



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO**

**Obtención de aislados rizobiales de *Vicia faba* L. y
determinación del tamaño poblacional de rizobios de
parcelas agrícolas del Páramo de Gavidia Estado
Mérida-Venezuela.**

Per. For. Laudin Casas Marquina.

Tutora: MSc. Maria Eugenia Marquina

Cotutora: Dra. Liccia Romero

MERIDA-VENEZUELA

2009





**INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL
BACHILLER**

LAUDIN CASAS MARQUINA

En Mérida a los 16 días del mes de julio del año 2009, a las 3 p.m. se reunieron los Profesores: María Eugenia Marquina (tutora), Benito Briceño y Roberto Skwierinski, de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado que sobre el tema: "Obtención de aislados rizobiales de *Vicia faba* L. y determinación del tamaño poblacional de rizobios de parcelas agrícolas del Páramo de Gaviria-Mérida", presentó el Bachiller: **Laudín Casas Marquina**, titular de la Cédula de Identidad N° V012779298, para optar al título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó el Bachiller: **Laudín Casas Marquina**.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró APROBADO con la Calificación de CATORCE (14) PUNTOS.

Prof. María Eugenia Marquina
Tutora

Prof. Benito Briceño
Prof. Roberto Skwierinski

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Este trabajo recibió Financiamiento
de la Universidad de los Andes, a través
del Consejo de Desarrollo Científico,
Humanístico y Tecnológico (CDCH),
Proyecto: 1590-08-01-F**

Agradecimientos

A Dios todo poderoso y a la virgen María, por darme luz y permitirme alcanzar esta meta.

A mi hermosa Madre Angélica, por guiarme y aconsejarme durante toda mi vida, brindándome cariño, consuelo, amor, ternura y una mano amiga, mami te quiero.....

A mi esposa Mave y mis niños, May, Jesús y José, que son mi fuente de inspiración para triunfar.

A mis hermanos Milva, Jairo, Andrés y Alfonso por confiar siempre en mí

A mi Tutora Marucha por su confianza, al estar dispuesta siempre a guiarme y aconsejarme con paciencia para lograr culminar este trabajo, Gracias.....

A mi Cotutora Licia por estar siempre dispuesta a ayudarme y brindarme su amistad.

Al personal Técnico del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno por su colaboración en labores relacionadas con este trabajo.

A mis Jurados por sus orientaciones.

A la Sra. Sioly por su amistad brindada durante toda la carrera

A toda la comunidad de la facultad de ciencias y el departamento de biología.

Al Ing Porfirio por su valiosa amistad y sus buenos consejos.

A todos mis compañeros de estudio: Carolaing, Neyda, Ximena, Erick, Willians, Huascar, Víctor, Gloria, Ramón y todos los que se me escapan.....

A todos los amigos del Colectivo 86 por ser camaradas solidarios.

Al CDCH por el financiamiento recibido.

A la familia León Salinas por haber compartido conmigo y permitirme ser parte de ustedes.

A mis compañeros de trabajo Juan, Manuel, Raquel, Yaritza, Carlos y Maibori por su solidaridad en los momentos difíciles.

Al Grupo Andino de Rescate por su colaboración en la formación brindada y los momentos gratos compartidos.

Dedicatoria

Quiero dedicar este triunfo a Mave mi Esposa mujer valiosa con la cual he compartido parte de mi vida, a mis hijos que son lucecitas que brillan cada amanecer, son el norte de mi existencia y mi razón de ser. Mave te amo.

El trabajo se desarrolló en la Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno.



Obtención de aislados rizobiales de *Vicia faba* L. y determinación del tamaño poblacional de rizobios de parcelas agrícolas del Páramo de Gavidia Estado Mérida (Venezuela)

Casas M. Laudin.

Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, Departamento de Biología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

RESUMEN. La fijación biológica de nitrógeno representa una alternativa ecológica para la incorporación de este elemento en los diversos cultivos, pudiendo sustituir en menor o mayor grado la utilización de fertilizantes nitrogenados que son de alto costo ecológico y económico. Las bacterias fijadoras de nitrógeno están presentes en muy diversos ecosistemas, razón por la cual el presente trabajo propone como objetivo evaluar el tamaño de la población rizobial, la infectividad y efectividad de aislados rizobiales, obtenidos a partir de nódulos radicales y suelos agrícolas con antecedentes en cultivos de *Vicia faba* L. en el Páramo de Gavidia, estado Mérida. La metodología aplicada para determinar el tamaño poblacional de las bacterias rizobiales, se realizó a través del método del número más probable (NMP). Además se aislaron, purificaron y autenticaron las bacterias rizobiales tomando como hospedador la planta de *Vicia faba* L. Estos aislados rizobiales fueron caracterizados fenotípicamente, también se evaluó la infectividad y efectividad en condiciones de invernadero siguiendo los métodos señalado por varios manuales de rizobiología. Se logró seleccionar dos aislados rizobiales denominados LG1 y LG2, el primero creció entre 14°C y 30°C y toleró las concentraciones salinas comprendidas entre 0.1 y 2.5 % NaCl, y el segundo aislado soportó el mismo rango de temperatura que LG1, presentando una tolerancia nula a los medios salinos ensayados. El título de la poblacional rizobial en la parcela N°1 se registró en el orden de $2,65 \times 10^2 \pm 129,32$ células / g de suelo, y $1,3 \times 10^4 \pm 19238,50$ células / g de suelo para la parcela N° 2. Los nódulos de las plantas de *V. faba* fueron de color rosado indicativo de efectividad, solamente en las plantas inoculadas con LG1, y no encontrando nódulos en las plantas inoculadas con LG2.

Palabras claves: Páramo de Gavidia, *Vicia faba* L., rizobio, nodulación, fijación biológica nitrógeno.



Obtención de aislados rizobiales de *Vicia faba* L. y determinación del tamaño poblacional de rizobios de parcelas agrícolas del Páramo de Gavidia Estado Mérida (Venezuela).

Casas M. Laudin.

Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, Departamento de Biología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

Abstract. Biological nitrogen fixation represents an ecological alternative to the incorporation of this element in various crops, and can substitute a lesser or greater degree the use of nitrogen fertilizers that are of high ecological and economic cost. The nitrogen-fixing bacteria are present in very different ecosystems, which is why this paper proposes the objective of evaluating the rhizobial population size, infectivity and effectiveness of rhizobial isolates obtained from root nodules and agricultural soils with a background in crops of *Vicia faba* L. in the Paramo de Gavidia, Mérida State. The methodology used to determine the population size of rhizobial bacteria was performed using the method of NMP. In addition, isolated, purified and authenticated taking rhizobial bacteria as host plant *Vicia faba* L. These isolates were characterized phenotypically rhizobial also evaluated the infectivity and effectiveness in greenhouse conditions using the methods reported by several rhizobiology manuals. It was possible to select two rhizobial isolates called LG1 and LG2, the former grew between 14 ° C and 30 ° C and allowed the salt concentrations between 0.1 and 2.5% NaCl, and the second isolation bore the same temperature range LG1, showing zero tolerance to saline tested. The title of the rhizobial population in plot No. 1 was in the order of 10^2 cells per gram of soil, 10^3 and 10^4 cells per gram of soil for plot No. 2. The pink nodules of plants of *V. faba* were indicative of effectiveness, only in plants inoculated with LG1, and not finding nodules on plants inoculated with LG2.

Keywords: Paramo de Gavidia, *Vicia faba* L., rhizobia, nodulation, biological nitrogen fixation.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
1. Marco Teórico	9
1.1. Importancia de la fijación biológica de nitrógeno.....	9
1.2. Asociación simbiótica Rizobio- Leguminosa	10
1.3. Características generales del hospedador Vicia faba L.....	12
1.4. Reportes de Vicia faba L. y otras leguminosas en zona de Páramo.....	14
1.5. Ubicación geográfica y manejo agrícola en el Páramo de Gavidia	15
2.- Antecedentes	17
3. Justificación del proyecto y aplicabilidad de los resultados	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Sitio de estudio.....	22
2. Procedimiento de muestreo del suelo y nódulos	26
3. Captura de aislados rizobiales a partir de suelos.....	26
4. El aislamiento de las bacterias rizobiales.....	27
5. Determinación del tamaño de la población rizobial en los suelos a través del método del número más probable (NMP).....	28
6. Purificación de los aislados rizobiales	30
7. Autenticación de los rizobios.....	31



8. Caracterización fenotípica de los aislados rizobiales.....	32
8.1. Caracterización macromorfológica de las colonias de los aislados.	32
8.2. Tolerancia a la temperatura de los aislados rizobiales.	32
8.3. Tolerancia a la salinidad de los aislados rizobiales.....	33
9. Determinación de la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales.....	33
RESULTADOS	36
1. Análisis del suelo muestreado.....	36
2. Captura de rizobios a partir de las muestras de suelo de las parcelas en el Páramo de Gavidia	37
3. Obtención de los aislados rizobiales LG1 y LG2.....	38
4. Purificación de los aislados rizobiales seleccionados de las parcelas del Páramo de Gavidia	39
5. Autenticación de los aislados rizobiales.	41
6. Caracterización macromorfológica de los aislados rizobiales obtenidos en las parcelas del Páramo de Gavidia	41
7. Determinación de la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales.....	44
8. Determinación del tamaño de la población rizobial en los suelos a través del método número más probable (NMP).....	46
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Detalle de la flor de <i>Vicia faba</i> L.....	12
Figura 2. Mapa de ubicación del sitio de estudio, localización del Páramo de Gavidia, Municipio Rangel, Mérida-Venezuela.....	23
Figura 3. Panorámica de la parcela N° 1.....	24
Figura 4. Panorámica de la parcela N° 2.....	25
Figura 5. Esquema general de los métodos usados en el trabajo especial de grado.....	35
Figura 6. Aislado rizobial LG1.....	40
Figura 7. Aislado rizobial LG2	40
Figura 8. Crecimiento de los aislados rizobiales LG1 y LG2 a diferentes temperaturas	43
Figura 9. Gráfica de longitud del vástago y raíz en <i>Vicia faba</i> L.....	44
Figura 10. Gráfica de peso fresco del vástago y raíz de <i>Vicia faba</i> L....	45
Figura 11. Gráfica de peso seco del vástago y raíz de <i>Vicia faba</i> L.....	45



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados analíticos obtenidos de la muestra de suelo de La parcela N° 1.....	36
Tabla 2. Resultados analíticos obtenidos de la muestra de suelo de la parcela N° 2.....	37
Tabla 3. Número de nódulos, tamaño y ubicación, en plantas de <i>V. faba</i> L, obtenidos a partir de suelos de la parcela N° 1 y parcela N° 2.....	38
Tabla 4. Autenticación de los aislados rizobiales LG1 y LG2, en su propio hospedador <i>Vicia faba</i> L.....	41
Tabla 5. Características macromorfológicas de las colonias de los aislados rizobiales, provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida.....	42
Tabla 6. Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados rizobiales LG1 y LG2 provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida.	42
Tabla 7. Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad de los aislados rizobiales LG1 y LG2 provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida...	43
Tabla 8. Plantas de <i>Vicia faba</i> L. que nodularon al someterse a inóculos de distintas diluciones preparadas con suelo de la parcela N° 1, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.....	46
Tabla 9. Plantas de <i>Vicia faba</i> L. que nodularon al someterse a inóculos de distintas diluciones preparadas con suelo de la parcela N° 2 Páramo de Gavidia, estado Mérida.....	48
Tabla 10. Resumen del conteo a través del método del Número más Probable (NMP) de bacterias rizobiales para las parcelas estudiadas, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.....	49



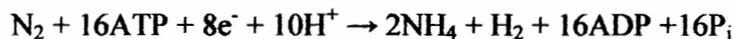
INTRODUCCIÓN

1. Marco Teórico

1.1. Importancia de la fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno (N₂) es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres principales reservorios: en la atmósfera, donde representa alrededor del 78 % del nitrógeno total, en el suelo y en la biomasa. Las complejas relaciones de intercambio entre estos tres reservorios se conocen como el ciclo del nitrógeno (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

La reducción del nitrógeno molecular (N₂) a amonio llevada a cabo por algunas bacterias y cianobacterias de vida libre o en simbiosis con algunas especies vegetales, se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Este proceso es altamente consumidor de energía y es catalizada por la enzima nitrogenasa según la siguiente ecuación:



La nitrogenasa, es un complejo enzimático formado por dos metaloproteínas, ferroproteína y molibdoferroproteína, está muy bien conservada en todos los microorganismos diazotróficos (González-López y Lluch, 1992).

Después del agua, se considera el nitrógeno como uno de los nutrientes que más influye en la producción agrícola mundial. La capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico, que se manifiesta de manera natural en algunos microorganismos de vida libre o simbióticos, puede ser aprovechada como una alternativa viable para suplir a la planta, directa o indirectamente, de significativas cantidades de nitrógeno, favoreciendo la producción de los cultivos (Urquiaga *et al.*, 1998).

En la agricultura a estos microorganismos diazotróficos se le ha encontrado aplicación como inoculantes, aprovechando su capacidad de asociarse simbióticamente con plantas cultivadas, siendo una de la más importante, las



leguminosas, tal es el caso de las altas producciones de soya a nivel mundial registradas por aplicación de inoculantes rizobiales (Lodeiro *et al.*, 2003). La posibilidad de extender este procedimiento a otras especies vegetales de interés agronómico, con la consiguiente eliminación parcial de la necesidad de usar fertilizantes nitrogenados, ha hecho de la FBN un tema de intensa investigación a lo largo de los años (Rosas y Correa, 2003).

