

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA Y
MORFOLÓGICA DE GÉNEROS *Rhizobium sp.* Y *Bradyrhizobium sp.*
ASOCIADOS A LA LEGUMINOSA *Cajanus Cajan* EN PARCELAS
AGRÍCOLAS DEL MUNICIPIO DE SAMPUÉS, DEPARTAMENTO DE SUCRE.**

**CHARLY XAVIER CONTRERAS SOLAR
JAIME LUIS IRIARTE MARTINEZ
ARISELIS PAOLA MUÑOZ ACOSTA**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2007**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA Y MORFOLÓGICA DE GÉNEROS *Rhizobium sp.* Y *Bradyrhizobium sp.* ASOCIADOS A LA LEGUMINOSA *Cajanus Cajan* EN PARCELAS AGRÍCOLAS DEL MUNICIPIO DE SAMPUÉS, DEPARTAMENTO DE SUCRE.

Proyecto presentado como requisito para optar al título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología

**CHARLY XAVIER CONTRERAS SOLAR
JAIME LUIS IRIARTE MARTINEZ
ARISELIS PAOLA MUÑOZ ACOSTA**

**Director:
CARLOS GÓMEZ SANTÍZ
MICROBIÓLOGO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO
2007**

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo (Artículo 12 Resolución 02 de 2003)

Nota de aceptación:

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Sincelejo-Sucre, Diciembre de 2007.

DEDICATORIA

A Dios padre todo poderoso por ser la mayor fuente de humildad, fortaleza, felicidad y sabiduría en mi vida. Por permanecer a mi lado como el mejor de los amigos y por permitirme actuar con entereza.

A mis padres Mery Solar y Remberto Contreras, por ser la base de mi inspiración, refugio de amor y esperanza. Por brindarme las herramientas necesarias para mi formación integral, por ser participe de mis decisiones, por enseñarme las diferentes caras de la vida, por orientarme y corregirme cuando me he equivocado.

A mi hermana Katy Contreras Solar por ser motivo de alegría, lucha y vida. Por acompañarme en todo momento y por ser paciente frente a las dificultades.

A mi abuela Roquelina Jacinta Álvarez por su ejemplo de vida y grandes valores, y mis otros abuelos que hoy se encuentran en el reino celestial, porque desde allí me han protegido y enviado las fuerzas necesarias para luchar.

A mis tíos Miriam, Antonio, Nidia, Alcides y mis primas Erika, Lubis y Nancy por no dejar desfallecer a mi familia.

A Yasmín García Mendoza, Freddy Arroyo y Mauricio Andrés por convertirse en una segunda familia para mí, por su afecto y solidaridad ilimitada, y por demostrarme que en la vida siempre habrá alguien dispuesto a ayudarnos.

CHARLY CONTRERAS SOLAR

DEDICATORIA

A Dios por darme la sabiduría, la fuerza y la persistencia para no desfallecer y seguir adelante.

A mis padres, Rafael y Marina, por enseñarme los valores de la vida, por su amor, apoyo incondicional, comprensión y confianza. Por contar con ellos siempre.

A Everlides Martínez, mi tía, por ser una segunda madre para mí y por su ayuda durante éste proceso de formación.

A mis hermanos, primos y demás familiares y todas las personas que de una u otra forma creyeron en mí.

JAIME IRIARTE MARTÍNEZ

DEDICATORIA

A Dios padre celestial, quien ilumina mi camino y guía mis pasos día a día, por regalarme la paciencia y sabiduría necesaria para alcanzar esta meta.

A mi madre Francisca Acosta por todo su amor, sus cuidados y enseñanzas.

A mi padre Antonio Muñoz Sierra, porque con su amor dejó los cimientos para que aprendiera a valorar las cosas lindas que la vida nos regala a pesar de las adversidades.

A mis hermanos Antonio, Jaime, Yobanis, Layne, Ele y Ronaldo, por estar siempre a mi lado y colmarme de cariño. Gracias por la confianza que me han brindado. Los quiero mucho.

A mis sobrinos Brayán, Selina y Sergio, porque su presencia me ha regalado muchas alegrías.

A Francisco Herazo Solano, por su compañía, confianza, amor y apoyo incondicional que me dieron la fuerza de voluntad para culminar este proyecto.

ARISELIS MUÑOZ ACOSTA

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios nuestro señor por darnos la sabiduría necesaria para alcanzar esta meta.

A la Universidad de Sucre y al programa de Biología, por el conocimiento y formación.

A Carlos Gómez Santíz, docente de la Universidad de Sucre por su respaldo, orientación y valiosos conocimientos en el transcurso de esta investigación.

A Antonio Tovar Ortega, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A Arturo Doncell Mestra, Coordinador del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sucre, por su ilimitada colaboración, además agradecemos su amistad y apoyo en todo momento.

A Norbey Marín, por su asesoría y apoyo fundamental.

A Eduardo Hernández, docente de la Universidad de Sucre.

A las personas del municipio de Sampedro, por su colaboración en la fase de campo y amistad.

A nuestros amigos Ever García, Alfonso Betin, Jorge Osorio, Hernando Franco, Luis Berthel, Yamith Martínez, Ana Vanegas, Alex Martínez, Oscar Mario, José Pájaro, Dina y Julia, por acompañarnos en momentos de lucha.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	17
JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. ESTADO DEL ARTE	21
4.1 LEGUMINOSAS	21
4.1.1 Clasificación taxonómica	21
4.1.2 Características morfológicas del Orden <i>Leguminosae</i>	21
4.1.3 Familia <i>Leguminosae</i>	22
4.1.4 Orígenes de leguminosas	22
4.1.5 Distribución geográfica	22
4.1.6 Importancia económica	23
4.2 <i>Cajanus cajan</i>	23
4.2.1 Clasificación taxonómica	23
4.2.2 Características morfológicas de la especie	23
4.2.3 Sinónimos y nombres comunes	24
4.2.4 Origen y distribución geográfica	25
4.2.5 Composición química	25
4.2.6 Aplicaciones y siembra	25
4.3 GÉNERO <i>Rhizobium</i>	25
4.3.1 Morfología del género	26
4.3.2 Taxonomía de <i>Rhizobium</i>	27
4.4. Morfología del género <i>Bradyrhizobium</i>	28
4.4.1 Taxonomía de <i>Bradyrhizobium</i>	28
4.5 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS	29
4.6 EL NÓDULO	32
4.7 ETAPAS DE LA INFECCIÓN Y FORMACIÓN DE NÓDULOS	32
4.8 MORFOLOGÍA Y TIPOS DE NÓDULOS	35
4.9 REGULACIÓN Y FACTORES QUE AFECTAN LA NODULACIÓN	38
4.10 FISIOLOGÍA DEL NÓDULO Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO	42
4.11 OTROS COMPONENTES DE SUPERFICIE Y POLISACÁRIDOS	

DE LA BACTERIA REQUERIDOS PARA UNA SIMBIOSIS EFECTIVA	44
4.12 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN RIZOBIO – LEGUMINOSAS	45
4.13 INVESTIGACIONES RELACIONADAS	48
5. METODOLOGÍA	52
5.1 ÁREA DE MUESTREO	52
5.2 CARACTERIZACIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO	52
5.3 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	52
5.4 AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS	53
5.5 PRUEBA DIFERENCIAL DE GRAM	54
5.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	54
5.7 TEST FISIOLÓGICOS	55
5.8 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE COLONIAS, GÉNEROS BACTERIANOS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN	56
5.9 PRUEBA DE NODULACIÓN (INOCULACIÓN)	56
5.10 DISEÑO EXPERIMENTAL	58
6. RESULTADOS	59
6.1 CARACTERIZACIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO	59
6.2 SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE NODULACIONES	59
6.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	61
6.4 TEST FISIOLÓGICOS	66
6.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICAS DE COLONIAS, GÉNEROS BACTERIANOS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN	74
6.6 PRUEBA DE NODULACIÓN (INOCULACIÓN)	111
6.7 ANÁLISIS MULTIVARIADO	114
7. DISCUSIÓN	121
8. CONCLUSIONES	129
9. RECOMENDACIONES	131
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
ANEXOS	140

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características fisiológicas y bioquímicas de los géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i> .	29
Tabla 2. Genes simbióticos en <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	46
Tabla 3. Fermentación de lactosa en medio inclinado agar Kligler.	63
Tabla 4. Fermentación de lactosa en medio inclinado agar Kligler de cepas por zona	64
Tabla 5. Producción de metabolitos ácidos o alcalinos.	65
Tabla 6. Producción de metabolitos ácidos y alcalinos de cepas por zonas.	66
Tabla 7. Tolerancia a factores abióticos.	67
Tabla 8. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación a diferentes niveles de pH.	68
Tabla 9. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación a diferentes niveles de cloruro de sodio y temperatura.	69
Tabla 10. Resistencia a metales pesados (Co^{+2}).	70
Tabla 11. Utilización de compuestos específicos.	72
Tabla 12. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación en Co^{+2} y dextrosa.	73
Tabla 13. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación en lisina	73
Tabla 14. Prueba de nodulación (autenticación).	112
Tabla 15. Tipo de nodulación en cada tratamiento.	113

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Macrofotografía de la leguminosa <i>Cajanus cajan</i> .	24
Figura 2. Eventos en el proceso de nodulación	34
Figura 3. Organización de un nódulo indeterminado.	37
Figura 4. Intercambio de señales en las etapas de nodulación.	46
Figura 5. Macrofotografía del corte transversal de un nódulo de <i>Cajanus cajan</i> .	60
Figura 6. Macrofotografía de la morfología externa de un nódulo de <i>Cajanus cajan</i> .	60
Figura 7. Macrofotografía de un nódulo inviable de <i>Cajanus cajan</i> .	61
Figura 8. Crecimiento de colonias en medio MacConckey.	62
Figura 9. Macrofotografía confirmación de la fermentación de lactosa en agar Kligler.	62
Figura 10. Macrofotografía de la producción de metabolitos ácidos en el medio LMA con la adición del indicador de pH azul de bromotimol.	64
Figura 11. Macrofotografía del crecimiento de colonias en NaCl 2%.	66
Figura 12. Macrofotografía prueba de lisina.	71
Figura 13. Nodulación producida en plántulas de <i>Cajanus cajan</i> durante la prueba de inoculación.	111

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Dendograma A. Análisis de conglomerados clúster para características fisiológicas-bioquímicas de cepas aisladas.	114
Gráfica 2. Dendograma B. Análisis de conglomerados clúster para características morfológicas de cepas aisladas.	116
Gráfica 3. Dendograma C. Análisis de conglomerados clúster combinando características fisiológicas-bioquímicas y morfológicas de cepas aisladas.	118
Gráfica 4. Dendograma D. Análisis de conglomerados clúster para características cuantitativas de cepas aisladas.	119

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Mapa del departamento de Sucre, municipio de Sampedo.	141
Anexo B. Formato guía para encuestar a propietarios de parcelas agrícolas del municipio de Sampedo, departamento de Sucre.	142
Anexo C. Datos de las parcelas agrícolas seleccionadas para el estudio.	143
Anexo D. Formato guía para evaluar la morfología de los nódulos presentes en las raíces de <i>Cajanus cajan</i> .	144
Anexo E. Datos de la leguminosa empleada en la investigación.	145
Anexo F. Datos de la evaluación morfológica de nódulos.	146
Anexo G. formato guía para la determinación taxonómica de géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i> .	148
Anexo H. Análisis físico – químico de los suelos de las parcelas agrícolas en estudio del municipio de Sampedo por zonas.	149
Anexo I. Protocolo de preparación del medio de aislamiento para rizobios EL-MARC	153

RESÚMEN

La presente investigación se desarrolló durante el segundo semestre del año 2006 y el primer semestre del año 2007, en parcelas agrícolas del municipio de Sampués-Departamento de Sucre, Colombia, establecidas con la leguminosa *Cajanus cajan*, con el objetivo de aislar y caracterizar bioquímica, fisiológica y morfológicamente bacterias de géneros *Rhizobium* sp., y *Bradyrhizobium* sp., asociadas a ella. Se realizaron 37 aislamientos positivos de rizobios de los cuales 25 de ellos resultaron ser del género *Rhizobium* sp., es decir un 67.57% del total, mientras que los 12 restantes (32.43%) correspondieron al género *Bradyrhizobium* sp., en donde la zona que mayor número de aislamientos presentó fue la número 1 (Calle larga) con veintidós cepas rizobiales, mientras que la zona número 3 (Piedras blancas) fue la de menor presencia de rizobios con tan solo dos aislamientos. El análisis de correspondencias múltiples de integración permitió tomar de la salida para las características fisiológicas-bioquímicas de las cepas aisladas cinco (5) dimensiones que explican el 82% de la variabilidad de las variables de entrada y para las morfológicas cuatro (4) que explican el 97% de la variabilidad; mientras que el análisis de conglomerados (CLUSTER) con el método del vecino más cercano de acuerdo a las características fisiológicas-bioquímicas, indica la formación de cinco (5) grupos, para las morfológicas cuatro (4) grupos, para ambas conjuntamente cuatro (4) y para las cuantitativas cuatro (4).

ABSTRACT

The present research was realized during the second half of year 2006 and first half of the year 2007, in agricultural plots from municipality of Sampués-Department of Sucre, Colombia, established with the legume *Cajanus cajan*, with the objective of isolating and characterizing biochemical, physiological and morphologically bacteria genus *Rhizobium sp.*, and *Bradyrhizobium sp.* associated with it. Thirty – seven isolations positive of rizobios were realized of which twenty – five of them found to be of the genus *Rhizobium sp.*, i.e. 67.57% of the total, while the remaining twelve (32.43%) were genus *Bradyrhizobium sp.*, where the zone more isolations presented was the number one (Long Street) with twenty-two rhizobia strains, while the zone number three (Stones white) was the lesser presence of rizobios with just two isolates. The correspondence multiple analysis of integration allowed to take the exit for the physiological-biochemical characteristics of the isolates five (5) dimensions that explain 82% of the variability of input variables and for morphological four (4) that explain 97% of the variability, while the analysis of conglomerates (Cluster) with the nearest neighbor method according to the characteristics physiological-biochemical, indicating the formation of five (5) groups, for the morphological four (4) groups, for both jointly four (4), and for the quantitative four (4).

INTRODUCCIÓN

En el departamento de Sucre predomina el uso de tierras por explotación en las modalidades de arrendatarios, aparceros y colonos; siendo su principal actividad económica la ganadería doble propósito, la cual se extiende en aproximadamente un 84.9% de su territorio (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1998). No obstante, la agricultura a pesar de encontrarse por debajo del 60% con relación a la actividad ganadera, es de vital importancia para la alimentación de diferentes tipos de animales y el hombre, en donde las leguminosas constituyen gran parte de su dieta, aportando en términos de nutrición un 22% de proteínas, 32% de grasas y 7% de carbohidratos según una escala mundial (ICER, 2004).

