. p. 671-702.

VESSEY, Kevin and CHEMINING'WA, George. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* in cultivated soil of the eastern Canadian prairie. En : Soil Biology & biochemistry. Vol. 38 (2006); p. 153-163.

VILLEGAS, Maria del Carmen et al. Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciariata* constitute a novel biovar (bv. *medicaginis*) of *S. meliloti*. En : Sistematic and applied microbiology. Vol. 29 (2006); p. 526-538.

VINCENT, J. M. Manual práctico de Rizobiología. Buenos Aires, Argentina : Hemisferio Sur, 1975. p. 92.

ZAHARAN, Hamdi. Rhizobia from wild legumes : diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. En : Journal of biotechnology. Vol. 91 (2001); p. 143-153.

ANEXOS

Anexo A. Condiciones de asepsia recomendada

Para obtener buenas condiciones de asepsia se trabajó en campana de flujo laminar previamente esterilizada con alcohol absoluto. Además, se utilizó un mechero Bunsen para esterilizar en su llama asas y pinzas metálicas. Asimismo los materiales de vidrio y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120 °C y a 15 libras de presión durante 30 minutos²¹⁹.

Anexo B. Medios de cultivo y soluciones

Los medios de cultivo utilizados en esta investigación fueron los descritos por Somasegaran y Hoben²²⁰.

● Medio de Levadura Manitol (LM)

Manitol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agua destilada	1 litro

Se ajusta el pH a 6.8.

● Levadura Manitol Agar (LMA)

Medio LM	1 litro
Agar	15 g

● Glucosa Peptona Agar (GPA)

Glucosa	5 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro
Púrpura de bromocresol (1g en 100 ml de etanol)	10 ml
PH final de 6.7.	

²¹⁹SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 265.

²²⁰SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 265-269.

● LMA con azul de Bromotimol

Medio LM	1 litro
Azul de bromotimol (0.5 g en 100 ml de etanol)	5ml

● ROJO CONGO

Rojo congo	0.25 g
Etanol	100 ml

10 ml por cada litro de LMA

Las soluciones utilizadas en este estudio fueron las descritas por Vincent²²¹.

● Soluciones para tñido GRAM

Soluci3n I Soluci3n de cristal violeta

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml

Soluci3n II. Soluci3n de yodo

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml

Soluci3n III. Etanol al 95%

Soluci3n IV. Revelador

Safranina al 2.5% en etanol	10ml
Agua destilada	100 ml

● Solucion Jensen

CaHPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃ O	1 g

²²¹VINCENT, 1970. Citado por: SOMASEGARAN y HOBEN, Op. cit., p. 266, 269 y 271.

Solución patrón de micronutrientes	1.0 ml
Agua destilada estéril	1.0 litro

● Solucion patron de micronutrientes

Acido borico	2.780 g
Sulfato de manganeso	1.540 g
Sulfato de zinc	0.210 g
Molibdato de sodio	4.360 g
Cloruro férrico	5.000 g
Sulfato de cobalto	0.004 g
Acido láctico	580 ml
Agua destilada	420 ml

Anexo C. Procedimiento de teñido Gram

Determinación de las reacciones de teñido Gram en bacterias de rhizobium:

- ★ Hacer manchas delgadas con las bacterias sobre un portaobjetos y fijar al calor.
- ★ Teñir las manchas con la solución I (cristal violeta) durante 1 minuto.
- ★ Lavar ligeramente con agua y agregar la solución II (yodo).
- ★ Escurrir inmediatamente y agregar de nuevo la solución II, durante 1 minuto.
- ★ Escurrir la solución II y decolorar con la solución III (alcohol al 95%) durante 60 segundos.
- ★ Lavar con agua y secar la mancha cuidadosamente.
- ★ Restituir el teñido con la solución IV (safranina) durante 5 minutos.
- ★ Lavar con agua y secar al aire.
- ★ Observar la preparación sobre aceite de inmersión, con el objetivo de 100: las células Gram positivas toman un color violeta oscuro; las Gram negativas son de color rojo claro²²².

²²²CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Op. cit., p. 6-2.

Anexo D. pH de los aislados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*

Aislado	pH
LFBN 101	6.33
LFBN 102	6.20
LFBN 103	6.23
LFBN 104	6.21
LFBN 105	6.26
LFBN 106	6.35
LFBN 107	6.22
LFBN 108	6.29
LFBN 109	6.17
LFBN 110	6.24
I-37	6.28
C-89	6.21
RUN 06	6.23
RUN 07	6.21
RUN 12	6.27
RUN 10	6.21
F-107B	6.20
T-58	6.26

Anexo E. ANOVA para efectividad

F de V	GL	CM
Tratamiento	19	9.4042260**
Error	60	0.0923863
Total	79	

**Altamente significativo al 99%

Anexo F. ANOVA para infectividad

F de V	GL	CM
Tratamiento	17	1261.44853**
Error	54	17.41204
Total	71	

**Altamente significativo al 99%

Anexo G ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en fuentes de nitrógeno

F de V	GL	CM
Tratamiento	4	11.67319250**
Error	15	0.04252833
Total	19	

**Altamente significativo al 99%

Anexo H. ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en fuentes de carbono

F de V	GL	CM
Tratamiento	4	13.54753250**
Error	15	0.07288833
Total	19	

**Altamente significativo al 99%

Anexo I. ANOVA para efectividad de la cepa LFBN 104 en antibióticos

F de V	GL	CM
Tratamiento	4	12.99081750**
Error	15	0.07781500
Total	19	

**Altamente significativo al 99%