1.2. Asociación simbiótica Rizobio- Leguminosa

Una de las asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno hasta ahora mejor estudiada ha sido la asociación Rizobio – Leguminosa (Hirsch, 1992). Las bacterias que forman parte integrante de esta asociación mutualística, denominadas comúnmente rizobios se caracterizan por ser Gram-negativas, tener forma de bacilo, con un flagelo polar o sub polar, algunas pueden presentar entre dos a seis flagelos peritricos, son aeróbicos obligados y poseen una alimentación quimio- organotrófica o quimiolitotrófica (Werner, 1992). La clasificación sistemática para estos microsimbiontes, propuesta en la segunda edición del Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey's (Madigan *et al.*, 2003) es:

Reino II: Bacteria

Phylum VII: Proteobacteria

Sección XV α - Proteobacteria

Clase I: Rhodospirilli

Orden Rhizobiales

Este orden incluye diferentes familias con varios géneros formadores de nódulos en la raíz o tallo y de agallas tumorales en algunas especies vegetales, citando los más conocidos:



Familia I:	Familia II	Familia VIII	Familia IX
Rhizobiaceae	Phyllobacteriaceae	Hyphomicrobiaceae	Bradyrhizobiaceae
Géneros	Géneros	Género	Género
<u>Agrobacterium</u>	<u>Mesorhizobium</u>	<u>Azorhizobum</u>	<u>Bradyrhizobium</u>
Conn.1942.	Jarvis <i>et al.</i> 1997	Dreyfus <i>et al.</i> 1988	Jordan 1982.
<u>Ensifer</u>	<u>Phyllobacterium</u>		
Casida. 1982.	Knosel		
<u>Rhizobium</u>			
Frank.1889.			
<u>Sinorhizobium</u>			
Chen <i>et al.</i> 1988			

Algunos autores incluyen además el género *Allorhizobium* Jordan dentro de la familia Rhizobiaceae (Wang *et al.*, 2001). Pero esta clasificación está sujeta a continuas modificaciones, a medida en que se avanza en los estudios sistemáticos.

Algunos géneros o cepas son de crecimiento rápido y otras crecen lentamente y también existen especies rizobiales con velocidad de crecimiento intermedio entre estos dos rangos (Marquina, 2006).

Los hospedadores de los microsimbiontes rizobiales que presentan mayor porcentaje de nodulación dentro de las leguminosas lo constituye la sub-familia *Papilionoideae* o *Fabacea* (97%) seguida por las *Mimosoideae* con el (90%) y por último la *Caesalpinoideae* (23%) (Werner, 1992). Las *Papilionoideae* son de gran importancia económica en las áreas templadas por su utilidad para el consumo humano y animal (Allen and Allen, 1981), por ejemplo la caraota (*Phaseolus* sp.L.), habas (*Vicia faba* L.), lenteja (*Lens culinaris* L.), arveja (*Pisum sativum* L.), soya (*Glycine max* L.) y el maní (*Arachis hypogea* L.), como plantas forrajeras (*Trifolium* L., *Medicago* L., *Melilotus* L.), para abono, control de erosión y como principal fuente de nitrógeno al ecosistema (Allen and Allen, 1981).



1.3. Características generales del hospedador *Vicia faba* L.

Vicia faba L se caracteriza por ser una planta herbácea, anual, de tallos erectos, Su descripción botánica corresponde a la siguiente: porte recto, robusto y erguido, con tallos fuertes, hojas compuestas, con 2-6 folíolos de forma oblonga, elíptica, usualmente de 5-6 cm. de largo y 1-2 cm. de ancho, carece del folíolo terminal el cual es remplazado por un zarcillo rudimentario. Flores subsésiles, con pétalos blancos manchados de azul o negro. Los frutos tipo vaina alargada de longitud variable, con pubescencia corta y consistencia carnosas, dentro de la que se ubican las semillas puestas en fila. Las semillas por lo general siempre aplanadas son de color verde claro, amarillento o pardo (Macbride, 1948) (Figura N°1).



Vicia faba., Autor: Daniel Feliciano ., Localización: Torres Novas (Portugal)

Figura 1. Detalle de la flor de *Vicia faba* L.



La clasificación según Cronquist (1981), da su nombre a la familia de las Fabaceae, de la cual es la especie tipo, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Tribu: Fabeae
Género: Vicia L.
Especie: V. faba

El origen exacto de esta planta no es muy conocido, pero según (Cole, 1970) en Cubero, (1974), se presume que fue cultivada en los comienzos del Neolítico Temprano, siendo lógico suponer que fue en el cercano Oriente donde se inició como especie cultivada y luego se esparció a través del mundo habitado, no significando que la planta fuese desconocida en otras regiones especialmente en los países del mediterráneos. Según estudios filológicos, existen tres raíces diferentes (griego, árabe y hebreo) en una región relativamente pequeña y es posible deducir que la planta fue conocida por pueblos diferentes.

En nuestros Andes venezolanos se siembra escasamente para el consumo local, pero merece ciertamente más atención (Pittier, 1944).



1.4. Reportes de *Vicia faba* L. y otras leguminosas en zona de Páramo.

La presencia de leguminosas en las zonas de páramo es relativamente escasa (Marquina, *et al* 2001-2002). *Lupinus* L. fue informado por Vareschi (1970) y Monasterio, (1980). Muñoz (1984) además de informar sobre la presencia en el Municipio Sucre (Estado- Mérida) indica la existencia de nódulos en el sistema radical. Briceño *et al.*, (1999-2000) estudiaron la anatomía de *Lupinus meridanus* Moritz C.P.Sm y *Lupinus eromonomus* C.P.Sm. que crecen a lo largo de un gradiente altitudinal. Sayago (1985), informo sobre la presencia de *V. faba* con nódulos en el sistema radical para plantas colectadas en el Páramo de los Conejos, Municipio Campo Elías-Mérida, esta especie también señalada para el Páramo de Gavidia por (Aranguren, 1997).

Briceño y Morillo, (2002), encontraron para la familia Fabaceae 7 géneros autóctonos, en el caso de *Lupinus* L. representado por 17 especies y *Vicia* L., con la especie *Vicia andicola* Kunth, también señalan la presencia de los géneros *Cologania* Kunth, *Lathirus* L., *Phaseolus* L., *Teramnus* P. Browne y *Vigna* Savi, todos estos con una sola especie, por lo tanto la variedad de leguminosas para este ecosistema es baja.

Vicia faba L, es una de las leguminosas que establece simbiosis con bacterias rizobiales formadoras de nódulos radicales (Allen y Allen, 1981), la cual ha sido introducida y cultivada en el Páramo de Gavidia. Es objeto de estudio por ser una planta utilizada por algunos lugareños o agricultores en el mejoramiento de los niveles nitrogenados de los suelos cultivables, además de emplearse como abono verde y cultivo trampa contra el díptero *Liriomiza* sp. que ataca a los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.). También es empleada en la gastronomía, ya que sus granos son incluidos en menor medida en la dieta alimenticia bajo la forma de sopa, como habas tostadas, en la preparación del buche de 7 granos que le agregan licor o bien el fororo de 7 granos que no contiene licor, y actualmente se ha planteado la posibilidad de ser empleada como una alternativa en la recuperación de suelos degradados (comunicación personal con pobladores de la zona).



1.5. Ubicación geográfica y manejo agrícola en el Páramo de Gavidia

El Páramo de Gavidia dentro del Parque Nacional Sierra Nevada se ubica, cerca de la población de Mucuchíes en el Municipio Rangel del estado Mérida, en un rango altitudinal entre los 3000-3600 msnm, (Sarmiento y Monasterio, 1993), el cual está considerado un ecosistema o agroecosistema frágil y complicado, por encontrarse en un ambiente de alta montaña tropical y presentar características ambientales de bajas temperaturas, oscilaciones térmicas entre el día y la noche y bajas tasas de descomposición, además existe una dinámica cultural dada por la presencia de los pobladores de la zona (Aranguren, 1997).

Actualmente cuando se habla de agroecosistema, se incluye el uso agrícola y pecuario, surgiendo la preocupación por el desarrollo sostenible y por el deterioro de los sistemas naturales particularmente en áreas frágiles (Aranguren, 1997)

La agricultura de la zona se dedica principalmente al cultivo de papa en parcelas que posteriormente se dejan en descanso durante 5 a más de 10 años. El cultivo de papa se realiza utilizando grandes dosis promedio de fertilizantes mineral (NPK) de 1,8 t / ha (Sarmiento, 1995), pero algunos cultivadores aplican abonos orgánicos, sin recurrir a las altas dosis de fertilizantes químicos, siendo difícil definir un procedimiento general en la zona, coexistiendo una forma tradicional de manejo agrícola de bajo impacto ecológico y otra forma altamente tecnificada con gran demandad de insumos (Sarmiento y Monasterio, 1993).

Los agricultores o productores de Gavidia también realizan un sistema agrícola de descansos largos, después de dos o tres cultivos consecutivos de un mismo rubro, por lo general, el cultivo comercial de papa (*Solanum tuberosum* L.). El descanso se aplica como una consecuencia de la disminución por debajo de un nivel crítico de los nutrientes disponibles para las plantas cultivadas. Es al parecer una práctica condicionada por la pobreza en nutrientes que presentan muchos suelos tropicales, se realiza con la finalidad de restituir la fertilidad del suelo a través de la recuperación de la vegetación natural (Sarmiento y Monasterio, 1993).



También en la zona de estudio podemos encontrar parcelas bajo un manejo agronómico muy particular para el cultivo de papa, conocidas con el nombre indígena de tinopó, el cual consiste en una estrategia de almacenamiento y conservación de papas en el terreno, generalmente en una parcela pequeña aislada del centro del cultivo más intensivo y rodeada de vegetación natural. La parcela cultivada se cosecha parcialmente y los tubérculos que quedan en el terreno se van cosechando posteriormente, en distintos momentos, según la necesidad. En estas circunstancias, el tinopó es el sistema ideal para los cruces o introgresiones del germoplasma silvestre en el cultivo (Romero y Monasterio, 2005). A su vez el tinopó cumple la función de reservorio de germoplasma de semillas de este rubro y de otros, tales como el cultivo de habas (Monasterio *et al.*, 2003). Estas parcelas no ameritan sembrarlas nuevamente después de la última cosecha, ya que los tubérculos de papa que no fueron extraídos sirven como semilla, esto implica una distribución de las plantas muy irregular y densidad muy variable (Sarmiento y Monasterio, 1993), donde también se incluye temporalmente cultivos en menor escala de algunas especies tales como: avena (*Avena sativa* L.) habas (*V. faba*) y cebada (*Hordeum vulgare* L.). Posteriores manejos de estas parcelas, implican la incorporación de los restos de material vegetal como abono verde mediante el sistema de labranza y la aplicación de abonos orgánicos (compost), como preparativos para iniciar otro periodo de actividad productiva.

La introducción de leguminosas en diversos terrenos permite la proliferación de bacterias rizobiales (Méndez-Natera 2002). El cultivo de la leguminosa *V. faba* posibilita la presencia de rizobios en estos suelos parameros y la resiembra de la misma especie en ellos puede ocasionar un incremento de la población de estos microorganismos.

El siguiente trabajo pretende estudiar algunos aspectos de la asociación simbiótica establecida entre las bacterias rizobiales y la leguminosa *V. faba*, presentes en las áreas seleccionadas del Páramo de Gavidia, con el fin de determinar el tamaño de la población rizobial en estos suelos, aislar rizobios específicos de *Vicia faba* L. (haba) a partir de suelos o nódulos radicales y determinar sobre el mismo



huésped el grado de infectividad (nodulación) y eficiencia de los aislados a través de la cuantificación del crecimiento de la planta y contenido de nitrógeno total de la parte aérea del vegetal.

2.- Antecedentes

El género *Vicia* L. y su estudio nodular han sido ampliamente utilizados. Los primeros registros de nódulos en *Vicia* datan de 1542 por Leonhard Fuchsius L. en “*De Historia Stirpium Commentarii Insignes*” sin hacer referencia alguna al proceso de crecimiento y formación nodular. Malpighi`s, en *Anatome Plantarum*, publicado en 1679, representó a través de dibujos un sistema radical nodulado, el autor propuso que las protuberancias eran causadas por gusanos o larvas de insectos. Eriksson, (1874), publicó un estudio de nódulos en *V. faba*. Ward (1887) evidenció que la formación de nódulos era resultado de un proceso infeccioso. En 1887 Beijerinck confirmó las observaciones de Eriksson dibujando en su libreta de notas la presencia de bacteroides en células de nódulos. Seis meses mas tarde Beijerinck anunció el modelo infectivo formador de nódulos y propuso la denominación *Bacillus radicolica* para el microorganismo formador del nódulo. Beijerinck continuó con sus trabajos y describió características morfológicas que sirvieron para la clasificación taxonómica de estos microorganismos. La génesis del concepto de inoculación cruzada nace con Nobbe *et al.* , 1895, pruebas que realizaron con *V. faba*, *Vicia sativa* y *Pisum sativum*. En 1937 Mothes y Pietz describen un pigmento rojo que se encuentra en los nódulos producidos en *V. faba*, conocido posteriormente como leghemoglobina (Allen y Allen, 1981).

Crozat *et al.* (1982) encontraron que cepas de *Bradyrhizobium japonicum* Jordan. introducidas en suelos franceses con leguminosas logaron sobrevivir en cantidades de 10^4 bacterias / g suelo después de 5 años.

Méndez-Natera (2002), reportó que suelos de sabanas que han sido cultivados previamente con otras leguminosas ó suelos que no han sido cultivados poblados de



leguminosas nativas típicas, pueden contener cantidades apreciables de rizobios que nodulan con leguminosas.