Una de las zonas del departamento de Sucre, caracterizada por el cultivo de diversas especies de leguminosas lo constituye el municipio de Sampués, en donde predomina la agricultura de minifundio (Betthin, A.J., 1998). Dentro del grupo de las leguminosas arbustivas destacada por su producción agrícola se encuentra el Guandú o Frijol de Palo (*Cajanus cajan*), empleada en el consumo humano con usos de forraje remanente eventualmente (CIDICCO, 2004).

El nitrógeno representa el 79% del total de los gases que conforman el aire, y es fundamental para el desarrollo normal de las especies vegetales, como las leguminosas, sin embargo, estas plantas no pueden utilizarlo en forma elemental (N_2), por lo que debe ser transformado en compuestos nitrogenados inorgánicos como el amonio (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-). La limitación del nitrógeno en los suelos se refleja en muchos casos en la reducción de los rendimientos agrícolas y esta situación no es ajena a los suelos de la región Caribe colombiana, especialmente del departamento de Sucre, en donde para el primer semestre del 2004 y con

respecto al primer semestre de 2003, las áreas sembradas y cosechadas mostraron una tendencia a la disminución no solo en el total (4%), si no también en los cultivos transitorios, perennes, semiperennes y anuales (ICER, 2004).

A esta situación se suma el desgaste progresivo del suelo resultado de las propias labores agrícolas, entre ellas la remoción de la tierra, lo que provoca la pérdida de materiales superficiales por acción del agua y el viento, considerando que en la mayoría de los casos no existe una compensación de los nutrientes que salen del ecosistema. El uso de agroquímicos y la práctica de otro tipo de actividades agropecuarias que se combinan con la rotación de cultivos también promueven la erosión, compactación e infertilidad del suelo.

En los sistemas agrícolas la asociación de bacterias heterótrofas del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en estructuras nodulares de leguminosas fijadoras de nitrógeno, contribuye de manera fundamental a la fertilidad del suelo, fijándose hasta 100 Kg N₂/Ha/año., lo que reduce el uso de fertilizantes nitrogenados; sin embargo, no todos los suelos agrícolas cuentan con este tipo de bacterias, algunas de ellas requieren de leguminosas específicas para ocasionar la infección radical y permitir la fijación de nitrógeno (Frioni, 1999).

Las pocas investigaciones que se han realizado en el departamento de Sucre se han centrado en leguminosas forrajeras, y no se ha avanzado en el estudio de leguminosas arbustivas importantes en la dieta humana, como lo es *Cajanus cajan*, un cultivo que aporta gran cantidad de nitrógeno (CIDICCO, 2004). Por esta razón se planteó aislar y caracterizar bioquímica, fisiológica y morfológicamente bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* asociadas a *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués.

JUSTIFICACIÓN

Al realizar esta investigación se logra un avance en el estudio de los géneros rizobiales asociados a leguminosas aptas para el consumo humano, información que puede ser utilizada para la creación de un banco de cepas como fuente de inóculos en la fertilización de los suelos. Esto se traduce en una mayor incorporación de nitrógeno, como una forma sostenible de establecer cultivos agrícolas para compensar la salida de nutrientes del ecosistema, establecer un equilibrio ecológico y elevar los niveles de desarrollo vegetal.

En el caso de *Cajanus cajan*, la inoculación bacteriana en campo no solo permitiría recuperar suelos desgastados por las labores agrícolas, sino que también puede representar un vehículo para la asimilación de nitrógeno por parte de otros cultivos que se establecen junto a ella, incrementando así los niveles nutricionales en beneficio de la alimentación y economía de la población sucreña; además, los beneficios de esta investigación se extienden al sector ganadero, puesto que *Cajanus cajan* también es considerada como una especie con usos forrajeros, representando así una excelente alternativa en la alimentación del ganado bovino, lo cual le ofrecería un valor agregado y mayor competitividad a este tipo de animales frente a la demandas actuales de los mercados interno y externo.

El aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de los géneros *Rhizobium sp.*, y *Bradyrhizobium sp.*, se constituye en el primer paso para una serie de investigaciones que pueden involucrar no solo estudios taxonómicos, sino también moleculares en beneficio de esta región y otras zonas del país.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar bioquímica, fisiológica y morfológicamente bacterias de géneros *Rhizobium sp.*, y *Bradyrhizobium sp.*, asociadas a la leguminosa *Cajanus cajan* procedentes de parcelas agrícolas del municipio de Sampedro, departamento de Sucre.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconocer la morfología de los nódulos radicales de la leguminosa empleada en el estudio.
- Establecer cultivos puros de bacterias *Rhizobium sp.*, y *Bradyrhizobium sp.*, a partir de nódulos radicales de *Cajanus cajan*, mediante técnicas microbiológicas.
- Determinar características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas de los rizobios aislados, que permitan agruparlos en los géneros correspondientes.
- Determinar la capacidad de infección de los rizobios aislados en el laboratorio de microbiología, mediante una prueba de inoculación.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 LEGUMINOSAS

4.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Vegetal

Subreino: *Embriophyta*

División (phyllum): *Tracheophyta*

Subdivisión (subphyllum): *Pteropssida*

Clase: *Angiospermae*

Subclase: *Dicotyledoneae*

Orden: *Leguminosae* (*Leguminales*)

4.1.2 Características morfológicas del Orden *Leguminosae*: las leguminosas (*Leguminosae*, *Fabaceae*) constituyen un gran grupo de organismos vegetales, dentro de los que se destacan árboles, arbustos, hierbas y enredaderas. Existen alrededor de 18000 especies de leguminosas (Coiné, 2000; Azcarraga y Rabiza, 2001). Estas se caracterizan por tener hojas compuestas y paripinnadas o imparipinnadas; frutos en forma de “vaina” o “legumbre”, siendo generalmente dehiscente por las dos suturas. (CIAT, 1987). El tallo de las leguminosas es aéreo herbáceo o leñoso pero siempre flexible y con entrenudos alargados, condición que permite clasificar a este tipo de plantas en: “volubles”, caracterizadas por enroscarse sobre soportes u otras plantas y “con tallo endeble”, las cuales trepan por medio de zarcillos foliares o caulinares. Las flores son hermafroditas, zigomorfas, hipóginas, pentaméricas y vistosas, predominando los colores amarillo, rojo y violáceo.

El cáliz en la mayoría de las especies está compuesto de cinco sépalos que pueden ser libres o soldados en la base (disépalo), puede ser tubular, cuculiforme o infundibuliforme. El ovario es unilocular y puede ser ovoide cilíndrico o deprimido y sentado; los ovarios son aprietales e insertados en una sola hilera en la sutura ventral; las semillas pueden ser reniformes, esféricas, lenticulares, poliédricas o discoides, con superficies lisas, rugosas o estriadas; el embrión puede ser recto o curvo, con dos cotiledones opuestos, gruesos o planos; algunas presentan nódulos radicales fijadores de nitrógeno atmosférico capaces de convertirlo en otros compuestos nitrogenados disponibles para la planta (CIAT, 1987).

4.1.3 Familia *Leguminosae*: la familia *Leguminosae* es la tercera familia más grande de las plantas con flores con distribución en todo el mundo. *Leguminosae* está dividida en tres subfamilias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae*, basándose fundamentalmente en diferencias florales (Sprent, 2001). Existen cerca de 152 géneros y 2 800 especies en *Caesalpinioideae*, cerca de la misma cantidad en *Mimosoideae* y 480 géneros con 12 000 especies en *Papilionoideae* (Somasegaran y Hoben, 1994).

4.1.4 Orígenes de leguminosas: las leguminosas son originarias de los trópicos, estando relacionada la primera infección por *Rhizobium* a una leguminosa de clima templado. De igual manera se indica que la leguminosa tropical primitiva fue un árbol, y que su evolución ha sido árbol – arbusto – trepadora – leñosa – hierba perenne – hierba anual (Norris, 1956).

4.1.5 Distribución geográfica: las leguminosas se encuentran presentes en diversos ecosistemas a nivel mundial, tanto en regiones tropicales, subtropicales y templadas, excepto en la antártica; las especies dentro de la familia se extienden desde las hierbas enanas de la vegetación ártica y alpestre hasta los árboles masivos del bosque tropical, creciendo a alturas desde el nivel del mar hasta

3000 m.s.n. m, y adaptándose sin ningún problema a zonas áridas y semiáridas (Moore *et al.*, 1995; Allen y Allen, 1981).

4.1.6 Importancia económica: las leguminosas presentan una importancia particular en la alimentación humana (granos) y animal (forraje), además de ser fuente de maderas tropicales valiosas, drogas para la medicina, plantas ornamentales, resinas, al igual que en la economía del nitrógeno del suelo, ya que la mineralización de sus residuos contribuye un aporte de nitrógeno disponible (CIAT, 1987).

Con respecto a la nutrición humana, estas aportan un 22% de proteínas, 32% de grasas y aceites y 7% de carbohidratos, con relación a la nutrición animal donde el aporte de proteínas es del 38%, 16% de lípidos y 5% de carbohidratos, indispensables para un óptimo nivel de desarrollo y reproducción (FAO, 1995).

4.2 *Cajanus cajan*

4.2.1 Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Cajanus*

Especie: *cajan* (Stevens *et al.*, 2001).

4.2.2 Características morfológicas de la especie. *Cajanus cajan* es un arbusto anual o perenne, que puede llegar alcanzar de 3 – 5 metros de altura; presenta

hojas trifoliadas con foliolo elípticos, algunos en ambos extremos, con el haz de color verde oscuro y el envés de color verde claro, cubierto por una pubescencia blancuzca y fina. Las flores se presentan en racimos, las cuales son de color amarillo, con manchas rojizas o de combinación amarilla y púrpura, mientras que el sistema radicular está compuesto de una raíz pivotante y de raíces laterales, que pueden llegar a medir hasta 3 metros de profundidad (CIDICCO, 2004). Fig. 1.

Las vainas o legumbres son ligeramente aplanadas con una depresión en diagonal, que contiene de 3 – 4 semillas con forma globular algo aplanadas de aproximadamente 6 mm de diámetros.



Fig. 1. Macrofotografía de la leguminosa *Cajanus cajan*.

Fuente: Autores, 2006

4.2.3 Sinónimos y nombres comunes: *Cajanus bicolor* DC, *Cajanus Indicus* Spreng, *Cajanus flavus* DC, *Cytisus cajan* L. [basíonimo] (Duque de James A. 1983). En cuanto a nombres comunes es conocido como: guisantes de paloma, gramo rojo, guisante de congo, guisante de gungo, Dhal, gandul, quinchoncho, timbolillo, falso de café, cascabelito, cachito, catján, chícharo de paloma, frijol del combo, guisante de Angola, tur, frijol de palo, frijol caballero, y gandul (Colombia).

4.2.4 Origen y distribución geográfica: *Cajanus cajan* es originario de África occidental o de la India, ampliamente cultivada y naturalizada en los trópicos y subtropicos de ambos hemisferios (Stevens *et al.*, 2001). Es cultivada en países como Uganda, Bahamas, Brasil y Colombia (Morel, F. y G. Piccolo, 2004; Valarini, M.J., 1994); crece bien desde el nivel del mar hasta alturas de 1800 m. s. n. m., con zonas de precipitación desde 500 – 2000 mm; las temperaturas más favorables están entre 20 – 30 °C, se desarrolla más o menos bien en suelos pobres, cuyo pH esté entre 5.5 y 6.0; sin embargo su comportamiento y desarrollo es mejor cuando se siembra en suelos sueltos o francos, con buen drenaje interno y externo, y un pH superior a 6.0; resiste las sequías prolongadas siendo sensible a los vientos fuertes.

4.2.5 Composición química: respecto a los aminoácidos, 6.7% es arginina, 1.2% cisteína, 3.4% treonina, 2.2% serina, 5.0% tirosina, 5.0% valina, 9.8% ácido aspártico, 19.2% ácido glutámico, 6.4% alanina, 3.6% glicina y 4.4% Prolina; mientras que el aceite de las semillas contiene 5.7% de ácido linolénico, 51.4% de ácido linoleico, 6.3% oleico y 36.6% de ácidos grasos saturados (Valarini, M.J., 1994).

4.2.6 Aplicaciones y siembra: los granos del guandú son utilizados para el consumo humano debido a su contenido de proteína entre 18 – 25%, rica en los aminoácidos Lisina y Metionina; algunos autores catalogan el guandú como una de las especies de mayor potencial para la alimentación de cerdos y aves en propiedades de autoconsumo (Morel, F. y G. Piccolo, 2004; Morton, 1996).

4.3 GÉNERO *Rhizobium*

El género *Rhizobium*, junto con los géneros *Agrobacterium* y *Chromobacterium* forman la familia *Rhizobiaceae*; este deriva su nombre del griego “Rhiza” = raíz y “bios” = vida (Vargas, 1969). La característica más importante es su habilidad para producir nódulos en las raíces de las leguminosas, y vivir en asociación simbiótica

con estas plantas mientras fija nitrógeno libre, lo cual no ocurre cuando los organismos están separados de la planta (Vargas, 1969).

El rizobio es un habitante natural del suelo que subsiste como heterótrofo, pero no necesariamente existe en todo los suelos, también puede ser saprófito al desarrollarse en ausencia de la planta hospedante; Sin embargo, su existencia libre continuada en los suelos, depende de la presencia de una raíz “hospedante” que estimule su proliferación (Vargas, 1969; Coiné, 2000; Spaink, 2000).

Rhizobium no es el único organismo beneficioso asociado con las raíces y los nódulos, también lo son los actinomicetos del género *Frankia* y otros, capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en árboles y en arbustos de climas templados. El *Rhizobium* al estar en la planta es capaz de cambiar a una forma bacteroidal en los tejidos nodulares, lo cual también puede ocurrir en condiciones adversas en medios de cultivo (Vargas, 1969).

Algunas veces los rizobios pueden ser estimulados por leguminosas no hospedantes y aún por plantas no leguminosas. Para ejercer el estímulo sobre los bacterios, las plantas no leguminosas requieren estar firmemente adheridos a la superficie de la raíz, en cambio en las leguminosas la superficie radical parece estar relativamente libre de rizobios y el estímulo lo ejerce la raíz a distancia de 10-20 mm. (Davey y cols, 1973).