Santana (2007) presentó resultados del número más probable de *Rhizobium* en suelo (NMP) para terrenos cultivados con café bajo sombra de árboles de distintas especies de leguminosas en Puerto Rico, encontrando poblaciones rizobiales en el orden de $1,16 \times 10^3$ células por 100 gramos y $6,2 \times 10^2$ células por 100 gramos.

Rodríguez *et al* (1994), informaron para plantas de *Vicia faba* L. una nodulación del 4% al ser inoculadas semillas con la cepa *Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae* CP 108 st 150 con una población aproximada de 3.2×10^7 bacterias/semilla.

Marquina (2006), caracterizó fenotípicamente y genotípicamente 12 aislados provenientes de diversas regiones geográficas de Venezuela, conservados en el Laboratorio de fijación Biológica de Nitrógeno de la Facultad de Ciencias de la universidad de los Andes (Mérida–Venezuela) mostrando una población heterogénea, pertenecientes a diversas especies rizobiales.

3. Justificación del proyecto y aplicabilidad de los resultados

La fijación biológica de nitrógeno contribuye a disminuir la necesidad de aplicación de fertilizantes químicos altamente contaminantes. Representa una alternativa más económica, de bajo impacto ecológico, permitiendo mantener la estructura de los suelos, como también el contenido de materia orgánica (Lodeiro *et al.*, 2003).

En la zona de estudio el conocimiento con respecto a las asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno (rizobio-leguminosa) que pueden mejorar las condiciones tanto del suelo como la de los cultivos es muy escaso, no se ha informado hasta los momentos la realización de trabajos relacionados con esta línea de investigación, además la gran mayoría de los pobladores de la zona que cultivan en el sector no



manejan la información alternativa concerniente a los procedimientos biotecnológicos, relacionados principalmente al uso de biofertilizantes, significando que para la incorporación de nitrógeno en el suelo utilizan la fertilización orgánica ó química nitrogenada altamente contaminante.

Actualmente en el país se desarrollan nuevas propuestas con el objetivo de revertir los daños ecológicos existentes y así desarrollar innovaciones tecnológicas para los sistemas productivos agrícolas, buscando promover un nuevo modelo de gestión de uso, manejo eficiente y sostenible de los recursos. Esta propuesta busca implementar procesos tecnológicos de producción de biorremediadores, biocontroladores y biofertilizantes, (MPP Agricultura y Tierras, 2008), razón por la cual cabe destacar la importancia del estudio de la fijación biológica de nitrógeno, dado que es un proceso que ocurre de manera natural en la biosfera, con posibilidades de potenciarla en los diversos ecosistemas.

Enmarcado en el contexto nacional y debido a la necesidad de implementar nuevas tecnologías, es importante desarrollar como trabajo preliminar, la evaluación y selección a nivel de invernadero de cepas de rizobios promisorias en cuanto a su capacidad fijadora de nitrógeno, que puedan utilizarse posteriormente como inoculantes. Por lo tanto el presente trabajo pretende estudiar algunos aspectos fundamentales de la asociación simbiótica de rizobio con la leguminosa *V. faba*, además de cuantificar el tamaño poblacional de las bacterias rizobiales que se encuentran en el suelo y nodulan con este hospedador, así como purificar, autenticar y caracterizar los aislados obtenidos, con el objeto de ser estudiados y ensayados en futuros proyectos en el área de la rizobiología.

4. Hipótesis



- La ausencia temporal de la leguminosa *Vicia faba* L. en parcelas agrícolas con rotación de cultivos, puede originar la disminución de las poblaciones de bacterias rizobiales presentes en los suelos.
- Los aislados rizobiales obtenidos a partir de muestras de suelos agrícolas en el Páramo de Gavidia pueden variar en cuanto a infectividad y efectividad en el huésped *Vicia faba* L.

Para comprobar estas hipótesis se plantea alcanzar los objetivos siguientes.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el tamaño de la población rizobial, la infectividad y efectividad de aislados rizobiales, obtenidos a partir de nódulos radicales y suelos agrícolas cultivados con *Vicia faba* L. en el Páramo de Gavidia.

5.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar bacterias rizobiales a partir de nódulos y suelos de las parcelas seleccionadas.
- Autenticar y reaislar bacterias rizobiales a partir de nódulos radicales



- Determinar el tamaño de la población rizobial de los suelos de las parcelas seleccionadas
- Determinar la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales, a través de la cuantificación del crecimiento de la planta y contenido de nitrógeno total de la parte aérea de la planta.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitio de estudio

Se seleccionaron dos áreas localizadas en el Páramo de Gavidia al noreste de la Sierra Nevada de Mérida, dentro del Parque Nacional Sierra Nevada (8° 40' N y 70° 54' W) a una altura aproximada entre 3000 y 3600 msnm, en el Municipio Rangel del estado Mérida, Venezuela (Figura 2).

El Páramo de Gavidia registra precipitaciones aproximadas de 1300 mm distribuidas en forma bimodal, con una época seca entre noviembre y marzo. La temperatura promedio es de 8,4° C. Según (Montilla *et al.*, 2002) tomado de Proyecto Páramo Andino, los suelos son de tipo inceptisol poco profundos. La vegetación natural de la zona es un rosetal- arbustal característico de formación “Páramo Andino” (Monasterio, 1980), con predominio de *Espeletia schultzi* Wedd e *Hipericum* Juss.



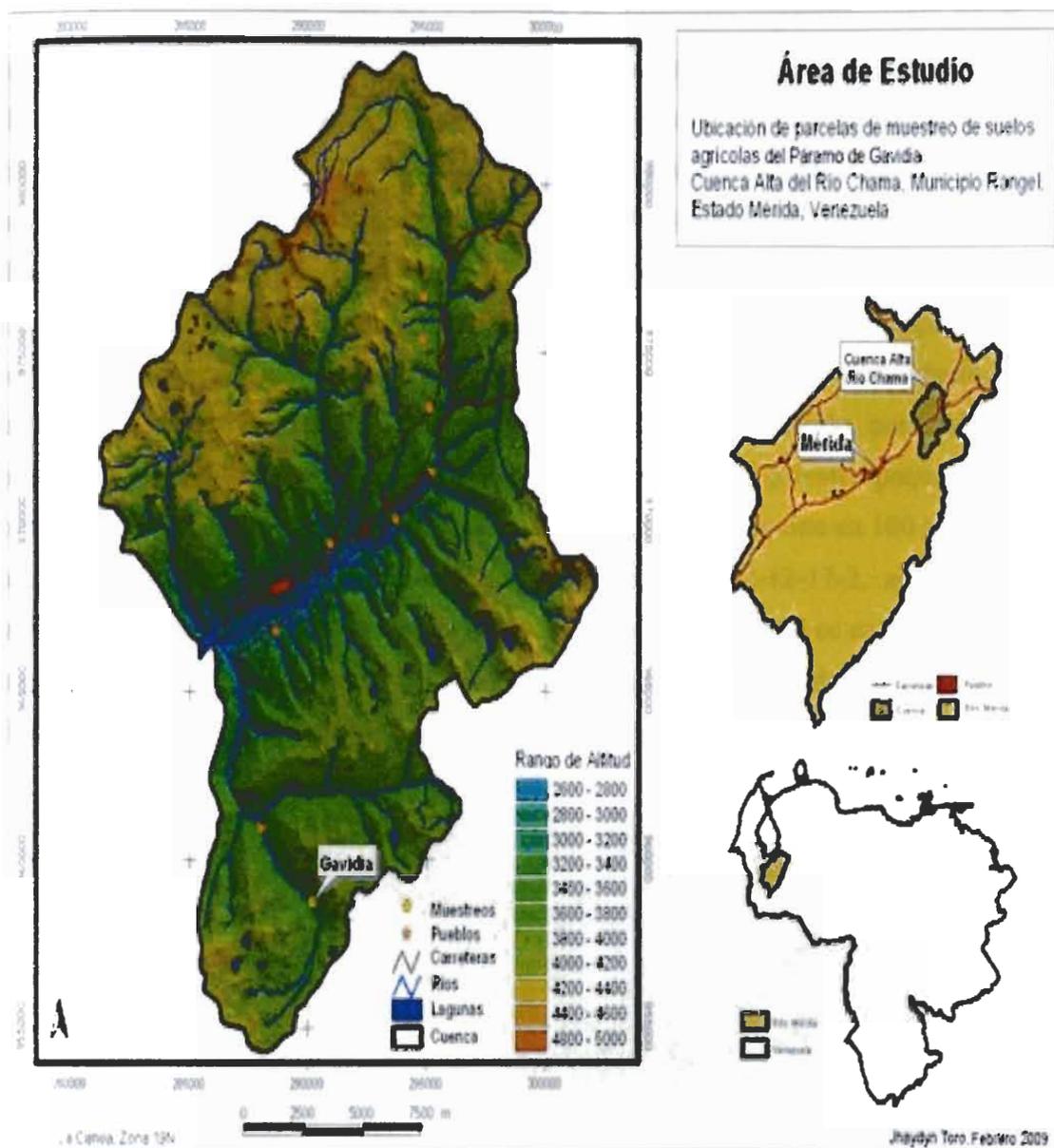


Figura 2. Mapa de ubicación del sitio de estudio, localización del Páramo de Gavidia, Municipio Rangel, Mérida- Venezuela.

Fuente: Lic. Jhaydyn Toro (2009)



Las características específicas para las dos parcelas seleccionadas son las siguientes:

La parcela denominada N° 1 (tinopó) se encuentra específicamente en el sector los Yaques en el Páramo de Gavidia, con una extensión de aproximadamente de 300 m² y una altitud de 3438 msnm. La parcela para el momento del estudio presentaba una plantación de papa de la variedad **Guadalupe** con una altura de aproximadamente de 22,8 cm. promedio para cada planta, aproximadamente a los 15 días de haber sido sembradas. Según información suministrada por el dueño Sr. Bernabet Torres, el cultivo que precedió fue de *V. faba* (haba), esta especie de leguminosa tenía 8 meses de ausencia en esta parcela ya que se había cosechado en el mes de marzo de 2008. Según Enmanuel Páez (comunicación personal) la aplicación de fertilizantes, fungicidas e insecticidas es la siguiente: paquete del hongo benéfico *Trichoderma* de 200-250 g. 2 litros de humus líquido en 100 litros de agua, 10 Kg. de urea y 25Kg. de fertilizante fórmula 12-12-17-2, además de aplicación de Insecticida-Benzamidas Match en proporciones de 50 cc en 60 litros de agua, fungicida Dithane el cual combate patologías en el cultivo de papa como el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) administrando dosis de 3,5 l/ha cada 7 días.



Figura 3. Panorámica de la parcela N° 1, Páramo de Gavidia, estado Mérida.



La parcela N° 2 se encuentra en la carretera de acceso al Páramo de Gavidia a una altura aproximada de 3200 msnm y una extensión aproximada de 400 m², específicamente en la finca del Sr. Jobino Lobo. Según información suministrada por el propietario, en ésta se practican un sistema de rotación de cultivos (habas, papa o zanahoria), presentando para el momento en que se tomó las muestras de suelo, una plantación de papa y el cultivo que lo precedió fue de habas. Justamente, la recolecta de las muestras de suelo se efectuó una semana después de haber cosechado las habas. Sin embargo se mantuvieron en el terreno algunas plantas de *Vicia faba* L. seleccionando la mas vigorosa con el mayor numero de nódulos de color rojizo, para obtener de allí los aislados rizobiales. A esta parcela se le aplicó un sistema de fertilización que comprende un paquete compuesto por gallinazo y fertilización química de fórmula 12-12-17-2, insecticida de tipo Furadan el cual combate la polilla de la papa (*Phthorimaea operculella*) y herbicidas variados. La parcela tiene un uso continuo y el descanso para ella es bajo.



Figura 4. Panorámica de la parcela N° 2, Páramo de Gavidia, estado Mérida.



2. Procedimiento de muestreo del suelo y nódulos

Se seleccionaron 5 puntos al azar en cada una de las parcelas para obtener una muestra de suelo compuesta, colectando entre los 0 y 15 cm de profundidad, retirando previamente el material vegetal superficial, mezclando luego las submuestras hasta obtener una muestra de 2 Kg aproximadamente cada una, almacenándolas en la nevera a 4° C, hasta el día siguiente que fueron procesadas.

De cada una de las muestras se tomó una fracción de aproximadamente de 1 Kg para realizar en el laboratorio de suelos del Instituto de Geografía y Conservación de los Recursos Naturales de la Universidad de Los Andes, el estudio analítico del suelo, considerando la granulometría, el pH, bases intercambiables, materia orgánica, porcentaje de nitrógeno, relación C/N y fósforo.

Los nódulos radicales que se colectaron en el sitio de muestreo solamente se obtuvieron en la parcela N° 2, de las raíces de *V. faba*, seleccionando una de las plantas con mayor cantidad de nódulos de coloración rojiza, conservándola en bolsas plásticas, almacenándola en la nevera a 4° C, hasta que se procedió al aislamiento de las bacterias rizobiales.

La realización de los experimentos se llevó a cabo en el Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.

3. Captura de aislados rizobiales a partir de suelos

Se procedió a capturar los rizobios a partir de ambas muestras de suelos empleando *V. faba* como cultivo trampa, para este fin se estandarizó el procedimiento para esterilizar superficialmente las semillas de *V. faba* siguiendo los siguientes pasos:

Protocolo N°1. Lavado y esterilización de semillas



Se lavaron las semillas con solución jabonosa, agitando frecuentemente durante 30 minutos, eliminando el jabón e imbiendo en agua de chorro por 30 min. Luego se esterilizó superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% por 15 min, efectuando lavados abundantes mas o menos 8 con agua destilada estéril. Las semillas permanecieron en agua destilada estéril y agitación toda la noche, después se eliminó el exceso de agua con papel absorbente estéril y se sembraron en suelo provenientes de las parcelas o bien en medio agarizado TY Berinnger, 1974 citado en Vincet (1975) para su germinación y posterior trasplante, para los ensayos posteriores.

Una vez desinfectadas las semillas fueron sembradas en el suelo fresco colectado en campo, contenido en 5 recipientes de 12 cm de diámetro y 13 cm de profundidad, colocando en cada uno 3 semillas de *V. faba* esterilizadas superficialmente (Skwierinski y Marquina, 2006).

Luego de 65 días, se procedió a cuantificar el número y tamaño de nódulos para cada planta, además de la ubicación de los mismos en el sistema radical, posteriormente se calculó el promedio y error estándar y mediante una prueba T se comparó el número y tamaño de los nódulos entre parcelas.

4. El aislamiento de las bacterias rizobiales

Los nódulos fueron lavados en agua corriente y luego agua destilada, para eliminar la tierra y restos de otros materiales del suelo. Durante este tiempo los nódulos se hidrataron hasta alcanzar la turgencia. Inmediatamente se separaron los nódulos con una pequeña porción de raíz para mantener intacta la estructura nodular. Se colocaron los nódulos lavados e hidratados en tubos de ensayo de 10 ml estériles con agua destilada también estéril (un nódulo por tubo). Luego se transfirió cada nódulo a otro tubo con etanol 95% durante 1 minuto y posteriormente a una solución con hipoclorito de sodio al 1,5 % durante 3-4 minutos, se lavaron 5-6 veces con agua destilada estéril, y se dejó un pequeño volumen de agua remanente (100- 200 μ l).



Después se maceró el nódulo, hasta que la suspensión se observó blanquecina o lechosa. Sembrando por el método de agotamiento en cajas de Petri con medio YMA modificado (YMA_{mrc}), (manitol 2,5 g/L, sacarosa 7,5 g/L) con rojo congo (25 µg/ml) original de Vincent (1975), efectuando cultivos sucesivos (Skwierinski y Marquina, 2006).

5. Determinación del tamaño de la población rizobial en los suelos a través del método del número más probable (NMP)

La infección y formación de nódulos en la raíz de una leguminosa es el criterio más confiable para diferenciar los rizobios de otros microorganismos. Cuando se requiere hacer un recuento de los rizobios presentes en una muestra de suelo, es necesario contar estas bacterias indirectamente por los nódulos formados en plantas estériles de una leguminosa (CIAT, 1988). Para esta investigación se utilizó el conteo a través del método del número más probable utilizado por Zapata *et al* (2003), método que permite interpretar los resultados en una distribución de tipo Poisson, empleando datos tabulados preparados de acuerdo con la presencia o no de nódulos en plantas indicadoras, utilizando en este caso la leguminosa *V. faba*, estas plantas se mantuvieron en ambiente de invernadero en condiciones estériles siguiendo el protocolo N° 2 para la preparación de la arena estéril.

La arena fue tamizada con la finalidad de separar y desechar un primer material de tamaño mayor a 0,5 cm. Pasando de nuevo la fracción seleccionada por otro tamiz de tamaño de 2 mm para separar las partículas tipo limo, quedando seleccionado un material intermedio el cual sirvió de sustrato para hacer crecer las plantas de *V. faba*. La arena fue lavada con agua de chorro por 3 o 4 horas manteniendo el flujo continuo y agitando vigorosamente cada 15 minutos. Luego se agregó hipoclorito de sodio al 3% y se dejó por un periodo de tiempo de 3 o 4 horas, agitando vigorosamente cada 15 minutos. Posteriormente se efectuaron sucesivos



lavados con agua de chorro hasta observar el agua limpia y libre de materiales en suspensión. Después se eliminó el agua y se secó en estufa durante 24 h a 120° C.

Los recipientes plásticos utilizados cuyas dimensiones eran de 10 cm de diámetro y 16 cm de profundidad fueron rellenos de arena y esterilizados en tres ocasiones en días consecutivos, bajo condiciones de 1 atmósfera de presión durante 1 hora de tiempo y 120° C, utilizando autoclave vertical marca Phoenix modelo AV plus Lufenco.

La preparación de las plantas de *V. faba* que fueron transplantadas a los recipientes estériles se prepararon como se señala en la sección 3, donde se describe el procedimiento de esterilización de semillas y germinación en medio agarizado TY.

Luego para el conteo, se preparó una serie de 6 diluciones 1/10 de cada una de las muestras de suelo, estas diluciones se prepararon con agua corriente de chorro, para inocular 108 plantas de *V. faba*.

A la primera dilución preparada se le denominó 10², la cual se obtuvo a partir de mezclar homogéneamente con un magneto en una plancha de agitación por un tiempo aproximado de 5 minutos, 10 g de suelo y 90 ml de agua, tomando 10 ml de esta solución y mezclándolo con 90 ml de agua corriente se procedió a preparar la segunda dilución llamada 10³ y así se continuó hasta obtener seis diluciones seriadas. Con cada una de estas diluciones, se inocularon las plantas de *V. faba*, 12 recipientes por cada réplica en el caso de la parcela N° 1, el ensayo se preparó por triplicado, obteniendo un total de 36 recipientes y para la parcela N° 2 se preparó de igual forma, esta vez aumentando el número de plantas a 4, obteniendo un número total de plantas para la parcela N° 2 de 72 plantas. Se inocularon con 5 ml de la suspensión de suelo cada planta de *V. faba*, en nuestro caso son 108 recipientes en total. Después de 56 días se evaluó la nodulación (presencia o ausencia de nódulos en la raíz de cada planta), y se utilizó la tabla de Fisher y Yates (1963), para calcular el NMP de rizobios por gramo de suelo (CIAT, 1988), aplicando la siguiente fórmula:

$$NMP = \frac{m * d}{v * n}$$



Donde: m = Número probable (por ml) en la mínima dilución de las series considerada (10^2).

d = Valor de la primera dilución considerada.

v = Volumen inoculado (5ml)

n = Peso del suelo inoculante (10 g).

Se calculó el promedio de bacterias rizobiales y error estándar para cada una de las parcelas.

6. Purificación de los aislados rizobiales

Los rizobios se aislaron en medio YMAmrc, sembrando nuevamente por agotamiento. Repitiendo el proceso anterior hasta tener la certeza de que las colonias aisladas provenientes de una sola bacteria estaban libres de contaminantes. Para ello se tomó una colonia y se diluyó en agua destilada estéril (500 μ l), sembrando por agotamiento en el mismo medio de cultivo YMAmrc, hasta lograr obtener las bacterias aisladas. En este trabajo se realizó el seguimiento de dos aislados rizobiales uno para cada parcela, denominado LG1 de la parcela N° 1 y LG2 de la parcela N° 2. Con la finalidad de verificar pureza se utilizó la prueba de crecimiento en un medio de cultivo agarizado con glucosa – peptona y púrpura de bromocresol (GPA), el cual se basa fundamentalmente en un cambio de coloración del medio agarizado y en el crecimiento de las colonias, cuando el aislado rizobial ya se encuentra puro el crecimiento es escaso y el medio no cambia de color (Ferrera *et al.*, 1993).

Para la conservación de los aislados rizobiales seleccionados se sembraron en tubos estériles con medio YMAmrc en cuñas y en tacos almacenándolos a 4° C (Vincent, 1975).



7. Autenticación de los rizobios

Una vez obtenidos los rizobios, se procedió a autenticar los mismos, inoculando plantas de *V. faba*, para la autenticación de los aislados seleccionados, se realizó un ensayo, en envases de plástico de 10 cm de diámetro y 16 cm de profundidad que contenían arena lavada completamente estéril y libre de microorganismos según protocolo N° 2, donde se sembraron semillas de *V. faba* esterilizadas superficialmente según procedimiento señalado en la sección (3). Las plantas de *V. faba* (3) obtenidas bajo condiciones estériles se inocularon con cada uno de los aislados, para verificar la nodulación, manteniendo 3 plantas sin inocular las cuales sirvieron de control.

Cada planta fue inoculada con 5 ml de suspensión bacteriana preparada a partir de un cultivo denso de bacterias aproximadamente 10^8 células / ml (inóculo), la preparación del inóculo se realizó sembrando una alícuota de 300 μ l, de la suspensión en tubos de ensayo con 5 ml de medio YM, o 1 ml en fioles de 125 ml con 25ml del mismo medio, esterilizados previamente a 121° C y 1 atm de presión por 20 minutos, permitiendo luego el crecimiento a 30° C en agitación continua (180 rpm) durante 2-4 días, de este preinóculo se tomó 5 μ l de cada uno de los aislados (LG1 y LG2) y se sembró en medio YM permitiendo el crecimiento durante 5 días, para posteriormente tomar de éste 5 ml e inocular las plantas de *V. faba* para la autenticación. (Skwierinski y Marquina, 2006).

Las plantas fueron crecidas en el invernadero bajo condiciones de luz natural y temperatura promedio de 30° C, luego de la inoculación se observó su infectividad a los 45 días aproximadamente, y se procedió al reaislamiento de las bacterias rizobiales a partir de nódulos radicales (Skwierinski y Marquina, 2006).

Las plantas fueron regadas inicialmente con solución Hoagland $\frac{1}{4}$ con la finalidad de garantizar los nutrientes mínimos necesarios para el buen desarrollo de planta y no suministrar demasiados nutrientes que pudieran inhibir la nodulación. El programa de riego se realizó día por medio, el cual consistió en aplicar \pm 100 ml de agua estéril a cada planta.



La pureza de dichos cultivos fue verificada mediante siembra por agotamiento en medio agarizado YMAmrc y medio glucosa- peptona, más púrpura de bromocresol (100µg/ml) (GPA) (Ferrera *et al.*, 1993).

8. Caracterización fenotípica de los aislados rizobiales

8.1. Caracterización macromorfológica de las colonias de los aislados.

Además de su capacidad para formar nódulos con las leguminosas, que sigue siendo el criterio más confiable para una cepa, ésta puede ser reconocida como tal por una peculiar combinación de un número de caracteres. En general las características que se registraron fueron: elevación de la colonia, borde, color, aspecto, forma, textura y tiempo de aparición de la colonia (Marquina, 2006).

8.2. Tolerancia a la temperatura de los aislados rizobiales.

Se determinó la tolerancia de los aislados a las temperaturas de 4° C, 14° C, 22° C y 30° C. Este ensayo se realizó por triplicado, partiendo de un cultivo o preinóculo.

Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo denso de bacterias aproximadamente 10^8 células / ml (preinóculo), sembrando una alícuota de 300 µl, de la misma suspensión en tubos de ensayo con 5 ml de medio YM, o 1 ml en fiolas de 125 ml con 25 ml del mismo medio, esterilizados previamente a 120° C y 1 atm de presión por 20 minutos, permitiendo luego el crecimiento a 30° C en agitación continua (180 rpm) durante 2-4 días. Luego se tomó una muestra de cada uno de los aislados y se sembró por agotamiento en medio YMAmrc, permitiendo el crecimiento durante de 5 días. (Marquina, 2006).



8.3. Tolerancia a la salinidad de los aislados rizobiales.

Con la finalidad de establecer la tolerancia de los aislados a distintas concentraciones de salinidad se consideró un rango que abarca las siguientes concentraciones 0.1, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 % (Wang *et al*, 1998). Este ensayo se efectuó por triplicado para cada concentración de salinidad, partiendo de un cultivo o preinoculo, preparado como se indicó en la sección 8.2 (Marquina, 2006).

9. Determinación de la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales.

La infectividad se determinó, evaluando la nodulación de las plantas ensayadas en el invernadero, donde se considera la coloración, el tamaño nodular, abundancia y distribución. Con la finalidad de determinar la eficiencia de los aislados rizobiales, se cuantificó el crecimiento de la planta y el contenido de nitrógeno total de la parte aérea (CIAT 1988).

Los parámetros evaluados en el crecimiento de la planta corresponden a la longitud de vástago y raíz, peso fresco de vástago y raíz y peso seco de vástago y raíz.

Los tratamientos que se aplicarán en el ensayo serán los siguientes:

- A) Plantas inoculadas con LG1
- B) Plantas inoculadas con LG2
- C) Control sin inoculación (riego con H₂O y Hoagland ¼)
- D) Fertilización nitrogenada (Hoagland completo)

Las plantas de *V. faba* inoculadas fueron obtenidas siguiendo la metodología empleada en la sección N° 3 para la esterilización de las semillas y se sembraron en medio TY (Beringer, 1974), y la sección N° 7 para la esterilización y preparado de los recipientes rellenos de arena. Las plantas fueron crecidas en el invernadero bajo condiciones de luz ambiental y temperatura promedio de 37° C con una distribución espacial en bloques aleatorios, el riego aplicado se realizó día por medio y cada



semana se fertilizaban los tratamientos C y D con solución Hoagland (1/4). Todos los tratamientos inicialmente fueron regados con Hoagland $\frac{1}{4}$ con la finalidad de garantizar los nutrientes necesarios para el buen desarrollo de las plantas, el N contenido en la solución fertilizante (1/4) es el mínimo necesario requerido por la planta, evitando la dosificación del N en exceso, para no inhibir la nodulación, la preparación del Hoagland se realizó de acuerdo a lo considerado en el anexo N°1 (Medios de cultivo).