La mayor parte de los rizobios están en la capa de suelo de 0 – 1 pulgada y sólo algunos están presente en la capa de 1-4 pulgadas y en los horizontes más profundos (Beadle, 1998; Burdman *et al.*, 1998; Arrese *et al.*, 1999; Spaink *et al.*, 1998).

4.3.1 Morfología del género *Rhizobium*: estos rizobios son bacilos Gram negativos que miden entre 0.5-1.0 μm de ancho por 1.3-3.0 μm de largo; contiene

granos de poli-B –hidroxiburato, y se desplazan por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares (Aguilar, M. O., O. Riva, y E. Pelser., 2004); los organismos peritricos tienen de 2-5 flagelos dispersos en la célula con uno de ellos comúnmente subpolar.

Al parecer se han encontrado ocasionalmente en ciertas leguminosas silvestres y de jardín formas gran positivas semejantes al género *Bacillus*, que producen “swarmes” cocoides (formas muy pequeñas móviles de los bacterios) y endosporas resistentes (Vargas, 1969).

Las colonias son semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden de 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en el medio Agar – Levadura – Manitol (Y.M.A). El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacárido extracelular; son quimio-organotróficas, pues utilizan una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía; algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento; las cepas de este género son bacterias de rápido crecimiento y productoras de ácido en Y.M.A (Spaink, 2000; Mayea *et al.*, 1998; Martínez - Viera, 1986; Coiné, 2000; Elka, 1992; Vargas, 1969).

4.3.2 Taxonomía de *Rhizobium*: hay 13 especies definidas, *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. tropici* y *R. yanglingense*. Estas especies nodulan diferentes especies de leguminosas en zonas templadas o tropicales. Forman un grupo polifilético en el árbol filogenético; *R. giardinii* es una rama distantemente relacionada con las otras especies; *R. galegae*, *R. huautlense* y *R. loessense* forman una subrama que tiene una relación más cercana con las especies de *Agrobacterium* que con otras especies de *Rhizobium*; el resto de las especies y *Agrobacterium rhizogenes* forman un grupo.

Las especies de *Rhizobium* tienen tres copias de los genes ribosomales y los plásmidos simbióticos son comunes en ellas; sin embargo, el plásmido simbiótico (o parte de él, incluyendo genes simbióticos) puede integrarse en el cromosoma.

4.4 MORFOLOGÍA DEL GÉNERO *Bradyrhizobium*

Estas bacterias son bacilos de 0.5-0.9 μm por 1.2-3.0 μm ., desplazándose con un flagelo polar o subpolar; este género consiste de cepas de lento crecimiento, productoras de álcali, crecen en colonias circulares hasta 1 mm., de diámetro opacas y raramente translúcidas, blancas, convexas y con tendencia a tener textura granulosa (Wang, T. y J. Martínez, 2007); se desarrollan durante 5 – 10 días de incubación.

4.4.1 Taxonomía de *Bradyrhizobium*: han sido descritas cuatro especies dentro este género con base en el análisis polifásico incluyendo caracterización fenotípica, hibridación de ADN-ADN, polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de genes de 16S rRNA amplificados por PCR, nodulación con plantas selectivas y otros métodos.

A excepción de *B. yuanmingense*, otras tres especies en este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soya (*Glycine max*); *B. yuanmingense* nodula a *Lespedeza cuneata*, pero no a la soya (Wang, T. y J. Martínez, 2007); *B. japonicum* tiene un amplio rango de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas, algunas cepas fijan nitrógeno en vida libre bajo ciertas circunstancias; *B. elkanii* se distingue de *B. japonicum* por diferencias en sus secuencias de ADN, en los patrones de enzimas metabólicas y de exopolisacáridos, en su contenido de ácidos grasos y hemoproteínas al igual que por diferencias en sus patrones de resistencia a antibióticos, siendo el tiempo de generación de estas dos especies de 8 horas o más (Wang, T. y J. Martínez, 2007). (Tabla 1).

Tabla 1. Características fisiológicas y bioquímicas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Características	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
Crecimiento en EL-MARC Tiempo de generación.	Rápido	Lento
Crecimiento en ácidos orgánicos	+	+
Crecimiento con ramosa	+	-
Crecimiento con 2% NaCl (0.0025%)	Algunas cepas de <i>R. meliloti</i>	-
Alta afinidad por fosfato	+	+

(+): crecimiento (-): no crecimiento
Fuente: Frioni, 1999

4.5 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS.

El proceso de aislamiento de rizobios de los nódulos incluye varios pasos para separarlos de los contaminantes presentes; además, es necesaria una serie de pruebas para caracterizar y autenticar los rizobios aislados; una vez autenticados, se puede evaluar su efectividad potencial: capacidad de fijar N₂ con leguminosas en condiciones óptimas (CIAT, 1987).

El aislamiento del rizobio se inicia esterilizando la superficie del nódulo, macerándolo y estriándolo. En cultivos in vitro, los rizobios por lo general pueden ser fácilmente suplementados con levaduras y una fuente de carbohidratos como el manitol, y compuestos nitrogenados y cantidades menores de Magnesio (CIAT, 1987; Allen y Allen, 1958).

El medio de cultivo comúnmente utilizado para el aislamiento de rizobios es el EL-MARC (Extracto de Levadura, Manitol, agar, rojo congo), que además contiene fosfato dipotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y carbonato de calcio.

El extracto de levadura le proporciona a las bacterias productos de degradación de las proteínas, sustratos para la respiración vitaminas y ciertos elementos; el manitol funciona como fuente de carbono, mientras que el rojo congo ayuda a diferenciar los rizobios de otras bacterias; en general las colonias de rizobios presentan tensión débil con este colorante, en tanto que las colonias de muchas otras bacterias adquieren un color más intenso; sin embargo esta no es una característica definitiva ya que su expresión varía con la concentración de reactivos, la edad del cultivo, la exposición de la caja a la luz y no es lo suficientemente selectivo. La temperatura óptima de crecimiento de rizobios en condiciones artificiales es de 25°C y su tolerancia al pH entra de 5 a 8. (CIAT, 1987; Allen y Allen, 1958).

La purificación de cepas de rizobios incluye el desarrollo de pruebas bioquímicas como la fermentación de lactosa en medio de cultivo Agar, McConkey y Agar Kligler (KIA).

Agar McConkey: es un medio selectivo por contener sales biliares y cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias no entéricas; es también un medio diferencial, porque contiene lactosa y un indicador de pH. Las bacterias capaces de fermentar este azúcar producirán un cambio en el pH del medio por la liberación de productos ácidos, como consecuencia sus colonias aparecerán de color violeta, contrastando con la coloración amarillenta de las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa.

Agar Kligler (KIA): éste medio diferencial complejo (de color rojo) es muy útil, ya que demuestra varias características enzimáticas de la bacteria. Está compuesto principalmente por dos azúcares en distinta proporción (glucosa al 0.1% y lactosa al 1%), tiosulfato sódico, citrato férrico y rojo fenol.

a) Fermentación de glucosa: viraje a color amarillo en el fondo del tubo inclinado; si la bacteria fermenta sólo la glucosa, en la superficie del tubo inclinado la utilizará por vía respiratoria, y, donde la tensión de oxígeno disminuya lo suficiente, empleará una pequeña proporción por vía fermentativa. Esto generará una pequeña cantidad de ácidos que serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas; como resultado el medio mantendrá su color rojo en la superficie al no haber cambio de pH; por el contrario, las bacterias crecidas en la profundidad del tubo inclinado desde el primer momento tomarán la glucosa por vía fermentativa, generando ácidos que no serán neutralizados, provocándose un descenso de pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo.

b) Fermentación de la lactosa: viraje a color amarillo en la superficie del tubo inclinado. Si la bacteria, fermenta la lactosa, los ácidos producidos modifican el pH de la superficie del medio; en este caso las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa.

c) No fermentación de los azúcares: el tubo inclinado no cambia de color. Si la bacteria es aerobia estricta (no fermentadora), el medio permanece de color rojo; En este caso, los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO_2 , que se elimina y no modifica el pH.

d) Producción de gases en la fermentación: aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo (enzima hidrogenoliasa fórmica).

e) Producción de ácido sulfhídrico: aparición de un precipitado color negro en el fondo del tubo. Algunas bacterias respiradoras anoxibiónticas son capaces de emplear el tiosulfato sódico como aceptor final de electrones de la transportadora.

Como consecuencia, este compuesto se reduce a ácido sulfhídrico que a su vez reacciona con el hierro Fe^{2+} presente en el medio, formando un precipitado negro de sulfuro de hierro; los iones Fe^{2+} proceden de los Fe^{3+} del citrato férrico y aparecen debido a los cambios en los potenciales redox producidos al someter al autoclave al medio de cultivo.

f) Degradación de las peptonas (aeróbica o anaeróbicamente): origina un proceso de descarboxilación que produce amoníaco, produciendo el viraje del indicador a un rojo intenso.

4.6 EL NÓDULO

Son las estructuras especializadas donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno que algunas familias de angiospermas han desarrollado, principalmente en el córtex radicular posterior a la preinfección e infección por bacterias diazotróficas. La formación de nódulos está controlada por fitohormonas: citoquininas, auxinas, giberelinas producidas por rizobios y por el huésped (Vicent, 1982). El exterior del nódulo puede ser liso, esculpido, estriado o costroso, algunas veces tienen el color de la raíz vecina o está brillantemente coloreado con pigmentos verdes o pardos, enmascarando el color de la hemoglobina del interior.

4.7 ETAPAS DE LA INFECCIÓN Y FORMACIÓN DE NÓDULOS

Según Coiné (2000) y Sherman *et al* (1991), la etapa de infección involucra los siguientes pasos:

1. Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y la adherencia de la bacteria a los pelos radiculares.
2. Invasión del pelo radical y formación de un canal o hilo de infección.

3. Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través de un canal de infección.

4. Diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo al que se les llama bacteroides dentro de las células de la planta y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.

5. Proceso continuado de división de las células bacterianas y vegetal y formación del nódulo radical maduro.

El proceso en detalle incluye: en primer lugar las plantas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, y en respuesta a ellos dichas bacterias activan una serie de genes implicados en la nodulación (Nod); posteriormente, ocurre la adherencia de la bacteria a la planta hospedadora.

En la superficie del rizobio se localiza una proteína específica de adherencia (la ricadesina), la cual se une al calcio y puede actuar captando complejos de este átomo en la superficie de los pelos radiculares. Otras sustancias como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria, siendo identificada en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células de rizobio. Después de la unión, los pelos radicales se enroscan, debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria conocidas como factores Nod; algunos pelos radicales se enroscan hasta 360° formando una estructura a la que se llama “cayado de pastor”, la bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce a la formación por parte de la planta de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección que avanza por el pelo radical; este canal es un tubo vacío en el que se multiplican los rizobios, quedando embebidos y formando de esta manera una matriz zoogleal (Redondo, M. *et al.*, 2007); luego la infección alcanza a las células de la raíz adyacente a los pelos radicales, y los factores Nod estimulan la división de las células vegetales corticales, dando origen al nódulo;

los rizobios son liberados en las células corticales, por un mecanismo similar al de endocitosis y rodeados por una membrana producida por la planta llamada Membrana Peribacteroidal (MPB), por la cual los rizobios quedan separados del citoplasma. Cuando la división celular culmina las bacterias cambian de forma a unas estructuras hinchadas y deformes (bacteroides o rizobios pleomórficos), los cuales quedan rodeados individualmente o en pequeños grupos por la MPB.

Los bacteroides pueden llegar a ser hasta cuarenta veces más grande que los bacilos a partir de los que se desarrollan con un número aproximado de 10.000 bacteroides por célula radical; el sistema vascular de las plantas se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. En algunos casos, las formas bacteroidales no tienen capacidad de infección, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia; estas formas proliferan en el suelo, utilizando productos del nódulo destruido para iniciar la infección en otra raíz. (Nutmán, 1956). (fig. 2).

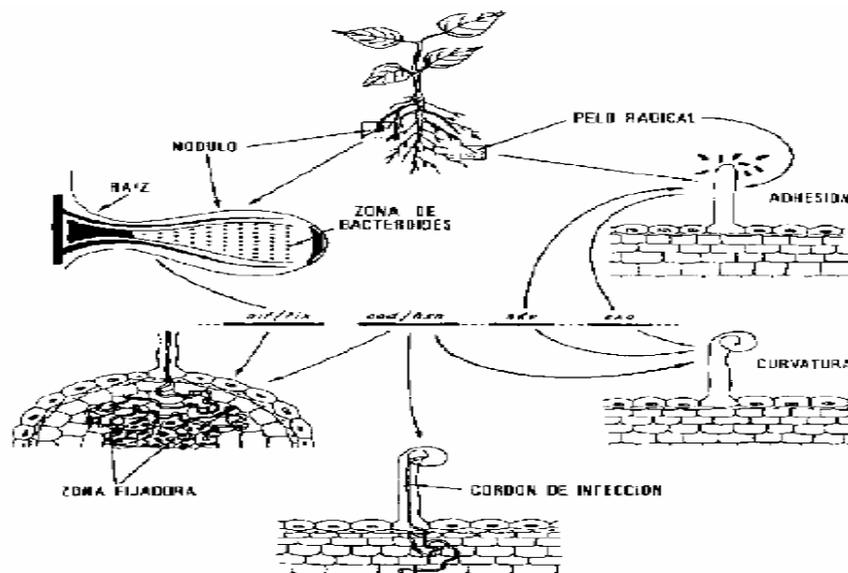


Fig. 2. Eventos en el proceso de nodulación

Fuente: Frioni, 1999.

4.8 MORFOLOGÍA Y TIPOS DE NÓDULOS

Según Redondo, M. *et al* (2007), los nódulos radicales de las leguminosas se clasifican de acuerdo al lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz, dependiendo la morfología del tamaño y forma del meristemo y de la tendencia a la bifurcación. Así, si las divisiones mitóticas que se originan en el córtex interno desarrollan nódulos indeterminados, y si lo hacen en el cortex externo se forman nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos, también difieren en la forma en que comporta la bacteria dentro de dicha estructura; a pesar de ello, la inducción del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación. Los dos tipos de nódulos se forman en las raíces de las leguminosas, de acuerdo con la disposición del meristemo su tamaño es variable, oscilando entre 0,5 mm y 2 cm.

Desarrollo del nódulo indeterminado: los nódulos indeterminados se dan en plantas como las del género *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*; en este tipo de nódulos son las células del córtex interno las que se reintroducen en el ciclo celular; además, tienen la característica de poseer un meristemo permanente, lo que les otorga una forma cilíndrica con simetría radical en la organización de los tejidos; así, en la zona más exterior se encuentran la endodermis y el parénquima, en donde también aparecen los haces vasculares, todo ello recubre una zona central en donde los rizobios se albergan y realizan la fijación de nitrógeno.