El siguiente esquema (figura 5) muestra la metodología general usada en el desarrollo del trabajo, incluye la parte de campo y la de laboratorio además indica cada uno de los objetivos específicos trazados y el orden secuencial utilizado para la obtención de resultados.



Esquema General del Trabajo

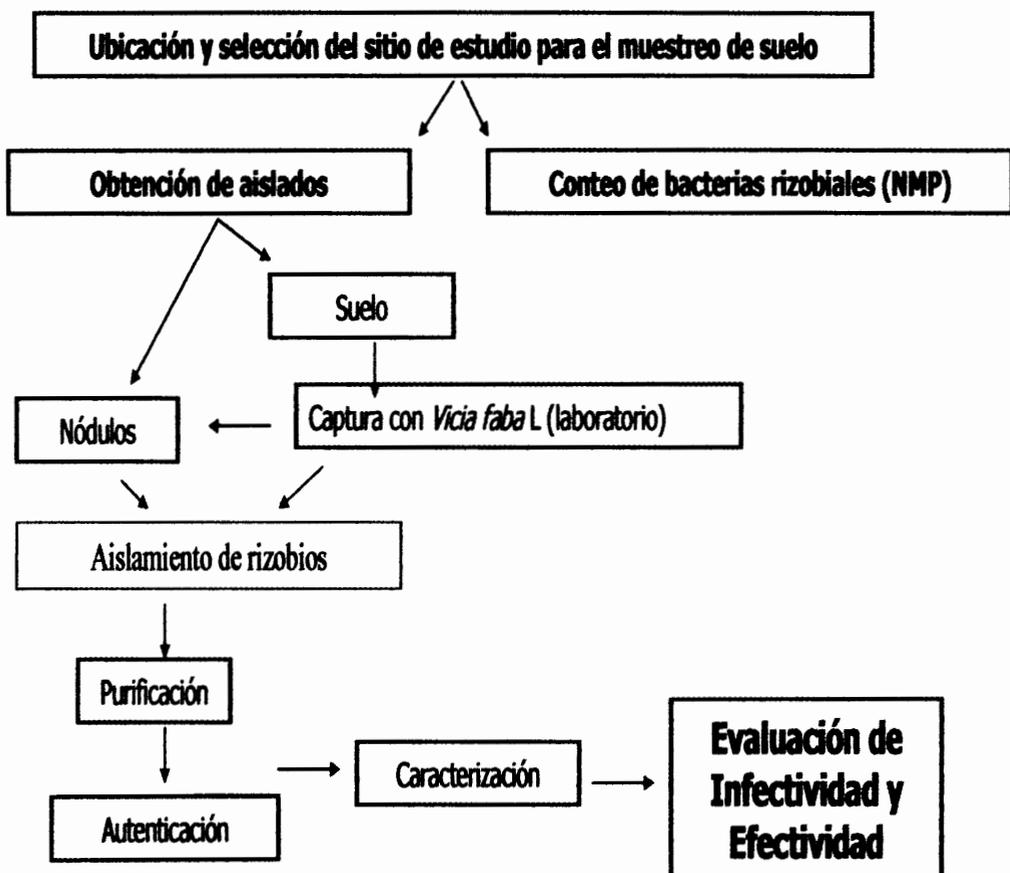


Figura 5. Esquema general de los métodos usados en este Trabajo.



RESULTADOS

1. Análisis del suelo muestreado

La tabla N°1 muestra los datos recogidos del análisis de suelo para la parcela N°1, donde se exponen los valores para las variables más comunes del suelo, podemos observar que la textura del suelo se corresponde a la clase Franco Arenosa (Fa).

Tabla 1. Resultados analíticos obtenidos para la muestra de suelo de la parcela N° 1, Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Granulometría				pH 1:2	* mm hos	C.O	M.O	N	C/N	P	Bases Cambiables meq / 100g			
arena	arcilla	limo	Clase textura			Porcentajes (%)				ppm	Ca	Mg	Na	K
86%	4%	10%	Fa	4,73	1,21	6,19	10,66	0,44	14,07	182	16,0	1,52	0,27	4,97

* Conductividad eléctrica del suelo

La tabla N°2 muestra los datos recogidos del análisis de suelo para la parcela N°2, donde se exponen los valores para las variables más comunes del suelo, de igual forma que en la parcela N°1 podemos observar que la textura del suelo se corresponde a la clase Franco Arenosa (Fa), además se aprecia valores altos en la concentración de calcio 38,75 meq / 100g.



Tabla 2. Resultados analíticos obtenidos para la muestra de suelo de la parcela N° 2, Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Granulometría				pH 1:2	* mm hos	C.O	M.O	N	C/N	P	Bases Cambiables meq / 100g			
arena	arcilla	limo	Clase textura			Porcentajes (%)				ppm	Ca	Mg	Na	K
76%	10%	14%	Fa	5,75	0,83	4,81	8,29	0,35	13,74	182	38,75	0,26	0,24	4,49

* Conductividad eléctrica del suelo.

El suelo de la parcela N°1 se caracterizó por poseer una textura franco arenoso (Fa) con el mayor porcentaje de arena 86%. El pH obtenido para este suelo es considerado fuertemente ácido o muy ácido (4,73). El porcentaje de nitrógeno para este suelo se considera muy alto, al igual que el contenido de carbono, según lo considerado por Casanova (1996).

En cuanto a la parcela N° 2 la textura se corresponde a un suelo Franco arenoso (Fa) con un porcentaje de arena menor que en la parcela anterior (parcela N°1) 76%. El pH obtenido para esta parcela se registró en 5,75 lo que se considera según Casanova (1996) como moderadamente ácido. El porcentaje de nitrógeno se considera alto y el contenido de materia orgánica también. Casanova (1996).

2. Captura de rizobios a partir de las muestras de suelo de las parcelas en el Páramo de Gavidia

Luego de 65 días se procedió al desmontaje de las plantas cultivadas de *V. faba* preparadas para la captura de rizobios, 8 plantas para la parcela N° 1, y 5 para la parcela N° 2. Los datos que se presentan en tabla N° 3 para la parcela N° 1 fueron obtenidos de 5 plantas tomadas aleatoriamente de las 8 plantas, encontrando que solamente 4 plantas nodularon. Para la parcela N° 2 todas las plantas nodularon



Tabla 3. Número de nódulos, tamaño y ubicación, en plantas de *V. faba L.*, obtenidos a partir de suelos de la parcela N° 1 y parcela N° 2

Planta	Nódulos / Planta (Parcela N°1)			Nódulos / Planta (Parcela N°2)		
	Ubicación	Número	Tamaño (mm)	Ubicación	Número	Tamaño (mm)
1	Basal	20	1	Basal	40	1
2	-	0	0	Basal	30	2
3	Basal	30	1	Basal	40	2
4	Basal	20	1	Basal	50	4
5	Basal	20	1	Basal	50	4,5
Promedio ± Error	-	18±10,95	0,75± 0,44	-	42±8,36	2,25± 1,25

En cuanto a la presencia de nódulos en las plantas de *V. faba* se observa, para la parcela N° 1; la ubicación se encontró en la base o cuello de la raíz con un promedio de $18 \pm 10,95$ nódulos por planta, cabe señalar que no todas las plantas en este ensayo nodularon. Los nódulos fueron aproximadamente de un tamaño de $0,75 \pm 0,44$ mm. En la parcela N° 2 se observó que todas las plantas nodularon, la ubicación fue basal o en el cuello de la raíz, el promedio de nódulos fue de $42 \pm 8,36$ nódulos por planta, el tamaño fue de aproximadamente $2,25 \pm 1,25$ mm. El número de nódulos entre parcelas presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) con un nivel de confianza del 95 %. (Diferentes).

3. Obtención de los aislados rizobiales LG1 y LG2

Las bacterias rizobiales cultivadas en medio YMAm, se caracterizaron por presentar: colonias blanquecinas, generalmente brillantes, con abundante o no mucopolisacáridos. La mayoría de las cepas no tomaron el rojo congo del medio de cultivo, en caso de hacerlo se consideraban contaminantes (Skwierinski y Marquina, 2006).



Al seleccionar los nódulos para el aislamiento se tomó en cuenta el tamaño y el color rosado. La coloración interna roja producida por la leghemoglobina, indicadora de la actividad nitrogenasa y en consecuencia fijación biológica de nitrógeno (Ferrera *et al.*, 1993).

Los nódulos seleccionados para el aislamiento en la parcela N°1 fueron cosechados de plantas de *V.faba* crecidas en condiciones de invernadero, mientras que los nódulos seleccionados para la obtención de los aislados en la parcela N° 2 fueron obtenidos directamente en el campo provenientes de raíces de *V.faba*..

Los cultivos bacteriales provenientes de los aislamientos nodulares de cada parcela presentaron varias colonias, pero para fines prácticos se seleccionó una colonia para cada área de estudio, a las que se le denominó LG1 y LG2 pertenecientes a la parcela N°1 y N°2 respectivamente y se efectuaron resiembras sucesivas durante 77 días hasta verificar su pureza.

4. Purificación de los aislados rizobiales seleccionados de las parcelas del Páramo de Gavidia

Los aislados LG1 y LG2 mostraron su pureza en el medio GPA con púrpura de bromocresol, al presentar un escaso crecimiento sin virar el color del indicador, indicando la ausencia de contaminantes tal como lo señala Ferrera *et al.*, (1993).





Figura 6. Aislado rizobial LG1 de la parcela N°1, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.

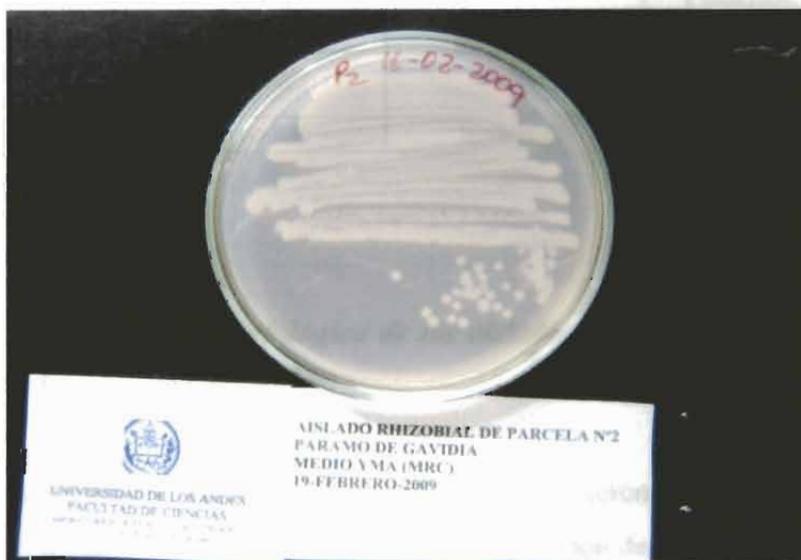


Figura 7. Aislado rizobial LG2 de la parcela N°2, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.



5. Autenticación de los aislados rizobiales.

Debido a las condiciones fitosanitarias del invernadero, 2 plantas inoculadas presentaron contaminación por hongo probablemente por esporas que se encontraban presentes en el suelo o en el ambiente. Solamente una de las dos plantas sobrevivientes inoculadas con LG1 presentó nodulación. Para las plantas inoculadas con LG2 se evidenció que las dos plantas sobrevivientes nodularon. Con respecto a las tres plantas que conformaban el control en ninguna se observó nodulación. Los resultados son mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Autenticación de los aislados rizobiales LG1 y LG2, en su propio hospedador *Vicia faba* L.

Tratamiento	Planta I	Planta II	Planta III
Parcela 1 (LG1)	No noduló	+	Contaminada con hongo
Parcela 2 (LG2)	+	+	Contaminada con hongo
Control	No noduló	No noduló	No noduló

+ Planta Nodulada

6. Caracterización macromorfológica de los aislados rizobiales obtenidos en las parcelas del Páramo de Gavidia

Se determinaron las siguientes características macromorfológicas: elevación, borde, color, aspecto, textura, forma y tiempo de aparición de la colonia.



Tabla 5. Características macromorfológicas de las colonias de los aislados rizobiales, provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Aislado	Elevación	Borde	Color	Aspecto	Textura	Forma	Tiempo de aparición de la colonia
LG1	Convexa	Liso	Blanco Crema	Opaca Brillante	Acuosa	Circular	18 horas
LG2	Convexa	Liso	Blanco Lechoso	Brillante	Gomosa	Circular	48 horas

En la tabla 6 y figura 8 se muestra el crecimiento para los aislados rizobiales LG1 y LG2, responden de igual forma a las distintas temperaturas ensayadas mostrando crecimiento favorable a partir de los 14°C hasta los 30°C.