Se ha comprobado que en plantas desarrolladas bajo deficiencia de nitrógeno, a las pocas horas de la inoculación se induce la actividad mitótica en las células del córtex interno, debido a la acción de los factores Nod (Frioni, 1999). Las primeras divisiones se producen en el plano anticlinal originando el primordio del nódulo. Desde el inicio se establece una polaridad en el primordio; así se mantiene la actividad meristemática en el ápice, causando un crecimiento en el primordio hacia el exterior, mientras que las capas celulares inferiores se van diferenciando (Foucher F. y Kondorossi E., citado por Redondo, M. *et al.*, 2007).

El canal de infección nunca atraviesa células en división, sino que progresa a través de los puentes citoplasmáticos de la célula que han quedado bloqueados en fase G₂ (Foucher F. y Kondorossi E., citado por Redondo, M. *et al.*, 2007); los canales de infección culminan en gotas de infección, de un tamaño que oscila entre los 10-25 µm de diámetro, en células diferenciadas de la región subyacente al meristemo nodular, en las que el ciclo celular está bloqueado. Dichas células, por un proceso de endocitosis, van captando rizobios del canal de infección, los cuales alcanzan el ambiente endofítico rodeadas por una membrana de origen vegetal que recibe el nombre de membrana peribacteroidea, dando lugar a un nuevo orgánulo conocido como simbiosoma (Brewin N. J., Citado por Redondo, M. *et al.*, 2007); el proceso de invasión y diferenciación define unas regiones dentro del nódulo indeterminado (Hirsch A. M., 1992):

- 1) **Zona I o meristemática:** en el ápice del nódulo, corresponde a la zona de células en proliferación.
- 2) **Zona II o de invasión:** encontrada inmediatamente por debajo de la zona meristemática, es la región en la que se produce la invasión bacteriana a través de los canales de infección; las células de esta región son más grandes y vacuoladas que las meristemáticas; los rizobios en esta zona aún poseen una forma cilíndrica y pueden dividirse (para la diferenciación se les denomina bacteroides tipo 1).
- 3) **Zona de prefijación:** en esta región, las células vegetales que aún no han finalizado su diferenciación están llenas de bacteroides tipo 2 más alargadas que los de tipo 1.
- 4) **Interzona II y III:** en esta franja, las células vegetales finalizan su proceso; las células de esta región presentan numerosos amiloplastos, así como transcritos de leghemoglobina; además, se pueden encontrar bacteroides de tipo 3, los cuales presentan su tamaño final definido, así como una heterogeneidad citoplasmática característica.

5) **Zona III o de fijación:** región totalmente diferenciada en la que se realiza la fijación de nitrógeno propiamente dicha; se subdivide en dos regiones: la zona de fijación y la zona de ineficiente. En la primera, las gotas de infección han culminado su proceso de diferenciación, resultando en la formación del simbiosoma, compuesto por la membrana vegetal original, modificada en su composición y un bacteroide de tipo 4 con una estructura normalmente en forma de “Y” o de “T”, y con una heterogeneidad citoplasmática notable, indicativa de su maduración en forma fijadora de nitrógeno. Por otro lado, las células vegetales no presentan tantos amiloplastos, por que posiblemente hayan sido consumidos durante la actividad fijadora de N₂.

6) **La zona ineficiente:** está compuesta por células con bacteroides de tipo 5, que presentan un citoplasma homogéneo que indica el inicio de la senescencia.

7) **Zona IV o de senescencia:** región en la base del nódulo, comprendida por células vegetales y bacterianas en degradación, y que se incrementa con la edad del mismo. (Fig. 3).

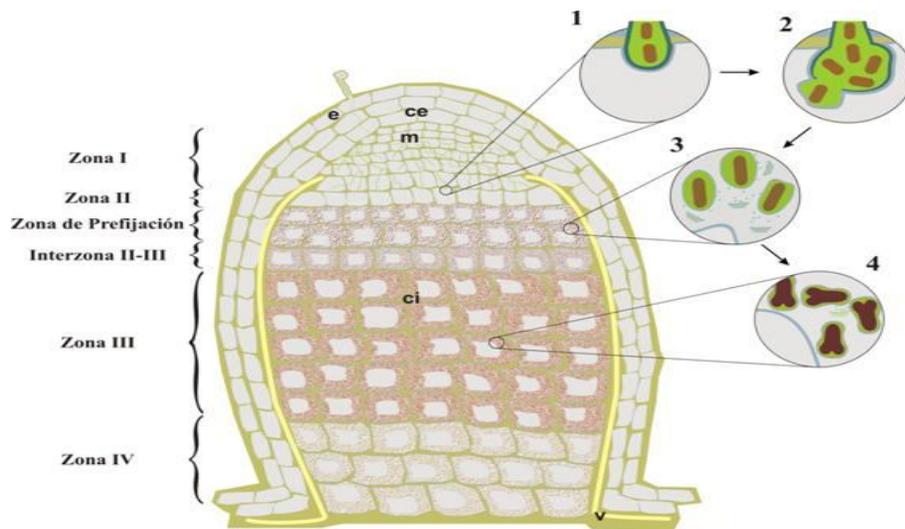


Fig. 3. **Organización de un nódulo indeterminado:** e: epidermis; ce: córTEX externo; m: meristemo; ci: córTEX interno; v: tejido vascular; 1-2: formación de la gota de infección y gemación de las bacterias; 3: proceso de diferenciación del simbiosoma; 4: simbiosomas maduros.

Fuente: Frioni, 1999.

Desarrollo del nódulo determinado: este tipo de nódulos es inducido en plantas como la de los géneros *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*, entre otras. A diferencia de los indeterminados, en esta clase de nódulos no hay meristemo permanente; así, su crecimiento se basa en la expansión en vez de en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica (Hirsch A. M., 1992). Se ha comprobado que las primeras divisiones celulares en respuesta a la presencia de los rizobios son anticlinales y se producen en la hipodermis (Frioni, 1999); posteriormente, se genera otro foco de división celular en el periciclo; estos dos meristemos convergen generando el primordio nodular, en el cual se encuentran células no vacuoladas procedente de las divisiones de la hipodermis conformando el tejido central del nódulo, y células con un elevado grado de vascularización procedente de las divisiones en el periciclo, componiendo el parénquima nodular que rodea al tejido central. Gran parte de la actividad mitótica en la región central del nódulo se pierde transcurridos 12-18 días tras la inoculación, algunas células de este tejido central son invadidas a través de los canales de infección, siendo identificadas por su tamaño y densidad, debido a la elevada presencia de simbiosomas en su interior, que presentan más de un bacteroide.

En el parénquima se encuentran varias capas de células separadas por espacios intercelulares y con un contenido de proteínas ricas en Prolina en su pared, que pueden contribuir a limitar la difusión del oxígeno al tejido central (Newcomb E. H. Citado por Redondo, M. *et al.*, 2007).

4.9 REGULACIÓN Y FACTORES QUE AFECTAN LA NODULACIÓN

Luque *et al* (1999) plantea que la nodulación de las leguminosas es un proceso regulado por factores internos (autorregulación) y externos (fundamentalmente de nitratos) y se ha sugerido la existencia de algún componente común compartido por ambos tipos de regulación de la nodulación. Experimentos realizados por estos autores, apoyan al etileno endógeno como posible candidato mediador en el

control de la formación de nódulos y en la inhibición por nitratos. Caba *et al* (2001), señala que el etileno exógeno es un potente inhibidor de la nodulación pero la raíz inoculada y sobre todo los nódulos, producen significativamente más etileno que la raíz no inoculada, siendo ese etileno de origen vegetal. El nitrato del suelo, por un mecanismo aún desconocido, es un efectivo inhibidor de la nodulación de las leguminosas.

Rizobios y leguminosa, su asociación y funcionalidad, son afectados positiva o negativamente por las condiciones ambientales durante su ciclo de vida (Fernández, C. M, 2003). No es posible separar los factores que afectan específicamente a la nodulación, de aquellos que son necesario para el desarrollo normal de la planta, salvo para el suministro de nitrógeno; en términos generales, puede anticiparse una buena nodulación bajo condiciones favorables para el crecimiento de la planta (Vargas, 1969).

Temperatura: los rizobios son organismos mesófilos, pero están sin embargo distribuidos en todas regiones del mundo; en general, *R. meliloti* es la especie más tolerante a temperaturas elevadas, *R. leguminosarus* lo es menos y los rizobios de leguminosas tropicales soportan amplios rangos de temperatura (Frioni, 1999).

Con menos de 7°C la nodulación se hace muy poco probable; en el caso extremo de altas temperaturas, se reduce el número de raíces laterales y pelos radicales, haciendo que la probabilidad de nodulación sea menor; a temperaturas extremas tiene lugar una degradación de los nódulos (Pérez y Torralba, 1997). Según Fernández C. (2003) temperaturas bajas retardan el desarrollo de la planta, la formación de nódulos y consecuentemente, disminuyen las tasas de fijación de Nitrógeno. Siquiera y Franco (1988) señalan que para las leguminosas tropicales, temperaturas diurnas de 25 a 32°C son óptimas para la nodulación. El funcionamiento de la simbiosis y el crecimiento de las plantas, con variaciones entre especies Masfield (1958).

Humedad: el nivel de agua debe ser tal que no origine problemas de presión osmótica en las células; en regiones tropicales con estaciones secas, el número de rizobios en las capas superficiales del suelo disminuye rápidamente. La disminución del potencial hídrico del suelo limita también el transporte de los productos de la fijación a la planta, y altas humedades limitan la FBN (Frioni, 1999). El crecimiento máximo y la máxima nodulación de las leguminosas se produce por lo general en suelos con contenido de agua de 75 al 85% de su capacidad de retención de agua (Sherman *et al*, 1991; Fernández, C. 2003).

Nitrógeno: las plantas absorben el nitrógeno en forma de nitratos o amonio; esta obtención de nitrógeno es energéticamente menos costosa para la planta que el proceso simbiótico. Por lo tanto, el exceso de nitrógeno especialmente en forma de nitratos, tiene un efecto inhibitorio sobre la simbiosis en todos los pasos, desde la infección, formación de nódulos y la fijación de N_2 . Los niveles bajos de nitrógeno en los primeros estadios vegetativos en los que todavía los nódulos no son funcionales pueden ser benéficos. Sin embargo, a medida que el nitrógeno proveniente del suelo o del fertilizante aumenta, el nitrógeno derivado de la fijación biológica y la nodulación disminuyen (Fernández, C. 2003).

Tañer y Anderson (1963) explicaron el efecto específico de los iones nitratos en la infección, por el hecho de que los rizobios son capaces de reducir los nitratos a nitritos, y el nitrito, catalíticamente destruye el ácido indolil-3-acético. La reducción menor del AIA, producida en presencia de iones amonio, es debida a la reducción de la cantidad de triptófano disponible.

Fósforo y potasio: la simbiosis rizobio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo; el fósforo forma parte de las moléculas de ATP, que son las responsables de la liberación e intercambio de la energía, también es indispensable para la fijación biológica de nitrógeno por la alta energía que este proceso consume (16 moléculas de ATP/ N_2 fijado). Para que sea posible la nodulación y fijación de N_2 , es necesario un aporte adecuado de fósforo, cuando

la concentración de P en la planta es inferior al 0.2% la nodulación y la fijación de nitrógeno son casi despreciables (Fernández, C. 2003; Schreven, 1958; Pérez y Torralba, 1997).

pH, Calcio, Magnesio, Molibdeno y Magnesio: la acidez del suelo afecta todos los aspectos de la simbiosis, desde la supervivencia y multiplicación de los rizobios en el suelo, la infección y nodulación hasta la fijación del N₂ (Fernández, C., 2003). El crecimiento y la nodulación son satisfactorios en pH 5.4 a pH 8.0, pues la acidez afecta a la simbiosis ya sea directamente por el pH que tienen que soportar ambos simbioses, como indirectamente al generar toxicidades o deficiencias de nutrientes (Fernández, C. 2003).

El calcio es un elemento que se requiere en alto nivel en leguminosas noduladas, si el nivel es bajo se inhibe el encurvamiento de los pelos y la nodulación (Frioni, 1999). Andrew y Norris (1961) encontraron pruebas de que la formación de nódulos es sensible al calcio tanto en las especies de zonas tropicales como en las zonas templada; se descubrió que la principal necesidad del *Rhizobium* era el magnesio, antes que el calcio, pues la escasez de cationes divalentes (Ca Mg) conduce a pérdidas marcadas de viabilidad (Mayea *et al*, 1998).

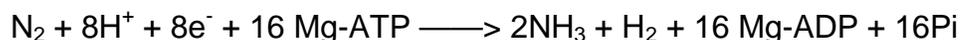
El molibdeno es un elemento clave en la nitrogenasa, responsable de la transferencia de electrones de la reductasa de la nitrogenasa hacia N₂ (Frioni, 1999). Se reconoció el efecto estimulante de este elemento en la fijación del nitrógeno observándose una marcada disminución en el rendimiento de las plantas deficiente en molibdeno (Frioni, 1999).

Los altos niveles de magnesio causan un descenso en el número y el volumen de los nódulos. El calcio, sin embargo reduce los efectos adversos del magnesio y los altos niveles de fósforo tienden a incrementar la absorción del manganeso (Sherman *et al*; 1991).

Luz y carbohidratos: la luz afecta la nodulación a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo (Pérez, y Torralba, 1997); la mala nodulación está asociada con la baja intensidad de luz y los días cortos del invierno. Debido a que estos factores retardan la fotosíntesis, reducen la fracción de carbohidratos en la planta; sin embargo, las ratas excesivamente altas o bajas de carbohidratos solubles con relación a los compuestos nitrogenados solubles son perjudiciales para la nodulación de las leguminosas (Frioni, 1999).

4.10 FISIOLÓGÍA DEL NÓDULO Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biósfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno se lleva a cabo en los bacteroides que se encuentran en el citoplasma de las células del nódulo. La enzima nitrogenasa cataliza la reacción:



(Wang, T. y J. Martínez, 2007).

La nitrogenasa es una proteína de gran tamaño que consta de dos componentes: la proteína homodimérica que contiene hierro (Fe) y molibdeno (Mo), codificada por los genes *nifD* y *nifK*; la nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, incluyendo la capacidad de reducir acetileno, nitrógeno (N_2), y la sensibilidad al oxígeno (O_2) (Navelka *et al.*, 1998), razón por la cual los organismos fijadores de nitrógeno son aeróbicos o han desarrollado adaptaciones específicas para

proveerse de oxígeno, a la vez que protegen a la enzima del oxígeno libre (CIAT, 1987).

La liberación de hidrógeno (H_2) reduce la eficiencia de la nitrogenasa y en parte, explica la gran demanda de energía para sostener su actividad (CIAT, 1987). En algunas especies de rhizobio existe una hidrogenasa codificada por los genes *hup*, que es capaz de reducir el hidrógeno formado por nitrogenasa, que resulta en un uso más eficiente de la energía, es por ello que se han impulsado la transferencia de los genes *hup* a todas las cepas de rizobios para la inoculación en el campo (Navelka *et al.*, 1998).

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación de nitrógeno; los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos, succínico, málico y fumárico, utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y tras su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción del N_2 . En la fijación del nitrógeno el primer producto estable que se obtiene es el amonio, las plantas sintetizan otros aminoácidos y amidas como la asparagina y la 4-metilglutamina, los ureidos alantoína y ácido alantoico y luego son transportados a los tejidos vegetales (Madigan *et al.*, 1999; Coiné, 2000).

Durante el proceso de simbiosis la planta expresa proteínas específicas del nódulo a los que se les llama nodulinas; entre ellas, la leghemoglobina que se localiza en el citosol de las células de la planta infectada por bacteroides, es la que le da el típico color rosado ó rojo de los nódulos funcionales, y tiene como función aportar oxígeno a los bacteroides y proteger a la nitrogenasa de los altos niveles de oxígeno y evitar la inactivación de esta enzima (Madigan *et al.*, 1999)

4.11 OTROS COMPONENTES DE SUPERFICIE Y POLISACÁRIDOS DE LA BACTERIA REQUERIDOS PARA UNA SIMBIOSIS EFECTIVA

Los factores nod juegan un importante papel en la inducción de las primeras etapas de nodulación, sin embargo otros requerimientos son necesarios para la formación de nódulos simbióticamente efectivos. En la formación y elongación del canal de infección durante estados más tardíos del proceso, así como en la liberación de bacterias en el citoplasma de las células infectadas se requieren contribuyentes de superficie de los rizobios; los polisacáridos que han sido estudiados con relación a su función en simbiosis son: exopolisacáridos (EPSs), lipopolisacáridos (LPSs), antígenos de tipo K (KPSS) y glucanos cíclicos. En muchos casos los mutantes presentan diferentes fenotipos simbióticos dependiendo de la pareja planta – rizobio o un mismo mutante presenta fenotipos dependiendo de la planta (Bécquer y Pühler, 1998).

Las cepas silvestres de rizobio forman colonias muy mucosas en los medios de laboratorio y suelen producir grandes cantidades de exopolisacáridos (EPSs); se han elucidado las estructuras de los EPSs producidos por más de 20 cepas de rizobios. En *R. meliloti* 1021 se han identificado dos tipos de EPS llamados como EPSs I (succinoglucano) y EPS II (galactoglucano); en ambos casos, se distingue una fracción de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular, los genes para la biosíntesis de EPS I (exo y exs) como para EPS II (epx) están ubicados en el megaplásmido b, por lo que también se le llama pExo (González y Reuhs, 1996; Battisti y Lelgh, 1992).

Como otras bacterias Gram-negativas, los rizobios producen una monocapa de lipopolisacárido que se proyecta hacia el exterior. La estructura del LPS se divide en tres partes: lípido A, núcleo oligosacárido y antígeno O. El lípido A consiste en un oligosacárido al que se le unen ácidos grasos y es la parte hidrofóbica que ancla toda la molécula en la membrana externa. Existen muchos ejemplos

mutantes de rizobios que carecen de antígeno O y son defectivos en el proceso de infección (Spaink, 2000).

4.12 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN RIZOBIO – LEGUMINOSA

La iniciación y formación de los nódulos son el resultado de interacciones simultáneas de los genes de la planta y de las bacterias, pues los rizobios producen gran variedad de moléculas biológicamente activas que afectan la infección y desarrollo del nódulo (Redondo, M., *et al.*, 2007).

El primer evento de interacción lo provee la planta, pues los rhizobios son capaces de notar la presencia de la raíz de la leguminosa gracias a moléculas de bajo peso molecular secretadas por la raíz; sin embargo, las leguminosas secretan flavonoides específicos para atraer a determinados rhizobios. En respuesta a la señal de la planta, los rhizobios responden sintetizando otras señales específicas, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora; los genes de los rhizobios implicados en la síntesis de los factores Nod son los genes nod (nodulación). Más de 30 genes nod han sido identificados y secuenciados; en el género rhizobium, los genes nod están localizados en plásmidos simbióticos o Sym, mientras que en el género Bradyrhizobium estos se localizan en el cromosoma.

Los genes nod a excepción de nod D, no se expresen sino encuentran la señal inductora adecuada de la planta. Los genes nod D están estrechamente ligados a los genes nod comunes, poseen una función regulatoria; sus productos interactúan con señales moleculares vegetales (flavonoides e isoflavonoides) y activan la transcripción de otros genes nod inducibles. Los genes nod ABC codifican proteínas que determinan factores extracelulares que causan deformación de los pelos y división de células corticales de la raíz.

Los operones de los genes nod están precedidos por un promotor que contiene una secuencia consenso, denominada caja de nodulación o caja nod, la cual es

reconocida por la proteína Nod D, quien activa la transcripción de los genes de la nodulación mediante su unión a las cajas nod, plegando el DNA a esta región (Spaink, 1998; López *et al.*, 1995).

Los genes nod (tabla 2), están generalmente agrupados en plásmidos o en una región del cromosoma. Dichos plásmidos se llaman simbióticos o Spym, llegando a ser tan grandes como un tercio del total del cromosoma. En cepas de rhizobium el tamaño del Psym es menor “200-600 kb” (Madigan *et al.*, 1999). (Fig. 4)

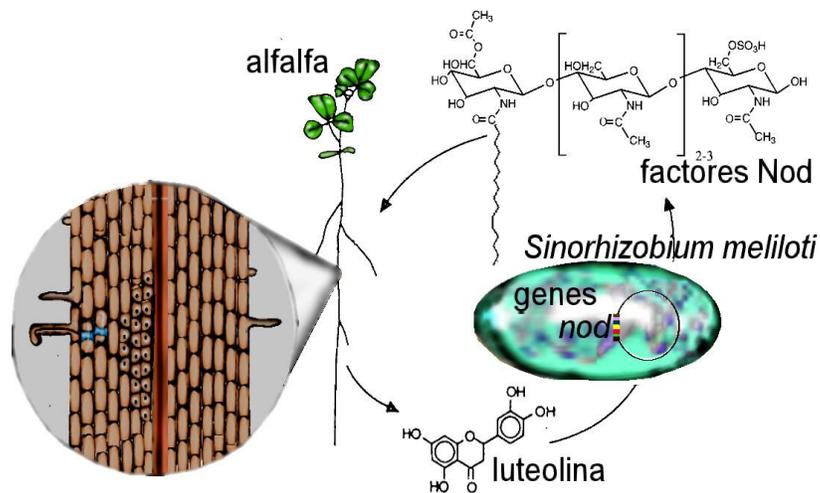


Fig. 4. Intercambio de señales en las etapas de nodulación.

Fuente: Redondo M., *et al.*, 2007.

Tabla 2. Genes simbióticos en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Gen	Concepto	Función
Hac	Encurvamiento	Encurvamiento de pelos capilares
Nod	Nodulación	Eventos en desarrollo de nódulos.
Hsn	específico del hospedante	Determinación de especificidad del hospedante dentro del grupo de infección.
Efn	eficiencia de la nodulación	Genes adicionales para la nodulación.

Ndv	desarrollo nódulos	Regulación del desarrollo del nódulo, ejemplos: glucanos cíclicos.
Exop	Polisacáridos extracel.	Reg. de infección y liberación de bacteroides.
Nif	fijación de N ₂	Involucrados en FBN homólogos a los de <i>klebsiella</i> .
Fix	Fijación	Genes adicionales involucrados en FBN en estado simbiótico (sin homología con los nif de <i>klebsiella</i>).
Dct	Transporte ácidos Dicarboxílicos	Transborde de ac. De COOOH-como sustratos para la FBN en bacteroides.

Fuente: Frioni, 1999.

hsn host specific nodulation: son los loci requeridos para la nodulación de una planta específica en diferentes géneros de leguminosas; cuando un locus de nodulación de un organismo donador es transferido a una cepa recipiente apropiada, inhabilita a nodular la planta huésped del donador, el gen es considerado hsn.

GSN (genotype – sspecific nodulation): se refiere a genes que permiten la nodulación de genotipos específicos de plantas dentro de una especie de leguminosa dada; a pesar de que muchos de los mismos genes de nodulación han sido encontrados en especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum*, 3 diferencias separan a esas bacterias:

- a) En *B. Japonicum* los genes de nodulación no se localizan en plásmidos, sino que se distribuyen en el cromosoma.
- b) Los genes estructurales nif Dk y H están físicamente separados por una distancia relativamente grande de los genes nod.

c) En el caso de rizobios CR las sustancias que incluyen los genes, pertenecen a la clase conocida como flavonoides, flavonas y flavanonas. En *B. Japonicum* las principales sustancias inductoras son isoflavonas (Frioni, 1999).

Los genes **nif**: se refieren a la secuencia genética que están específicamente involucrados en el proceso de FBN, y que se correlacionan estructural y funcionalmente con diazotrofos de vida libre.

Los genes **Fix**: Los genes fix, junto con otros genes involucrados en la FBN son referidos colectivamente como genes Sym, que incluyen a los necesario para las interacciones iniciales con la planta (reconocimiento, encurvamiento, formación del cordón de infección, y la formación y mantenimiento de los nódulos radicales o tallos (nod, nol, GSN y hsn), (Frioni, 1999).

4.13 INVESTIGACIONES RELACIONADAS

En Colombia en el laboratorio de fitopatología del centro de investigaciones del café (CENICAFE) y la Universidad de Caldas, Salazar, M., *et al.*, desarrollaron la caracterización de la bacteria nitrificante del Sirubio (*Phitecelobium lanceolatum* BENTH), utilizando el medio de aislamiento Levadura-Manitol-Agar (LMA) a pH de 6.8, con el indicador Azul de Bromotimol e incubación a 28°C durante 10 días. EL aislamiento de la cepa bacteriana presentó las características descritas para el género *Rhizobium*; la reacción de Gram clasificó a la bacteria como Gram-negativa, y se observó un crecimiento rápido de colonias a los tres días de incubación (Salazar, M., *et al.*, 2001).

En otra investigación se estudió la diversidad de 36 especies de rizobios aislados de *Phaseolus lunatus* en la Costa central del Perú, utilizando el medio de cultivo LMA con el indicador rojo congo, agrupándolos según sus características morfológicas y fisiológicas, velocidad de crecimiento y producción de acidez o

alcalinidad. Se encontró que el 25% de los aislamientos presentaron características del género *Bradyrhizobium* y el 75% las del género *Rhizobium*. También observaron una gran diversidad en la apariencia de las colonias y crecimiento a diferentes niveles de pH y temperatura (Matos *et al*, 2001).

En el trabajo "Aislamiento y caracterización fenotípica de especies de rizobios procedentes del cultivo de Soya (*Glycine Max (L) Merrill*), del Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias de la Habana, Cuba se aislaron 16 posibles cepas de rizobios, los cuales resultaron ser bacilos cortos Gram-negativos motiles que no formaban esporas; la reacción de la mayoría de ellos fue alcalina, y se encontró un crecimiento óptimo de las cepas a una temperatura de 28°C y pH de 6.8 en el medio de cultivo LMA con el indicador rojo congo (García, D., I. Reinaldo., J. Torres, y A. Hernández, 2004).

En otra investigación se reportó la caracterización fisiológica-bioquímica de especies de rizobios aislados en leguminosas forrajeras nativas de la provincia Sancti Spiritus, Cuba. En este caso se efectuó la identificación de 40 cepas de rizobios, para lo cual se aplicaron técnicas modernas en la evaluación de la morfología, crecimiento en diferentes medios de cultivo y resistencia a varios rangos de pH Y temperatura. En general se detectaron cepas de lento y muy lento crecimiento, y la producción de álcali y ácido estuvo en dependencia a los grupos encontrados. Ninguna de las cepas pudo crecer a niveles extremos de temperatura y pH. (Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto, 2000).

En el Estado de Tamaulipas, México se caracterizaron bromatológica y rizobiológicamente leguminosas silvestres procedentes de la reserva de la biosfera "el cielo", utilizando los medios de cultivos Extracto de Levadura –Manitol-Agar-Rojo congo (EL-MARC), Y ELMA-Azul de Bromotimol. Se identificó la Cepa 4, aislada de las raíces de *Desmodium tortuosum* y la Cepa 6, aislada a partir de *Desmodium sp.* En ambos casos las colonias fueron incoloras, redondas y

convexas de 0.5-1.0 mm de diámetro respectivamente, formadas por bacilos Gram-negativos y producción de acidez en ELMA-AB (De la Graza-Requena, 2006).

Pazos, *et al* (2000), estableció que la asociación de bacterias fijadoras de nitrógeno es favorable, y entre estas se encuentran otras especies como las de *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

En otra investigación se caracterizaron fenotípicamente aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia sp*) y Retamo (*Teline monpessulana*), logrando obtener 20 aislamientos nativos de *Acacia decurrens* (DQ6-01 a DQ6-29) y 15 aislamientos de Retamo (DQ7-01 a DQ7-15). De acuerdo a los resultados se encontró que existe una gran diversidad de las cepas que nodulan *A. Decurrens* y *Teline monpessulana*, y sus características fenotípicas son independientes del sitio geográfico del cual provienen. También se concluyó que el 83.4% de los aislamientos correspondían al género *Rhizobium*, mientras que el 16.6% al género *Bradyrhizobium* (Alarcón, P.E., A. Lozano, y H. Chaparro, 1997).

Kivanç (2006) en Turquía, obtuvo treinta aislamientos procedentes de nódulos de haba (*Phaseolus vulgaris L.*), determinando su comportamiento fisiológico y bioquímico. La mayoría de los aislantes produjeron polisacáridos extracelulares abundantes, alta tolerancia a concentraciones de NaCl 5%, crecimiento a temperaturas extremas (42 °C), y a pHs que se extendían a partir del 3.5 - 9.0.