Tabla 6. Crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados rizobiales LG1 y LG2 provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Aislado	4° C	14° C	22° C	30° C
LG1	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
LG2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo



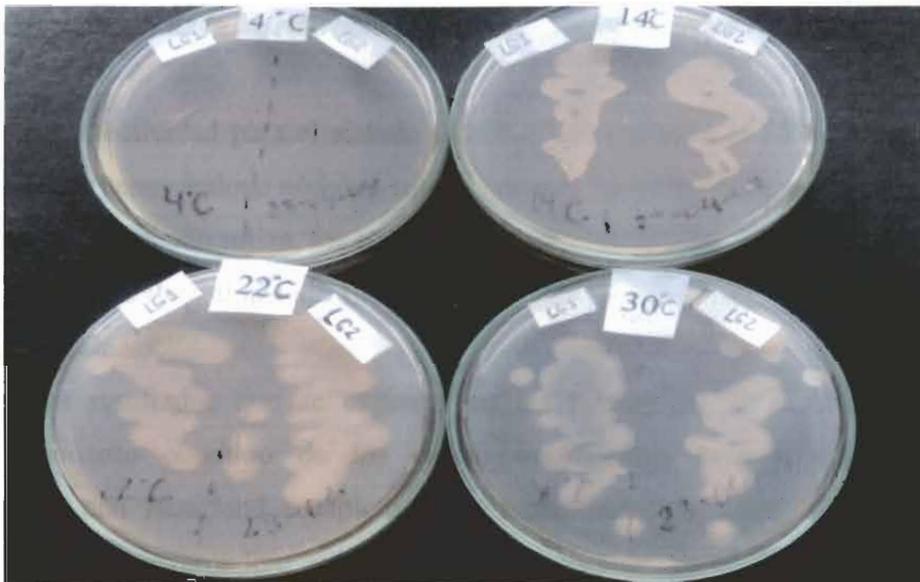


Figura 8. Crecimiento de los aislados rizobiales LG1 y LG2 a diferentes temperaturas

Los resultados que se presentan en la tabla muestran el comportamiento de los aislados LG1 y LG2 a distintas concentraciones de salinidad, se observa que LG1 crece a distintas concentraciones salinas.

Tabla 7. Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad de los aislados rizobiales LG1 y LG2 provenientes del Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Aislado	Concentración de NaCl en %				
	0.1	1.0	1.5	2.0	2.5
LG1	+	+	+	+	+
LG2	-	-	-	-	-

+ Crecimiento en el medio salino.

- Ausencia de crecimiento.



7. Determinación de la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales.

La infectividad para el aislado LG1 fue positiva para el 25% de las plantas inoculadas, encontrándose nódulos solo en una de las plantas, se contabilizaron 25 nódulos de coloración rojiza, los cuales se ubicaron en la parte inferior de la raíz y a nivel del cuello. Para el aislado LG2 los resultados fueron negativos no encontrando plantas noduladas.

Los resultados que se exponen en las Figuras 9, 10 y 11 muestran el comportamiento obtenido de los cuatro tratamientos diferentes (LG1, LG2, Fertilizada con Hoagland completo y sin inoculación con riego Hoaglan $\frac{1}{4}$) en condiciones de invernadero aplicados a las plantas de *V. faba*, se consideró tres parámetros utilizados fundamentalmente para evaluar la infectividad y eficiencia de los aislados rizobiales.

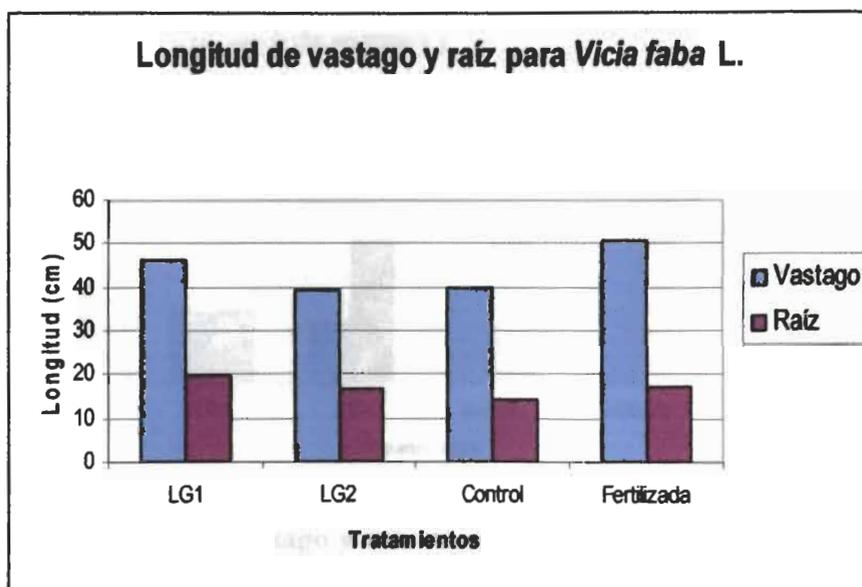


Figura 9. Longitud del vástago y raíz en *Vicia faba* L. crecidas en el invernadero.



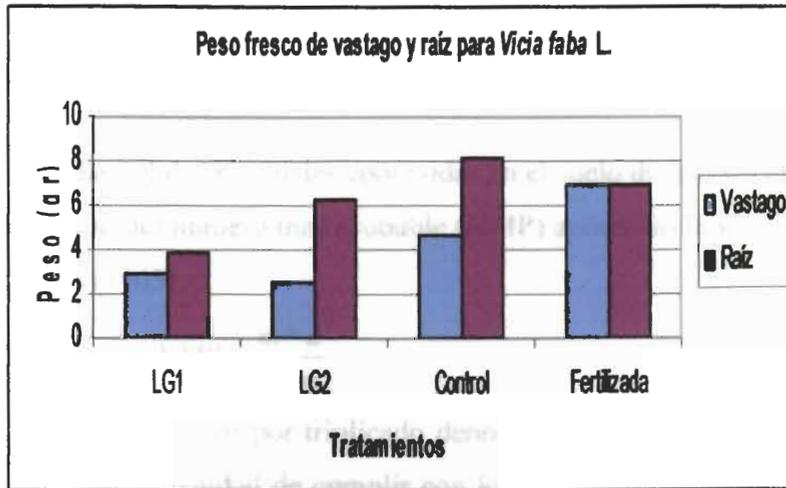


Figura 10. Peso fresco de vástago y raíz de plantas de *Vicia faba* L. crecidas en el invernadero.

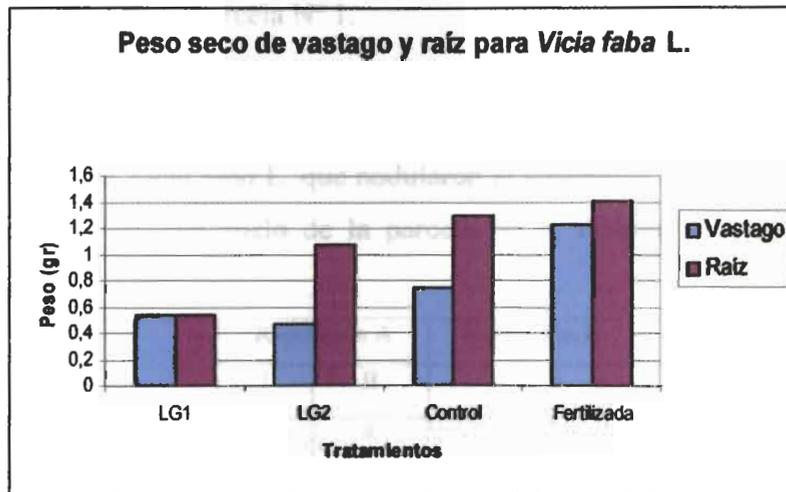


Figura 11. Peso seco de vástago y raíz de plantas de *Vicia faba* L. crecidas en el invernadero.



8. Determinación del tamaño de la población rizobial en los suelos a través del método número más probable (NMP)

El conteo de las células rizobiales contenidas en el suelo de las parcelas se realizó a través del método del número más probable (NMP) aplicando la fórmula y la tabla de Fisher y Yates (1963):

$$NMP = \frac{m * d}{v * n}$$

El experimento se realizó por triplicado denominando las replicas con las letras **A, B y C** esto con la finalidad de cumplir con los requerimientos estadísticos, para poder convalidar posteriormente los resultados.

La tabla 4 muestra la cantidad de plantas que respondieron a la inoculación preparada con suelo de la parcela N° 1.

Tabla 8. Plantas de *Vicia faba* L. que nodularon al someterse a inóculos de distintas diluciones preparadas con suelo de la parcela N° 1, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.

Dilución	Repetición A		Repetición B		Repetición C	
	I	II	I	II	I	II
10 ²	+	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	-
10 ⁵	-	-	-	-	-	-
10 ⁶	-	-	-	-	-	-
10 ⁷	-	-	-	-	-	-
Total de plantas noduladas	6 plantas		6 plantas		5 plantas	

+ Plantas noduladas

-Plantas no noduladas.



El número de plantas noduladas para la replica A se correspondió a 6 lo que corresponde a un valor en la tabla de Fisher y Yates igual a 1.7×10^2 .

$$NMP = \frac{1,7 \times 10^2 * 10^2}{5ml * 10gr} = 3,4 \times 10^2 \text{ Células rizobiales /g suelo.}$$

$$\text{Límites de confianza (95\%)} = 340 \times 6,6 \text{ a } 340 \div 6,6 \\ 2240 \text{ a } 51,51$$

*Cálculo del Número más Probable para la repetición B:

$$NMP = \frac{1,7 \times 10^2 * 10^2}{5ml * 10gr} = 3,4 \times 10^2 \text{ Células rizobiales /g suelo.}$$

$$\text{Límites de confianza (95\%)} = 340 \times 6,6 \text{ a } 340 \div 6,6 \\ 2240 \text{ a } 51,51$$

*Cálculo del Número más Probable para la repetición C:

$$NMP = \frac{5,8 \times 10^1 * 10^2}{5ml * 10gr} = 1,16 \times 10^2 \text{ Células rizobiales /g suelo.}$$

$$\text{Límites de confianza (95\%)} = 116 \times 6,6 \text{ a } 116 \div 6,6 \\ 765,6 \text{ a } 17,57$$

Por lo tanto tenemos que para el suelo de la parcela N°1 el NMP promedio es de $2,65 \times 10^2 \pm 129,32$ Células r /g. suelo



De igual forma se procedió para la recolección de datos en la parcela N° 2, la Tabla 5 muestra los resultados de las plantas que nodularon en este ensayo.

Tabla 9. Plantas de *Vicia faba L* que nodularon al someterse a inóculos de distintas diluciones preparadas con suelo de la parcela N° 2. Páramo de Gavidia, estado Mérida.

Dilución	Repetición A				Repetición B				Repetición C			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ³	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁶	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Total de plantas noduladas	16 plantas				20 plantas				15 plantas			

+ Plantas noduladas

- Plantas no noduladas

Número más Probable para la repetición A:

$$NMP = \frac{1,7 \times 10^3 * 10^2}{5ml * 10gr} = 3,4 \times 10^3 \text{ Células rizobiales /g. suelo}$$

Límites de confianza (95%) = 3400 x 3,8 a 3400÷3,8
12920 a 894,7

*Cálculo del Número más Probable para la repetición B:



$$NMP = \frac{1,8 \times 10^4 * 10^2}{5ml * 10gr} = 3,6 \times 10^4 \text{ Células rizobiales /g suelo.}$$

Límites de confianza (95 %) = 36000 x 3,8 a 36000÷3,8
 136800 a 9473,6

*Cálculo del Número más Probable para la repetición C:

$$NMP = \frac{1,0 \times 10^3 * 10^2}{5ml * 10gr} = 2,0 \times 10^3 \text{ Células rizobiales /g Suelo.}$$

Límites de confianza (95%) = 2000 x 3,8 a 2000÷3,8
 7600 a 526,3

Por lo tanto tenemos que para el suelo de la parcela N°2 el NMP promedio es de $1,3 \times 10^4 \pm 19238,50$ Células r/g. suelo.

Tabla 10. Resumen del conteo a través del método del Número más Probable (NMP) de bacterias rizobiales para las parcelas estudiadas, Páramo de Gavidia, Estado Mérida.

Parcela	NMP x g. de suelo para cada replica			Promedio ± Error estándar de Células r /g. suelo
	Repetición A	Repetición B	Repetición C	
N°1	3,4 x 10 ² Células r /g. suelo	3,4 x 10 ² Células r /g. Suelo	1,16 x 10 ² Células r /g. Suelo	2,65 x 10 ² ± 129,32
N°2	3,4 x 10 ³ Células r /g. suelo	3,6 x 10 ⁴ Células r /g. Suelo	2,0 x 10 ³ Células r /g. Suelo	1,3 x 10 ⁴ ± 19238,50



El promedio poblacional en la parcela N°1 es menor en comparación con lo obtenido para la parcela N°2, no pudiendo establecer diferencias entre las poblaciones encontradas a través del NMP debido a que la variación encontrada para la parcela N°2 es muy elevada, valor registrado en $1,3 \times 10^4 \pm 19238,50$, el cual se encuentra dos ordenes de magnitud por encima de las otras medias calculadas para esta misma parcela, como se aprecia en la tabla anterior (Tabla 10) por lo tanto no se le puede aplicar una prueba estadística como la planteada en la metodología (Prueba T).



DISCUSIÓN

Actualmente cuando se habla de agroecosistemas incluyendo la utilización agrícola y pecuaria, surge la preocupación por el desarrollo sostenible y por el deterioro de los sistemas naturales particularmente frágiles (Aranguren *et al.*, 1997). En el Páramo de Gavidia, que es una zona agrícola por excelencia se han implementado diversas formas de manejo desde parcelas con descansos largos, con el fin de recuperar la fertilidad de los suelos, hasta el manejo con aplicaciones indiscriminadas de agroquímicos en áreas respectivamente cultivadas con rotación de algunos rubros agrícolas como papa, zanahoria y ajo (Proyecto Páramo Andino 2008). Además es de nuestro interés, la presencia de cultivos agrícolas pertenecientes a la familia de las leguminosas por sus efectos benéficos en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno a través del proceso simbiótico con bacterias rizobiales, por esta razón esta región Paramera ha sido objeto de este estudio preliminar relacionado con la rizobiología.

Tal es el caso del cultivo de *V. faba*, que en los últimos años ha cobrado auge entre los pobladores de la zona ya que es apreciado por los productores por diversas razones: incorporación al suelo como abono verde, como barrera biológica contra el díptero *Liriomiza sp*, valor gastronómico, y como recuperador de suelos, ha sido promocionado por las redes agroecológicas que funcionan en la región y en este sentido existen alrededor de 12 fincas donde se cultiva actualmente este rubro (habas) como fuente de semillas (Comunicación personal Ing Rafael Romero).

Los resultados obtenidos permiten señalar la presencia de aislados rizobiales en los suelos del Páramo de Gavidia, además los mismos son infectivos ya que se logró obtener nódulos, de los cuales se aisló y luego autenticó dos cepas rizobiales, denominadas LG1 y LG2. Estos aislados conseguidos en condiciones de laboratorio, fueron estudiados y considerados rizobios, ya que las características macromorfológicas de las colonias así lo sugieren, según lo referido por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988).



Los dos aislados rizobiales fueron obtenidos a través de dos vías de aislamiento distintas. Uno, a través de la captura a partir del suelo de la parcela N°1, empleando un cultivo trampa hospedador (*Vicia faba* L.) y el segundo fue aislado de nódulos radicales de *Vicia faba* L. que se hallaban en la parcela N°2, ambos aislados son infectivos demostrado mediante la autenticación en este hospedador.

Los suelos de donde proceden los aislados rizobiales presentaron textura Franco Arenosa en ambas parcelas, lo que permite la absorción de agua pero no así la retención de la misma, por lo tanto los nutrientes son arrastrados por lixiviación hacia el subsuelo, reflejándose en el análisis de suelo valores bajos para Sodio (Na) y Magnesio (Mg). Puesto que las parcelas son de carácter agrícola la incorporación de fertilizantes es evidente, reflejado en los altos niveles de nitrógeno y fósforo en ambas parcelas.

Los registros revelan alto contenido de materia orgánica de ambos suelos muestreados, ya que las bajas temperaturas de la localidad (8,4° C) dificultan la degradación rápida de la misma (Montilla *et al.*, 2002). En cuanto a la concentración del ión Ca^{++} el cual favorece notoriamente la capacidad de crecimiento de rizobios a pH bajos en medios artificiales, como lo reporta (O' Hara *et al.* 1989; Reven *et al.* 1993) en (Del Papa *et al.*, 2003) podemos observar que los registros para la parcela N°2 fueron mucho mayores que los registrados en la parcela N°1, pudiendo este factor afectar el número de bacterias rizobiales encontradas en ambas parcelas.

Con respecto al pH, se registró un valor de 4,73 para la parcela N° 1 y de 5,75 para la parcela N° 2, que de acuerdo al criterio considerado por Casanova, (1996) se establece que el suelo de la parcela N° 1 pertenece a un suelo fuertemente ácido, y el de la parcela N° 2 es un suelo moderadamente ácido, consecuentemente y según (Lie, 1969; Lie, 1974) en (Marquina 2006) el estrés ácido puede afectar cualquier estado de la simbiosis *Rizobio- leguminosa*, por ejemplo la sobrevivencia de los rizobios en el suelo, la multiplicación en la rizosfera, la infección radical, la formación del nódulo, entre otros.



El método para el aislamiento de rizobios a partir del suelo más práctico, emplea cultivos trampas de plantas de leguminosas, para luego cosechar los nódulos más representativos y obtener de allí bacterias fijadoras de nitrógeno (Vincet 1975), procedimiento utilizado en este estudio, donde no se registraron diferencias en cuanto a la ubicación de los nódulos en el sistema radical de *V. faba* L., pero si en el número de los nódulos y tamaño de los mismos; para la parcela N° 1 se registró un promedio de $18 \pm 10,95$ y $0,75 \pm 0,44$ mm en tamaño y para la parcela N° 2 fue de $42 \pm 8,36$ nódulos por planta, y el tamaño aproximadamente $2,25 \pm 1,25$ mm, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) con un nivel de confianza del 95 %, esto atribuible probablemente a la presencia del hospedador *V. faba* en el momento del muestreo de suelo en la parcela N° 2 y las altas concentraciones del ión Ca^{++} encontrada en esta parcela.

Los resultados obtenidos de captura, aislamiento y autenticación muestran que los aislados obtenidos probablemente sean rizobios, además respondieron apropiadamente al medio YMAmrc.

Cuando se considera el número de microorganismos del suelo, factores como la temperatura, pH y humedad, también afectan la actividad y cantidad de la microflora y microfauna. Las bacterias del suelo son microorganismos unicelulares y representan una de las formas de vida más simple y más pequeñas que se conocen. Al mismo tiempo, superan en número a todos los otros organismos del suelo; en un gramo de suelo pueden estar presentes 10^8 bacterias, las cuales pueden representar una superficie de $2 \text{ m}^2/\text{Kg. de suelo}$ (Casanova, 1996).

La población rizobial mencionada por Azcón y Talón, 2000 se sitúa entre los órdenes de 10^2 y 10^5 células por gramo de suelo en tierras de barbecho, al igual que estudios realizados por Santana, (2007) quien presenta resultados de poblaciones rizobiales calculadas con el método del número más probable (NMP), en suelos con cultivo de café, bajo sombra de árboles de leguminosas en Puerto Rico, en el orden de $1,16 \times 10^3$ células por 100 gramos y $6,2 \times 10^2$ células por 100 gramos. Comparando estos datos con los resultados obtenidos para ambas parcelas se puede



decir que las poblaciones rizobiales en el Páramo de Gavidia se encuentran entre los límites registrados por Azcón y Talón, (2000) y por Santana (2007). En términos comparativos la población de bacterias rizobiales encontrada en la parcela N° 1 arrojó un promedio de $1,65 \times 10^2 \pm 129,32$ bacterias / gramo de suelo, menor en comparación con el valor registrado para la parcela N° 2 con una población promedio de $1,3 \times 10^4 \pm 19238,50$ células / g de suelo, resultados que estadísticamente no se pudieron comparar debido al error experimental presente en la replica B del conteo a través del NMP para la parcela N°2, el cual superó a la media obtenida, asumiendo que los datos fuesen correctos las poblaciones son distintas. Posiblemente esto se debe al grado de acidez de estos suelos siendo el pH fuertemente ácido (4,73) en la parcela N°1, sugiriendo una tolerancia tanto de los rizobios como de la planta hospedadora *V.faba* a la acidez del suelo. En este sentido Graham *et al* (1994) hacen referencia a la tolerancia de los rizobios a la acidez y comentan que la tolerancia de rizobios a la acidez es muy variada y depende de la especie y aún de la cepa. En general, se ha considerado que los rizobios de crecimiento rápido son menos tolerantes a la acidez que los de crecimiento lento, con respecto al pH moderadamente ácido (5,75) en la parcela N° 2, y así pues, también lo señala, Temprano *et al* (2007) argumentando que el pH influye en algunos géneros de estas bacterias ya que son poco tolerantes a la acidez. A su vez la presencia de la leguminosa hospedadora *V. faba* en el terreno pudo afectar la cantidad de bacterias rizobiales / g de suelo registradas en este estudio, ya que es sabido que las raíces que permanecen en el suelo brindan un ambiente protector que aprovechan dichas bacterias (Del Papa *et al.*, 2003). Las diferencias en el título poblacional entre ambas parcelas y el cual fue de $1,3 \times 10^4$ células/g de suelo para la parcela N° 2 y en donde está leguminosa se encontraba presente al momento de tomar la muestra fue mayor en comparación con los resultados obtenidos para la parcela N° 1, donde la leguminosa tenía tiempo de ausencia y el valor resultante para esta población fue en promedio $1,65 \times 10^2$ bacterias/g de suelo, pudiendo esto deberse a que la presencia



del hospedador *Vicia faba* en la parcela N° 2 al momento de tomar la muestra garantizó la presencia en mayor cantidad de los rizobios en el suelo.

Los factores edafoclimáticos pueden modificar fuertemente la viabilidad de los rizobios, la persistencia e implantación de la leguminosa, y el proceso de asociación simbiótica en sí mismo. Algunas leguminosas son especialmente sensibles a ciertas condiciones de estrés ambiental como: temperatura y pH alejado del óptimo, situaciones en la que se perturba seriamente el proceso de asociación y fijación del nitrógeno. Es claro que el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere de una planta vigorosa, una adecuada colonización y supervivencia de los rizobios en el suelo (Del Papa *et al.*, 2003). Por lo tanto, para los ensayos de infectividad y efectividad de un aislado rizobial se deben garantizar todos los señalamientos mencionados anteriormente, condiciones que no lograron optimizarse en el invernadero; en consecuencia la autenticación de los aislados LG1 y LG2, obtuvo resultados muy controversiales ya que muy pocas plantas presentaron nodulación, criterio rígido y confiable para determinar la presencia o no de los rizobios. Estos resultados obedecen probablemente también a la gran especificidad del hospedador *Vicia faba* L. al momento de ser infectado por las bacterias rizobiales como lo señalan Rodríguez *et al.*, (1994) para *V. faba* L. quien encontró nodulación apenas del 4% al ser inoculada con la cepa *Rizobium leguminosarum* bv. *viciae* CP 108 st 150, con una población aproximada de 3.2×10^7 bacterias por semillas.

La caracterización realizada para los aislados permite decir que LG1 y LG2 son probablemente cepas de rizobios ya que las características macromorfológicas de las colonias son consistentes con lo conocido para bacterias de estos géneros y consideradas por (Vicent, 1975, Ferrera *et al.*, 1993, CIAT 1988 y Marquina, 2006); El tiempo de aparición de las colonias permitió separarlos en dos categorías para LG1 categoría muy rápida (18 horas) y para LG2 categoría rápida (48 horas). Pero, no pudiendo llegar a su clasificación más rígida ya que no se consideran las características genotípicas. Aunado a esta caracterización y desde un punto de vista fisiológico, se estudió el aspecto de tolerancia a la salinidad y la temperatura,



encontrándose que el aislado LG1 toleró bastante bien las concentraciones salinas ensayas (concentraciones de 0,1; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5) mientras que el aislado LG2, resultó ser no tolerante a ninguna concentración salina, no permiten una comparación precisa con cepas referenciales debido a los pocos estudios realizados en la zona del Páramo de Gavidia, además existe una cepa disponible aislada en el estado Mérida denominada ME01, la cual no es comparable ya que el sitio de origen es completamente distinto. Con respecto a la temperatura factor que en condiciones naturales depende de la cobertura vegetal, tipo de suelo, humedad, radiación neta, y otros (Alexander, 1980) los resultados fueron similares para ambos aislados presentando crecimiento favorable en el rango de 14°C hasta 30°C, como era de esperarse ya que provienen de ecosistemas con condiciones ambientales muy similares en cuanto a estos parámetros. Cada especie se caracteriza por un rango de temperatura de crecimiento, lo que ha permitido definir categorías: psicrófilas, mesófilas y termófilas (Alexander, 1980), según los resultados obtenidos se puede señalar que los aislados LG1 y LG2 pertenecen a la categoría de las mesófilas.

Los resultados obtenidos para la evaluación de infectividad y efectividad son escasos ya que el aislado LG2 no respondió favorablemente, no encontrando nodulación en ninguna de las plantas, probablemente debido a las condiciones ambientales presentes en el invernadero, las cuales variaron notablemente en el último ensayo, tal es el caso del aumento de la temperatura de 30° C registrados durante el ensayo de autenticación a 37° C para el momento de evaluación de la infectividad y efectividad; este factor pudo aumentar de un modo no específico los procesos metabólicos de la planta como respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración. Otro factor importante es la luz ya que afecta la simbiosis a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. También la ausencia o exceso de ciertos elementos minerales influyen en la nodulación tal es el caso del molibdeno un constituyente de la nitrogenasa, así una deficiencia afecta negativamente la nodulación.



Como es señalado por Loreido *et al.*, (2003), la selectividad de las bacterias rizobiales por las leguminosas es conocida desde hace mucho tiempo. A inicio del siglo XX ya se había reconocido la existencia de cierta selectividad en el par rizobio/leguminosa. Esta preferencia de rizobio por leguminosas específicas pudiese explicar las incongruencias obtenidas para estos resultados de infectividad y efectividad ya que es conocida la gran especificidad de *Vicia faba* L. en el momento de ser infectada por rizobio. En cuanto al aislado LG1 los resultados de nodulación fueron bajos probablemente debido a todo lo señalado anteriormente.

El aislado LG1 proviene de nódulos capturados en el suelo con el hospedador *V.faba*, en donde el promedio de nodulación por planta fue bajo, y el tamaño de los nódulos fue pequeño, la densidad poblacional estimada a través del NMP fue inferior en comparación con la parcela N° 2, pero la resistencia a concentraciones salinas es superior al aislado LG2, además la respuesta en condiciones de invernadero presentan resultados aceptables.

El aislado LG2 proviene de nódulos radicales obtenidos en el campo en la parcela N°2, el promedio de nódulos al igual que el tamaño fue mayor en comparación con la parcela N° 1, la densidad poblacional fue mucho mayor, con respecto al tiempo de crecimiento es rápido pero no tan rápido como LG1, la tolerancia a la salinidad es nula y su respuesta en condiciones de invernadero con el hospedador *V. faba* es nula.