En el Instituto de Investigación Agropecuaria “Jorge Dimitrov”, Granma, Cuba. López, S. *et al.*, (2007), realizaron el aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* de leguminosas pretenses en suelos afectados por la salinidad a partir de nódulos, según la metodología propuesta por la FAO (1995). El medio de aislamiento fue Levadura – Manitol – Agar (LMA), con una temperatura de incubación de 28°C durante 7 días para la determinación de la

velocidad de crecimiento. De las once leguminosas a las cuales se les recolectaron nódulos, se lograron aislar cepas de *Rhizobium* a ocho, donde las colonias resultaron ser de rápido crecimiento; apariencia gelatinosa – acuosa; textura cremosa – elástica y forma plana – redondeada.

Nuevas publicaciones acerca de la fijación simbiótica de nitrógeno establecen que este proceso ocurre no sólo por la utilización del amoníaco excretado por las plantas, sino también a que las bacterias producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas), las cuales afectan favorablemente el desarrollo de las plantas (Rodríguez, S., 2002).

En el laboratorio de microbiología de la Universidad de Sucre se identificaron morfotipos nativos del género *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* sw, establecida en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento de Sucre, Colombia. Se realizaron 28 aislamientos, de los cuales 14 resultaron ser del género *Rhizobium*, es decir un 50% del total. Con respecto a las características de las nodulaciones, se encontraron formas redondeadas con coloraciones internas rojas, verdes, oscuro y blanco; y externas café claro y café oscuro; un N° de nódulos por raíz en niveles de medio a alto, y una amplia distribución en las raíces (Grisales, T.V. y J.E. Fuentes., 2005).

Nogueira *et al.*, (2007), aislaron y caracterizaron poblaciones nativas de rizobios de una región semi – árida de Pernambuco, Brasil. Los aislamientos fueron cultivados en medio Levadura – Manitol – Agar (LMA) para evaluar características de las colonias como: producción de acidez o alcalinidad, velocidad de crecimiento, color, tamaño y transparencia, presentándose nueve aislamientos de cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*.

5. METODOLOGÍA

5.1 ÁREA DE MUESTREO

Fueron seleccionadas 21 parcelas agrícolas (unidades experimentales), establecidas con el cultivo de la leguminosa *Cajanus cajan* en el municipio de Sampués, departamento de Sucre, distribuidas en tres zonas del lugar equitativamente (bloques experimentales): zona 1 (cabecera municipal: Calle Larga); zona 2 (corregimiento de Achote) y zona 3 (corregimiento de Piedras Blancas). (**Anexo A**).

5.2 CARACTERIZACIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO

Se evaluaron parámetros como: topografía y drenaje de las parcelas en estudio, mediante observación directa y la realización de una encuesta a sus propietarios. (**Anexo B**).

5.3 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un muestreo representativo en cada parcela agrícola seleccionada. Para completar la muestra total de cada parcela, se tomaron un total de 15 – 20 submuestras conjuntas de la leguminosas de interés y de suelo al azar, siguiendo un modelo en zig – zag, a una profundidad de 0 a 20 cm. Se seleccionaron plantas vigorosas de 2 meses de edad, sin indicios de ataques de plagas o presencia de enfermedades (Álvarez, et al., 1997). Se tomaron muestras de suelo para elaborar un análisis físico-químico en el laboratorio de suelos de la Universidad de Sucre, evaluando las siguientes propiedades: físicas (texturas, según método de

Bouyoucos,); químicas (pH, según método agua 1:1 p/v; % de materia orgánica; % de nitrógeno total; fósforo (ppm), según Bray II, y potasio disponibles en meq. /100 g suelo.

5.4 AISLAMIENTO DE LOS RIZOBIOS

a) Selección y análisis de nodulaciones

Las plantas fueron sumergidas en agua durante tres días para retirar la tierra adherida a las raíces. Posteriormente se realizó un análisis de las nodulaciones radicales con la ayuda de un estereoscopio, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: tamaño de nódulos, cantidad, distribución y color tanto externo como interno. Finalmente, se eligieron nódulos de buen tamaño y libres de heridas. **(Anexo D)**.

b) Desinfección de nódulos

Esta se realizó según metodología sugerida por Somasegaran y Hoben (1994); los nódulos fueron sumergidos en alcohol al 70 % durante un minuto e hipoclorito de sodio al 2% por cuatro minutos, finalmente se realizaron siete lavados diferentes de nódulos con agua destilada con el fin de eliminar las trazas de hipoclorito de sodio, y evitar de esta manera la contaminación por cualquier tipo de microorganismos diferentes a los géneros bacterianos de interés

c) Preparación del medio de aislamiento

Se preparó el medio de cultivo Extracto de levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (EL-MARC) según la técnica propuesta por Vicent (1975); Se distribuyó en cajas petri en una proporción de 20-25 ml, las cuales se esterilizaron en autoclave por 15

minutos a 120 grados centígrados y 15 libras de presión, con un número de réplicas de tres (3) por muestra. Anexo I.

d) Siembra

Los nódulos seleccionados previamente fueron macerados con un micro pistilo dentro de tubos ependoff conteniendo agua estéril, del que fueron extraídos 100-200 microlitros de la solución de macerado, los cuales se depositaron en cajas petri con el medio EL-MAR y se esparcieron con una barra de vidrio estéril; posteriormente se incubó a una temperatura de 28 grados centígrados de un máximo de 10-12 días, realizando repiques sucesivos de colonias típicas de los géneros en estudio hasta conseguir cultivos axénicos, pero esta vez en medio sólido LMA (Extracto de Levadura-Manitol-Agar, empleando los mismos componentes y preparación para EL-MARC sin la adición de sin Rojo Congo).

5.5 PRUEBA DIFERENCIAL DE GRAM

Con un asa bacteriológica flameada se tomó un cultivo puro de rhizobios, extendiéndola sobre una lámina portaobjetos con la adición de suero fisiológico y se fijó moderadamente sobre la llama del mechero; se cubrió con cristal violeta durante un minuto, se lavó con agua destilada y se adicionó solución de yodo esperando que actuara en el mismo lapso de tiempo anterior, se realizó un segundo lavado decolorizando con alcohol-acetona al 95 % durante treinta segundos, se tiñó con safranina y se lavó por tercera vez; finalmente se observó al microscopio.

5.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Crecimiento de colonias en medio McConckey: Las muestras bacterianas procedentes de las colonias utilizadas en la prueba diferencial, fueron replicadas superficialmente por estrías paralelas en medio McConckey

específico para determinar el crecimiento de bacterias Gram (-) y colocadas a incubación durante 48 horas a 28 °C. Se seleccionaron aquellas colonias bacterianas que no fueron capaces de fermentar el azúcar lactosa (lac⁻) con coloraciones amarillentas, mientras que las colonias que presentaron color violeta fueron descartadas (The Nitragin Company, 1990).

b) Confirmación de la fermentación de lactosa: se realizó la prueba en medio inclinado Agar Kligler en tubos de ensayo, para lo cual se tomaron muestras bacterianas procedentes de las colonias lac⁻ que crecieron en medio Mac Conkey, realizando la siembra con un asa bacteriológica en profundidad y superficie, seleccionando finalmente a aquellas que no generaron un cambio en el color rojo del medio.

c) Producción de metabolitos: cada una de las muestras bacterianas seleccionadas como presuntivas de rizobios, fueron replicadas por estrías paralelas sobre el medio LMA, contenido en tubos de ensayo con la adición de azul bromotimol como indicador de pH (concentración 5.0 mg/l; pH 6.8), y colocadas en incubación durante 48 horas a 28 °C. Según el viraje de este indicador las cepas productoras de acidez (color amarillo del medio) se calificaron como *Rhizobium*; mientras que las cepas productoras de alcalinidad (color azul del medio) como *Bradyrhizobium* (Beck *et al.*, 1993).

5.7 TEST FISIOLÓGICOS

a) Tolerancia a factores abióticos: las cepas fueron evaluadas respecto a su habilidad para crecer en el medio EL-MARC bajo diferentes niveles de pH (4.0; 4.5; 5.0; 6.8; 9.0 y 10), e independientemente NaCl (1.0% y 2.0%) a 28 °C, así como temperaturas extremas (5.0; 28; 37 y 40°C), determinando en cada caso: sin crecimiento (-), escaso crecimiento (+-) y buen crecimiento (+), comparado

con el obtenido en condiciones normales (NaCl 0.01%, pH 6.8 y 28 °C), (Bequer, J. C; D. Presvost, y A. Prieto, 2000).

b) Resistencia a Co^{+2} (metales pesados): se adicionó este metal en forma de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a razón de 40 mg/ml de medio EL-MARC, evaluando el crecimiento de colonias bacterianas según: desarrollo (+) o sin desarrollo (-), (Tong, 1994).

c) Utilización de compuestos específicos: el medio EL-MARC según el propósito de evaluación le fueron adicionados los siguientes sustratos: carbohidratos (dextrosa y manitol 10.0 g/l), aminoácidos (lisina 0.5 g/l), siguiendo los parámetros normales de incubación para los rizobios (Becker, J., D. Presvot, y A. Prieto, 2000).

5.8 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE COLONIAS, GÉNEROS BACTERIANOS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN

Las colonias rizobiales se clasificaron de acuerdo a: diámetro, color, borde, elevación y consistencia, calificando de rápido crecimiento aquellas colonias formadas durante los 2 a 5 días de incubación, y de lento crecimiento aquellas que aparecieron en el medio de cultivo durante 5 a 7 días (Wang, T., y J. Martínez, 2007). (**Anexo G**). Las cepas bacterianas clasificadas como rizobios, fueron nombradas empleando en primer lugar una letra **P** mayúscula, seguido del número de la parcela agrícola de origen con sus letras iniciales (CL: Calle Larga, A: achote, PB: Piedras Blancas) y, por último la utilización de un número que indica el orden de aislamiento de la muestra bacteriana dentro del laboratorio (algunas fueron descartadas durante el proceso de selección).

5.9 PRUEBA DE NODULACIÓN (INOCULACIÓN)

a) Etapa de desinfección y esterilización del material biológico: semillas de *Cajanus cajan* en buen estado, las sumergidas en alcohol (etanol) al 70%

durante un (1) minuto e hipoclorito de sodio durante cuatro (4) minutos, realizando siete lavados consecutivos con agua destilada para retirar las trazas de las sustancias utilizadas. Como sustrato se emplearon muestras de suelo procedentes del sitio de estudio, esterilizada en autoclave por 15 minutos a 120 grados centígrados y 15 libras de presión, con el propósito de eliminar las formas de vida microbiana presentes.

b) Preparación del inóculo: se tomaron cultivos puros de cada una de las cepas rhizobios identificadas en el estudio procedentes de colonias jóvenes (48 horas), para preparar diluciones 10^{-4} células/ml en agua peptonada respectivamente.

c) Inoculación: las muestras de suelo estériles fueron depositadas dentro de bolsas plásticas limpias de acuerdo a las cepas de interés. En cada bolsa se depositó un número máximo de tres semillas, sobre las que posteriormente se adicionaron alícuotas del inóculo en cantidad de 1.0 ml. (las replicas fueron dos en cada caso). Para asegurar la eficiencia de la prueba se repitió este último paso, pero esta vez las cepas bacterianas procedían de tubos de ensayo con agar nutritivo sin realizar ningún tipo de dilución

Se realizaron por duplicados controles (-) en tierra estéril sin muestras bacterianas y, controles (+) empleando el sustrato sin esterilizar (CIAT, 1988).

d) Germinación y desarrollo de las plántulas: las bolsas plásticas fueron mantenidas en un espacio limpio y cerrado de una vivienda para evitar al máximo el grado de contaminación, con fotoperiodo de 12 horas diarias con una fuente de luz blanca (CIAT, 1988). El riego se realizó en condiciones asépticas con agua destilada cada 20 horas en cantidades de 10 ml

aproximadamente. 60 días después de la inoculación se evaluó la nodulación positiva (+) o negativa (-), según cada caso y el color interno de los nódulos (Matos, *et al.*, 2001).

e) Evaluación de la nodulación: se establecieron cuatro intervalos de clasificación: nodulación nula (N.N), nodulación baja (N.B), nodulación media (N.M) y nodulación alta (N.A), teniendo en cuenta el mayor número de nódulos/raíz presentado.

5.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleo el programa estadístico SAS versión 9.0, realizando en primer lugar un análisis descriptivo de frecuencias para identificar la distribución de las variables evaluadas en cada zona; posteriormente un análisis de varianza que permitió observar si el parte de nodulación mostraba diferencia estadística entre cada zona de estudio y, finalmente un análisis multivariado, en donde se tomaron las características fisiológicas- bioquímicas y morfológicas de las cepas aisladas que presentaron variabilidad en la respuesta, para elaborar un análisis de correspondencias múltiples y determinar la forma como se integran conjuntamente.

Los resultados del análisis de correspondencias múltiples, permitió elaborar un análisis de conglomerados (CLÚSTER) con el método del vecino más cercano, para las características fisiológicas- bioquímicas, morfológicas y cuantitativas de las cepas aisladas.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO

En el municipio de Sampués se muestrearon 21 parcelas agrícolas establecidas con la leguminosa *Cajanus cajan*. De acuerdo a los resultados del análisis físico-químico de los suelos se encontró que presentan un rango de pH de fuertemente ácido a casi neutro; un contenido de materia orgánica de deficiente a moderado, siendo más baja en la parcela 7 (1.30%) y más alta en la parcela 2 (2.87%) ambas de la zona 1; una cantidad de Fósforo y Potasio de muy alto a alto; % Nitrógeno entre deficiente a medio, siendo más alta en la parcela 2 (0.1435%) y más baja en la parcela 7 (0.0652%) ambas de la zona 1, mientras que la textura es franco arcillosa en su gran mayoría y arcillosa. (**Anexo H**).

Según los resultados de las encuestas realizadas dieciocho de las parcelas muestreadas presentan una topografía plana (85.71%) y las tres restantes ondulada (14.29%), la mayor parte de las cuales presentan suelos bien drenados y algunos pocos con tendencia a encharcarse durante el período de lluvias, siendo los pastos más ampliamente presentes los de tipo Quicuyo y Faragua y otras especies vegetales sembradas como: frijol, caraota, habichuela, maíz, yuca, ñame, ají, limón, papaya ; solo en una de las parcelas agrícolas se aplicaba agroquímicos como: OLVA y Gramoson. (**Anexos C**).

6.2 SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE NODULACIONES

El 57.14% de los nódulos evaluados presentaron forma esférica, el 28.57% forma ramificada, el 9.52% forma alargada y el 4.76% forma lobular. De acuerdo a la coloración externa en su mayoría era parecida a la de la raíz vecina (café

claro: 85.71%) y otros café oscuro (14.89%). La coloración interna varió de un color rojo a rosado claro (fig.5) otros de color verde y unos pocos de color oscuro.



Fig. 5. Macrofotografía del corte transversal de un nódulo de *Cajanus cajan*. Se evidencia la coloración interna rojiza producto del buen estado de la leghemoglobina, como muestra de su viabilidad para la fijación biológica del nitrógeno.

Fuente: Autores, 2006.

El 66.66% de los nódulos presentaron superficie lisa y el 33.33% superficie costrosa (fig.6).



Fig. 6. Macrofotografía de la morfología externa de un nódulo de *Cajanus cajan*. Se evidencia la superficie lisa del mismo.

Fuente: Autores, 2006.

En cuanto al número de nódulos se registraron valores de bajo a medio en un rango promedio de 7-35 nódulos/raíz; el tamaño de las nodulaciones mostró un

rango de 1-5 mm y un diámetro promedio de 0.5-2.5 mm con distribución en la raíz lateral (95.24%) y en la raíz principal (4.76%). (**Anexos E y F**). Durante el transcurso de la investigación también fueron detectados algunos nódulos inviábiles (fig. 7).



Fig. 7. Macrofotografía de un nódulo inviábile de *Cajanus cajan*. Se evidencia el mal estado de este, lo que indica que ha ocurrido una liberación de los bacteroides.

Fuente: Autores, 2006.

6.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Crecimiento en medio MacConckey: de 68 posibles cepas de rizobios aisladas inicialmente en el medio EL-MARC, sólo 44 de ellas (64.70%) presentaron colonias amarillas o beige en el medio MacConckey (no fermentadoras de lactosa), mientras que el resto desarrolló colonias violetas (fermentadoras de lactosa) por lo que fueron descartadas (fig. 8.).

Las bacterias capaces de fermentar el azúcar lactosa produjeron un cambio en el pH del medio por la liberación de productos ácidos, generando colonias violetas.

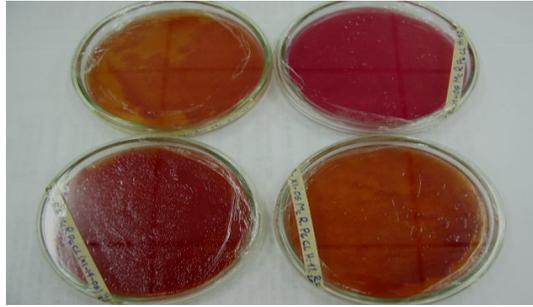


Fig. 8. Crecimiento de colonias en medio MacConkey. Se evidencia que aquellas cepas capaces de fermentar el azúcar lactosa (Lac+) crecen con una coloración morada, mientras que aquellas incapaces de hacerlo son de color beige, blanco o amarillo.

Fuente: Autores, 2006.

b) Confirmación de la fermentación de lactosa: de 44 cepas bacterianas no fermentadoras de lactosa en medio MacConkey, 37 de ellas (84.10%) no generaron un cambio de color en el medio inclinado agar kligler, mientras que las 7 restantes (15.90%) presentaron un cambio de color de rojo a amarillo tanto en el fondo como en la superficie del medio inclinado (fig. 9). (Tabla 3 y 4).

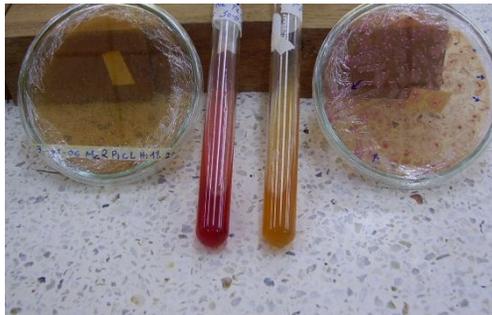


Fig. 9. Macrofotografía confirmación de la fermentación de lactosa en agar Kligler.

Fuente: Autores, 2006.

Tabla 3. Fermentación de lactosa en medio inclinado agar Kligler.

Cepa	Fermentación de lactosa
P2CL1	Lac-
P6CL2	Lac-
P1CL3	Lac-
P6CL4	Lac-
P6CL5	Lac-
P6CL6	Lac-
P6CL7	Lac-
P6CL8	Lac-
P2CL9	Lac-
P5CL10	Lac-
P1A12	Lac-
P7CL13	Lac+
P7CL14	Lac-
P3A15	Lac-
P6CL16	Lac-
P1A17	Lac-
P7CL18	Lac-
P6CL19	Lac-
P6CL20	Lac-
P6CL21	Lac-
P6CL22	Lac-
P1CL23	Lac-
P6CL24	Lac-
P5PB25	Lac-
P6PB26	Lac-
P1PB27	Lac-
P2A28	Lac+
P7A29	Lac+
P7A30	Lac+
P7A31	Lac-
P5A32	Lac-
P5A33	Lac-
P4A34	Lac-
P4A35	Lac-
P4A36	Lac-
P5A37	Lac-
P5A38	Lac+
P5A39	Lac+
P3A40	Lac-
P3A41	Lac-
P1A42	Lac-
P6CL43a	Lac-
P6CL43b	Lac-
P1CL44	Lac-

Lac- : no fermentadora de lactosa

Lac+: fermentadora de lactosa

Tabla 4. Fermentación de lactosa en medio inclinado agar Kligler de cepas por zona.

Fermentación	Zona			
	Achiote	Calle Larga	Piedras Blanca	Total
No fermenta	72.2%	95.7%	100.0%	86.4%
Si fermenta	27.8%	4.3%	.0%	13.6%
Total	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

c) Producción de metabolitos: de las 37 cepas bacterianas Lac- (catalogadas presuntamente como rhizobios), 25 de ellas (67.57%) acidificaron el medio de cultivo LMA conteniendo el indicador de pH azul de bromotimol, mientras que las 12 restantes (32.43%) lo alcalinizaron (fig. 10). (Tabla 5 y 6)

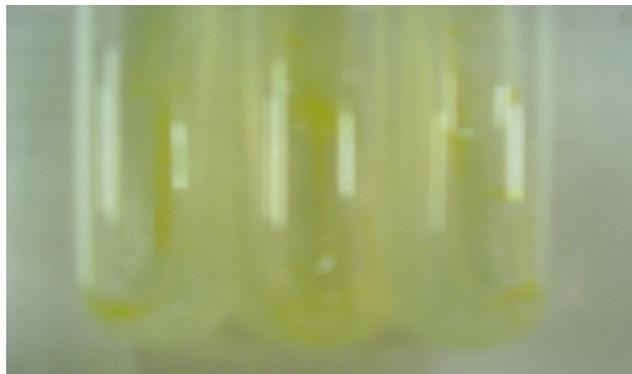


Fig.10. Producción de metabolitos ácidos (amarillo característico)

Fuente: Autores, 2006.

Tabla 5. Producción de metabolitos ácidos o alcalinos.

Cepa	Acidez	Alcalinidad
P2CL1	+	
P6CL2	+	
P1CL3		+
P6CL4		+
P6CL5	+	
P6CL6	+	
P6CL7		+
P6CL8		+
P2CL9	+	
P5CL10	+	
P1A12		+
P7CL14	+	
P3A15	+	
P6CL16		+
P1A17	+	
P7CL18	+	
P6CL19	+	
P6CL20	+	
P6CL21	+	
P6CL22	+	
P1CL23	+	
P6CL24	+	
P5PB25	+	
P6PB26	+	
P1PB27	+	
P7A30	+	
P7A31		+
P5A32		+
P5A33	+	
P4A34		+
P4A35		+
P4A36	+	
P5A37	+	
P3A40		+
P3A41	+	
P6CL43a		+
P6CL43b	+	

La acidez o alcalinidad se muestra como positiva (+) según la reacción presentada

Tabla 6. Producción de metabolitos ácidos y alcalinos de cepas por zona

Metabolitos	Zona			
	Achiote	Calle Larga	Piedras Blancas	Total
Ácidos	53.8	81.0	33.3	67.6
Alcalinos	46.2	19.0	66.7	32.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

6.4 TEST FISIOLÓGICOS

a) Tolerancia a factores abióticos: a niveles extremos de pH (4.0 y 10.0) en medio EL-MARC ninguna de las cepas logró crecer (0%), a pH 4.5; 5.0 y 9.0, diecisiete (45.9%), diez (27.02%) y catorce (37.83%) de las cepas respectivamente no lograron crecer, mientras que veinte, veintisiete y veintitrés respectivamente presentaron escaso crecimiento; a pH 6.8 todas las cepas mostraron buen crecimiento.

En NaCl 1% nueve de las cepas (24.32%) presentaron buen crecimiento, diecinueve (51.35%) escaso crecimiento y nueve (24.32%) no lograron crecer , mientras que en NaCl 2% cinco (13.51%) mostraron buen crecimiento, diecinueve (51.35%) escaso crecimiento y trece (35.14%) no crecieron (fig. 11).



Fig. 11. Macrofotografía del crecimiento de colonias en NaCl 2%.

Fuente: Autores, 2007.

Con respecto al desarrollo en diferentes temperaturas ninguna de las cepas logró crecer a 5°C Y 40°C, a 28°C todas presentaron buen crecimiento, mientras que a 37°C nueve de ellas (24.32%) mostraron escaso crecimiento y las veintiocho restantes (75.68%) no lograron crecer (tablas 7, 8 y 9)

Tabla 7. Tolerancia a factores abióticos.

Cepa	pH						NaCl		Temperatura °C			
	4.0	4.5	5.0	6.8	9.0	10.0	1%	2%	5	28	37	40
P2CL1	-	-	-	+	+-	-	-	+	-	+	-	-
P6CL2	-	+-	+-	+	+-	-	+	+	-	+	-	-
P1CL3	-	-	-	+	-	-	+-	-	-	+	-	-
P6CL4	-	-	-	+	-	-	+-	-	-	+	-	-
P6CL5	-	+-	+-	+	+-	-	+	+-	-	+	+-	-
P6CL6	-	-	+-	+	+-	-	+	+-	-	+	-	-
P6CL7	-	+-	+-	+	+-	-	+	+-	-	+	-	-
P6CL8	-	-	+-	+	-	-	+-	-	-	+	+-	-
P2CL9	-	-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P5CL10	-	-	+-	+	+-	-	-	+-	-	+	-	-
P1A12	-	-	+-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
P7CL14	-	-	-	+	+-	-	-	+	-	+	-	-
P3A15	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
P6CL16	-	+-	+-	+	-	-	+	-	-	+	+-	-
P1A17	-	-	-	+	-	-	+-	-	-	+	-	-
P7CL18	-	-	-	+	-	-	+-	+	-	+	+-	-
P6CL19	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P6CL20	-	+-	+-	+	-	-	+-	-	-	+	+-	-
P6CL21	-	+-	+-	+	+-	-	+	+-	-	+	-	-
P6CL22	-	+-	+-	+	+-	-	+	+-	-	+	+-	-
P1CL23	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P6CL24	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	+-	-
P5PB25	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	+-	-
P6PB26	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P1PB27	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
P7A30	-	+-	+-	+	-	-	+-	-	-	+	+-	-
P7A31	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P5A32	-	+-	+-	+	-	-	+-	-	-	+	-	-
P5A33	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
P4A34	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-

P4A35	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P4A36	-	-	+-	+	+-	-	-	+-	-	+	-	-
P5A37	-	+-	+-	+	+-	-	+	+	-	+	-	-
P3A40	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P3A41	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
P6CL43a	-	+-	+-	+	+-	-	+-	+-	-	+	-	-
P6CL43b	-	-	+-	+	+-	-	-	+-	-	+	-	-

(-): sin crecimiento (0 colonias)

(+-): escaso crecimiento (1-60 colonias)

(+): Buen crecimiento (más de 60 colonias)

El número máximo de colonias no superó las 110.

Tabla 8. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación a diferentes niveles de pH.

Zona	Crecimiento (%)	pH					
		4.0	4.5	5.0	8.0	9.0	10.0
Achiote	Ninguno	100.0	46.2	30.8	.0	53.8	100.0
	Escaso	.0	53.8	69.2	.0	46.2	.0
	Bueno	.0	.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Calle Larga	Ninguno	100.0	47.6	23.8	.0	28.6	100.0
	Escaso	.0	52.4	76.2	.0	71.4	.0
	Bueno	.0	.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Piedras Blancas	Ninguno	100.0	33.3	33.3	.0	33.3	100.0
	Escaso	.0	66.7	66.7	.0	66.7	.0
	Bueno	.0	.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Total	Ninguno	100.0	45.9	27.0	.0	37.8	100.0
	Escaso	.0	54.1	73.0	.0	62.2	.0
	Bueno	.0	.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Tabla 9. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación a diferentes niveles de NaCl y temperatura

Zona	Crecimiento	NaCl (%)		Temperatura °C			
		1	2	1	28	37	40
Achiote	Ninguno	30.8	53.8	100.0	.0	92.3	100.0
	Escaso	53.8	38.5	.0	.0	7.7	.0
	Bueno	15.4	7.7	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Calle Larga	Ninguno	19.0	23.8	100.0	.0	66.7	100.0
	Escaso	47.6	57.1	.0	.0	33.3	.0
	Bueno	33.3	19.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Piedra Blanca	Ninguno	33.3	33.3	100.0	.0	66.7	100.0
	Escaso	66.7	66.7	.0	.0	33.3	.0
	Bueno	.0	.0	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Total	Ninguno	24.3	35.1	100.0	.0	75.7	100.0
	Escaso	51.4	51.4	.0	.0	24.3	.0
	Bueno	24.3	13.5	.0	100.0	.0	.0
	Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

b) Resistencia a Co^{+2} (metales pesados)

Treinta de las cepas (81.08%) no lograron crecer en medio EL-MARC conteniendo $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (40 mg/ml), mientras que siete de ellas (18.92%) presentaron escaso crecimiento. (Tabla 10).

Tabla 10. Resistencia a metales pesados (Co⁺²).

Cepa	Co⁺² (40 mg/ml)
P2CL1	-
P6CL2	-
P1CL3	+-
P6CL4	-
P6CL5	-
P6CL6	-
P6CL7	+-
P6CL8	-
P2CL9	-
P5CL10	-
P1A12	+-
P7CL14	-
P3A15	-
P6CL16	+-
P1A17	-
P7CL18	-
P6CL19	-
P6CL20	-
P6CL21	+-
P6CL22	-
P1CL23	-
P6CL24	-
P5PB25	-
P6PB26	-
P1PB27	-
P7A30	-
P7A31	-
P5A32	-
P5A33	-
P4A34	+-
P4A35	-
P4A36	-
P5A37	-
P3A40	-
P3A41	-
P6CL43a	+-
P6CL43b	-

(-): sin crecimiento (0 colonias)

(+-): escaso crecimiento (1-30 colonias)

El número máximo de colonias no superó las 50.

c) Utilización de compuestos específicos

En presencia de carbohidratos: Dextrosa veintiséis de las cepas (70.27%) mostraron buen crecimiento, ocho (21.62%) escaso crecimiento y tres (8.11%) no crecieron; mientras que en Manitol todas presentaron buen crecimiento; en presencia de aminoácidos: Lisina veintiséis de las cepas (70.27%) no provocaron ningún cambio en el color violeta del medio, mientras que once (29.73%) de ellas generaron un cambio de color amarillo (fig. 12). (Tablas 11,12 y 13).