CONCLUSIONES

1. La captura de bacterias rizobiales fue posible tanto para la parcela N° 1 como para la parcela N° 2, con el hospedador *Vicia faba* L. funciona más eficientemente en los suelos de la parcela N°1.
2. En vista de los resultados obtenidos, se comprueba la hipótesis N° 1, en donde presencia de la leguminosa *Vicia faba* L. nodulada, supone la presencia de bacterias rizobiales simbióticas en el terreno.
3. Los dos aislados rizobiales seleccionados, denominados LG1 y LG2. difieren en cuanto a la respuesta de tolerancia a las concentraciones salinas ensayadas, LG1 es tolerante a todas las concentraciones ensayadas, mientras que LG2 no es tolerante a ninguna concentración salina, la nodulación estuvo presente en condiciones de invernadero para el aislado LG1 mientras que LG2 no respondió positivamente.
4. Las parcelas seleccionadas presentan poblaciones rizobiales en el orden $2,65 \times 10^2$ células r /g. suelo para la parcela N°1, y en el orden de $1,3 \times 10^4$ células r /g suelo para la par cela N°2.
5. Los aislados obtenidos son infectivos, formadores de nódulos con el hospedador seleccionado (*Vicia faba* L.) en niveles distintos de infectividad comprobándose con estos resultados la hipótesis N° 2.
6. Los aislados seleccionados crecen a un rango de temperatura por encima de los 14° C.



RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevamente el ensayo del conteo población a través del NMP para la repetición B de la parcela N° 2.
2. Realizar muestreos de suelos en el Páramo de Gavidia con la finalidad de obtener y seleccionar nuevos aislados rizobiales promisorios en cuanto a la capacidad de inactividad y efectividad para compararlos con los aislados LG1 y LG2.
3. Realizar con los aislados obtenidos LG1 y LG2 ensayos tanto de campo como de laboratorio con la finalidad de medir infectividad y efectividad tanto en *Vicia faba* L. como en otras especies de leguminosas para comparar especificidad.
4. Realizar la caracterización molecular de los aislados a través de técnicas de PCR.
5. Realizar ensayos de nodulación con los aislados LG1 y LG2 para cuantificar nitrógeno fijado.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander, M. 1980. Microbiología del suelo. AGT Editor SA. Mexico. pp. 4-34.
- Allen, O. N. y Allen, E. K. 1981. The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.
- Altamirano, F E. 2003. Ecofisiología de las Rizobacterias En: Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Albanesi A, Anriquez A, Luna S, Kunst C y Ledesma R (Eds). Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero. pp. 113- 117.
- Aranguren, A. 1997. Aspectos de la dinámica del nitrógeno de parcelas con diferentes tiempos de descanso en el Páramo de Gavidia (Andes Venezolanos) En: (M Libermas y Baied Eds), Desarrollo sostenible de montaña manejo de áreas frágiles en los Andes. pp. 171-179. UNU Bolivia.
- Azcón- Bieto, J y Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Interamericana Mc Gaw Hill. Madrid. España. pp. 247-260.
- Beijerinck, M. W. 1888. Die bacterien der Papilionaceen- Knollchen. . En The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation..Allen,O.N.y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.
- Briceño, B., Azocar, A., Fariñas, M y Rada F. 1999-2000. Características anatómicas de dos especies de *Lupinus* L. de los Andes venezolanos. PITTIERIA, 1 (29 y 30): 21-35.



- Briceño, B y Morillo G. 2002. Catálogo abreviado de las plantas con flores de los páramos de Venezuela. Parte I. Dicotiledoneas (Magnoliopsida). Acta Bot Venezuelica, 25(1): 24 - 25.
- Casanova, E. 1996. Introducción a la ciencia del suelo. Litopar C.A. Caracas-Venezuela.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia. pp. 3-1, 3-2 y 10-1 a 10-6.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. Printed in the U.S.A. pp. 600 - 601.
- Crozat, Y., Cleyet-Marel, J., Giraud J y Obaton M.1982. Survival rates of *Rizobio japonicum* populations introduced into different soils. Soil Biol. Biochem. ,14: 401-405.
- Cubero, J. 1974. Evolución de *Vicia faba* L. Genética teoría y aplicada. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 45: 47 -51.
- Del Papa, M F., Pistorio, M., Draghi, W O., Balague, L J., Peticari A., Hozbor D F, y Lagares A. 2003. Condicionamientos ambientales al desarrollo de la simbiosis Rizobio_ Leguminosa: Estrés ácido como modelo de análisis. En: Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Albanesi A, Anriquez A, Luna S, Kunst C y Ledesma R (Eds). Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero. pp.. 195-207.



Eriksson, J. 1874. Studier ofver leguminosernas rotknolar: En The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation..Allen,O.N.y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.

Factores que afectan la población de rizobios en el suelo.

<http://www.nitragin.com.ar/guiainoc4.asp> [Consulta 2008, Abril 17].

Ferrera, R., González, M. y Rodríguez M. 1993. *Rizobio-Leguminosa* En: Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas. pp.. 17 y 22.

Fisher, R. A. & Yates, F. 1963. Statistical Tables. Oliver & Boyd, (6th ed).

Freire, J, y Sato, M. 1999.Conservación de cultivos de Rizobios. Revista Latinoamericana de Microbiología. Laboratorio de Microbiología del Suelo, Universidad Federal del Río Grande do Sul. Av. Bento. Goncalves 7712. Porto Alegre. (RS) 90001-970. Brasil. p. 35.

Fuchsius, L. 1542. *De Historia Stripium Commentarii Insigne*. En The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation..Allen,O.N.y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.

González-López, J. Lluch, C. 1992. Interacción planta- microorganismo: metabolismo del Nitrógeno. Ed. Rueda SL. Madrid.

Graham PH, KJ Drager, ML Ferrey, MJ conroy, BE Hammer, E Martinez, SR Aarons, C Quinto. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance and *Rhizobium torpici* UMR 1899. Can. J. Microbiol 40: 198-207.



- Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237.
- Lodeiro, A., López, S., Mongiardini, E., Quelas, J., y Peticari, A. 2003. Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno En: *Microbiología Agrícola un aporte de la investigación* (Albanesi A, Anriquez A, Luna S, Kunst C y Ledesma R. Eds). Argentina.Universidad Nacional de Santiago del Estero. pp. 159- 193.
- Macbride, J. 1948. Flora of Perú. Botanical series field museum of natural history, volumen xiii, parte iii, number 1.p. 357
- Madigan, M. T., Martinko, J. M y Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms.* (Bergey's Manual of systematic Bacteriology 2da Ed. A-8). Pretince Hall 10ed. United Status of America.
- Malpighi, M. 1679. *Anatome Plantarum*: En The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation..Allen,O.N.y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.
- Marquina, M., Skwierinski. R y Briceño. B. 2001-2002. Actividad reductora de acetileno de bacterias asociadas a las Glumifloras del Páramo Loma Redonda, Merida-Venezuela. *Rev, Pittieria*, Vol 2 N°31.pp.57-69.
- Marquina, M. 2006. Caracterización fenotípica y genotípica de rizobios autóctonos, provenientes de diversas regiones de Venezuela. Tesis de Maestría. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida.



Méndez-Natera, J, R. 2002. Relación entre el peso seco total y los caracteres vegetativos y nodulación de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L). Revista Científica UDO Agrícola, V (2):46-53.

Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y tierras.

(<http://www.inia.gob.ve/downloads/locti/AGISUST.pdf>). [Consulta 2008, Abril 10].

Monasterio, M. 1980. Las formaciones vegetales de los Páramos de Venezuela. En: (M. Monasterio ed): Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos. Mérida, Ediciones de la Universidad de Los Andes. pp. 93- 158

Monasterio, M., Molinillo, M., Romero, L. y Llambi L. 2003. Los Páramos de Mérida como Reserva de Biosfera. Revista Ambiente, 25(62):44-47

Montilla, M., Herrera-Peraza, R y Monasterio, M. 2002. Influencia de los periodos de descanso sobre la distribución vertical de raíces, micorrizas arbusculares y pelos radicales en Páramos Andinos de Venezuela. Ecotropicos 15 (1): 83-96

Mothes, K. and Pietz, J. 1937. Zur Physiologie der Leguminosensymbiose.

Naturwissenschaften. 25:201-202.

Nobbe, F., Hiltner, L., and Schmid, E. 1895. Versuche uber die Biologie der Knollchenbakterien der Leguminosen, insbesondere uber die Frage der Arteinheit derselben. En *The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and Nodulation*. Allen, O.N. y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of Wisconsin LTD. p. 13.

Proyecto Páramo Andino. <http://www.condesan.org/ppa/Documentos/Sitios/Mojanda-Zuleta/Plan%20accion%20MOJANDA.pdf>. [Consulta 2008, Enero 10].



- Pittier, H. 1944. Leguminosas de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría. Servicio Botánico. Boletín Técnico N° 5 pp.. 136. Editorial Elite Caracas.
- Romero, L. y Monasterio M, 2005. Papas negras del páramo un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en los Andes de Venezuela. ¿Es posible recuperarlas? En: Boletín Antropológico Centro de Investigaciones Etnológicas, Museo Arqueológico. pp. 107-138. Universidad de Los Andes.
- Rosas, S y Correa, N. 2003. Microorganismos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal (PGPR's) En: Microbiología Agrícola un aporte de la investigación Argentina. (Albanesi A, Anriquez A, Luna S, Kunst C y Ledesma R Eds). Universidad Nacional de Santiago del Estero. pp. 83-95
- Rodríguez, M. De las Nieves, M. Ferrera R. 1994. Effect of some legumes germination on Rizobio survival. Soil biology. 12 (3): 329-337.
- Santana, M. 2007. Fijación Biológica de Nitrógeno por leguminosas arbóreas para sombra de café en Puerto Rico. Tesis maestría en **AGRONOMÍA**. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.
- Sarmiento, L y Monasterio, M. 1993. Elementos para la interpretación ecológica de un sistema agrícola campesino de los Andes venezolanos (Páramo de Gavidia). En: (Rabey, M Eds). El uso Tradicional de los Recursos Naturales en Montañas: Tradición y Transformación. Pp.55-77. Montevideo UNESCO-ORCYT.
- Sarmiento, L. 1995. Restauration de la fertilité dans un systeme agricole a jachere longue des hautes Andes du Venezuela. PhD Thesis. Universite de Paris- Sud.



- Sayago, A. 1985. Perfil de nodulación de las leguminosas del Distrito Sucre. Edo Mérida. Trabajo especial de Gado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. pp. 50. Mérida.
- Skwierinski, R. y Marquina, M. 2006. Captura y nodulación de bacterias rizobiales a partir de muestras de suelos. Prácticas de Simbiosis. Curso de Simbiosis. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.
- Urquiaga, S., Bruno, J., Boddey, R y Neves, M. 1998, Importancia del papel de la fijación de nitrógeno (FBN) en el desarrollo agrícola de América Latina y el Caribe en: XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Maturín-Monagas Venezuela pp. 50-51.
- Temprano, F., Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D y González-López F. 2007. Evaluación de la capacidad simbiótica de aislamientos de *Sinorhizobium (ENSINFER) Medicae* procedentes de suelos de la dehesa Andaluza y Extremeña con *Medicago polymorpha*.
- Vareschi, V. 1970. Flora de los Páramos. Universidad de los Andes. Ediciones del rectorado. Mérida- Venezuela. Pp. 140-143.
- Vincent, J.M. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. p.4.
- Wang, E. T., Van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, I., Chen, W. X., and Martínez Romero, E. 1998. *Rhizobium huatlense* sp nov., a Symbiont of *Sesbania herbacea* that has close Phylogenetic Relationship with *Rhizobium galegae*. Int. J System. Bacteriol. 48:687-699.



Wang, T., Martínez, J y Lara I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas
En: Microbios en línea. Romero, E y Romero, J (Eds). Cap 8. Disponible
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>.

Ward, H. M. 1887. On the tubercular swellings on the roots of *Vicia faba*. *Philo. Trans.*
En The leguminosae A Source Book of characteristics, Uses and
Nodulation..Allen,O.N.y Allen, E. K. 1981. Madison Wisconsin: University of
Wisconsin LTD. p. 13.

Werner, D 1992. The *Rizobio/ Bradyrizobio- Fabales* Simbiosis En: Symbiosis the
plants and microbes. Champán & Hali pp. 49-170.

Zapata M, C.F., Sánchez de P, M y Massae A, N. 2003. Indicadores de actividad
biológica en suelos con diferentes gados de intervención en el Ecoparque Cerro de la
Bandera. *Acta Agronómica* 52 (1-4):



ANEXOS

Anexo 1. Médios de cultivo

Medio YMA modificado (YMAm) original de Vincent, 1975., Ferrera Cerrato <i>et al.</i>, 1993.	
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Manitol	2,5g
Sacarosa	7,5g
Extracto de levadura	0,5g
Agar	15g
Rojo congo	1ml
Agua destilada	1000 ml
pH 6.5	

Púrpura de Bromocresol (GPA) (Ferrera <i>et al.</i> , 1993)	
Glucosa	10g
Peptona de carne	5g
Púrpura de bromocresol stock	10ml (0,1%)
Agar	15g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.0	



Tryptona – Extracto de levadura (TY) (Beringer, 1974)	
Bacto-Tryptona	5g
Extracto de levadura	3g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,87g
Agar	15g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.0	

La fertilización de los ensayos ocasionalmente se realizó a través del riego con soluciones Hoagland $\frac{1}{4}$ de N y Hoagland sin nitrógeno.

Medio Hoagland modificado

Fuente: Epstein 1972 citado por Taiz y Zeiger 1998 en Marquina 2006.

Hoagland $\frac{1}{4}$ de N	
CuSO ₄ .5H ₂ O	2ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2ml
NaMoO ₄ .2H ₂ O	1ml
MnCl ₂ .4H ₂ O	1ml
H ₃ .BO ₃	2ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	1ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	
KNO ₃ .	1.5ml
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1ml
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	1ml
pH	6,5 -6-8



Hoagland sin nitrógeno	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2ml
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1ml
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1ml
H_3BO_3	2ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1ml
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10ml
KH_2PO_4	5ml
KCl	2ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1ml
Agua destilada	1000 ml