Fig. 12. Macrofotografía prueba de lisina. Se evidencia el cambio de color de violeta a amarillo en algunos de los tubos de ensayo.
Fuente: Autores, 2007.

Tabla 11. Utilización de compuestos específicos.

Cepa	Dextrosa (10.0 g/l)	Manitol (10.0 g/l)	Lisina (0.5 g/l)
P2CL1	+	+	M
P6CL2	+	+	A
P1CL3	-	+	M
P6CL4	+	+	M
P6CL5	+	+	M
P6CL6	+	+	A
P6CL7	+	+	M
P6CL8	+	+	M
P2CL9	+	+	M
P5CL10	+	+	M
P1A12	+-	+	M
P7CL14	+-	+	M
P3A15	+	+	M
P6CL16	+	+	A
P1A17	+	+	A
P7CL18	+	+	M
P6CL19	-	+	A
P6CL20	+	+	M
P6CL21	+	+	M
P6CL22	+	+	M
P1CL23	-	+	A
P6CL24	+	+	M
P5PB25	+	+	M
P6PB26	+	+	M
P1PB27	+	+	M
P7A30	+	+	M
P7A31	+-	+	M
P5A32	+-	+	A
P5A33	+-	+	A
P4A34	+-	+	A
P4A35	+	+	M
P4A36	+	+	M
P5A37	+	+	A
P3A40	+-	+	M
P3A41	+	+	M
P6CL43a	+-	+	A
P6CL43b	+	+	M

(-): sin crecimiento (0 colonias)

(+-): escaso crecimiento (1- 40 colonias)

(+): Buen crecimiento (más de 60 colonias)

A: colonias amarillas

B: colonias violetas

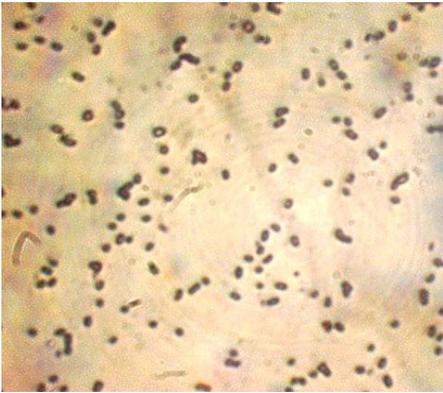
Tabla 12. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación en Co⁺² y Dextrosa

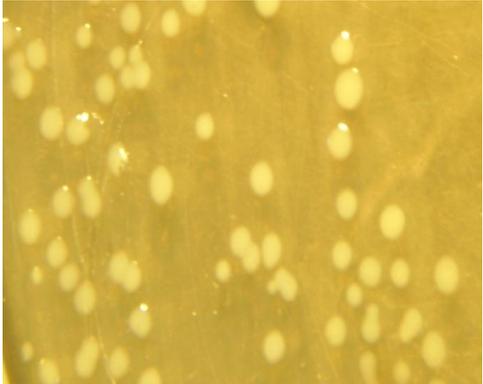
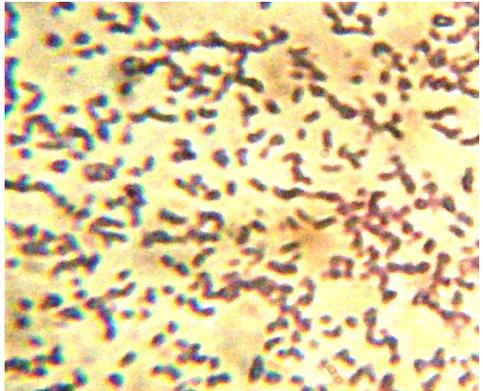
Zona	Crecimiento	Co ⁺²	Dextrosa
Achiote	Ninguno	84.6	.0
	Escaso	15.4	46.2
	Bueno	.0	53.8
	Total	100.0	100.0
Calle Larga	Ninguno	76.2	14.3
	Escaso	23.8	9.5
	Bueno	.0	76.2
	Total	100.0	100.0
Piedras Blancas	Ninguno	100.0	.0
	Escaso	.0	.0
	Bueno	.0	100.0
	Total	100.0	100.0
Total	Ninguno	81.1	8.1
	Escaso	18.9	21.6
	Bueno	.0	70.3
	Total	100.0	100.0

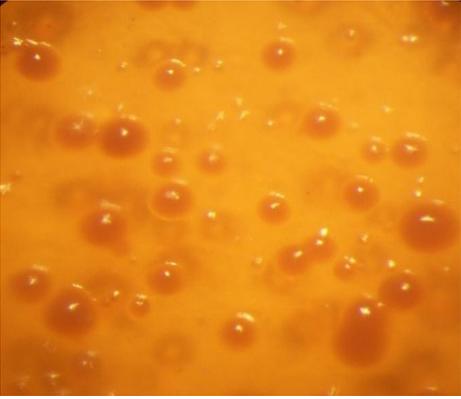
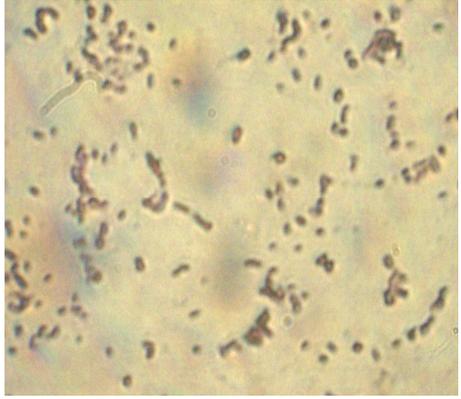
Tabla 13. Crecimiento de las cepas por zona de evaluación en lisina

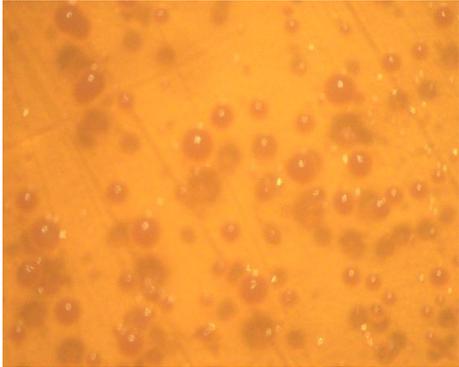
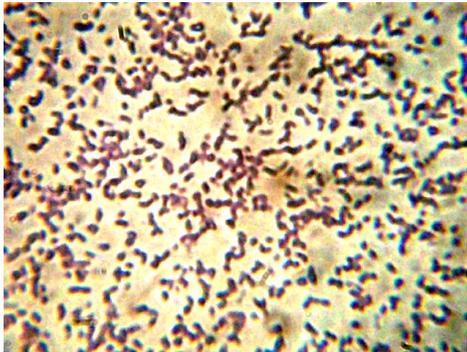
Lisina	Zona			
	Achiote	Calle Larga	Piedras Blancas	Total
Amarillo	45.5%	54.5%	.0%	100.0%
Violeta	30.8%	57.7%	11.5%	100.0%
Total	35.1%	56.8%	8.1%	100.0%

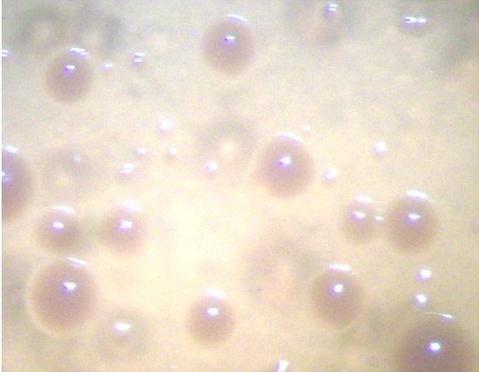
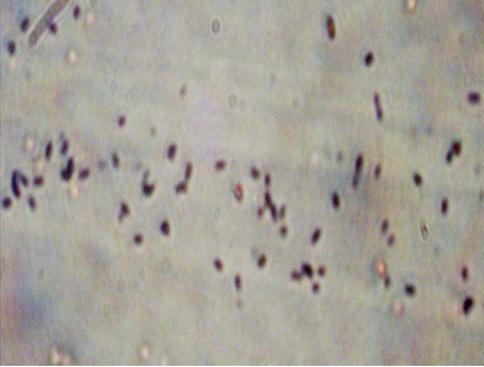
6.5 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE COLONIAS, GÉNEROS BACTERIANOS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN

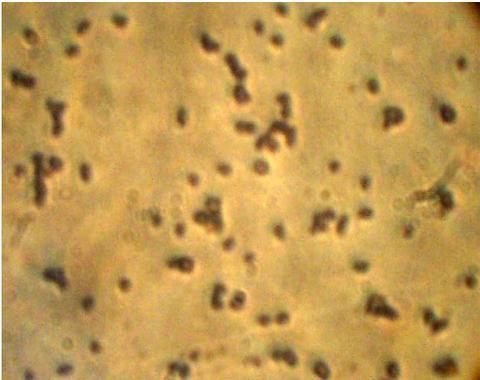
CEPA: 1	NOMENCLATURA: P2CL1	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 2.0 Color: translúcida Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevadas convexas Consistencia: suave Tiempo de aparición: 3-5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal (bacilos cortos) Largo: 1.2 μm-1.5 μm Ancho: 0.5 μm-1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

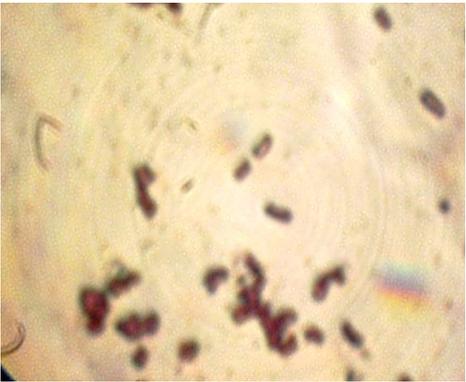
CEPA: 2	NOMENCLATURA: P6CL2	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 2.0 Color: beige Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevadas convexas Consistencia: suave Tiempo de aparición: 3-5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 2.0 μm-2.5 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

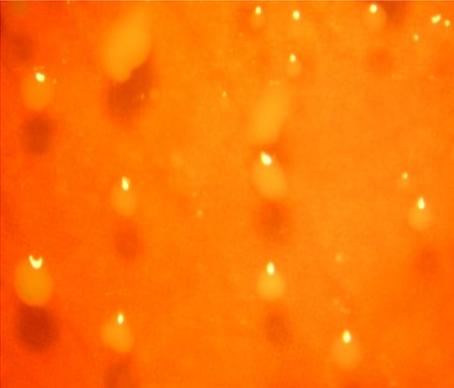
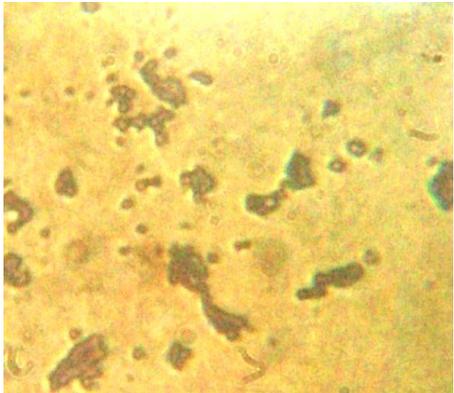
CEPA: 3	NOMENCLATURA: P1CL3	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: amarilla Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevadas convexas Consistencia: suave Tiempo de aparición: 8 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 3.0 μm Ancho: 0.9 μm -1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

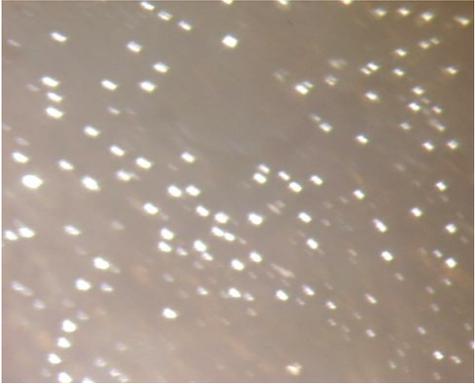
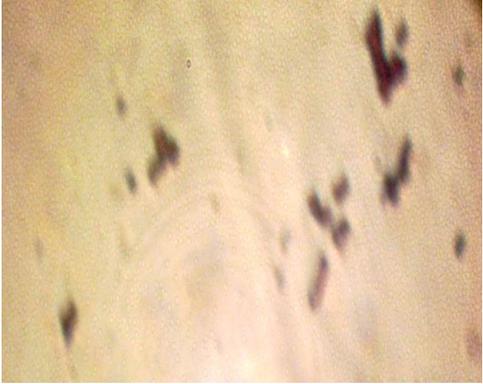
CEPA: 4	NOMENCLATURA: P6CL4	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9-1.0 Color: amarilla Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevadas convexas Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-9 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal, algunos en forma de X y Y (pleomórfica) Largo: 1.0 μm -2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

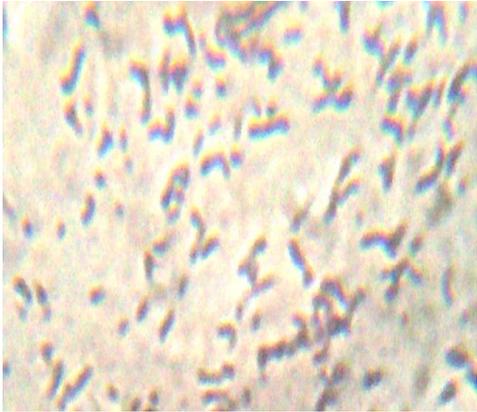
CEPA: 5	NOMENCLATURA: P6CL5	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-1.2 Color: beige Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: Suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: esferoidales Largo: 1.5 μm - 1.9 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

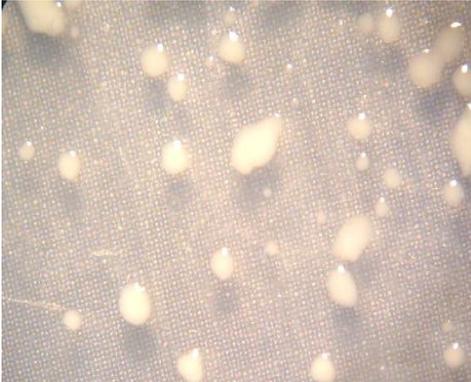
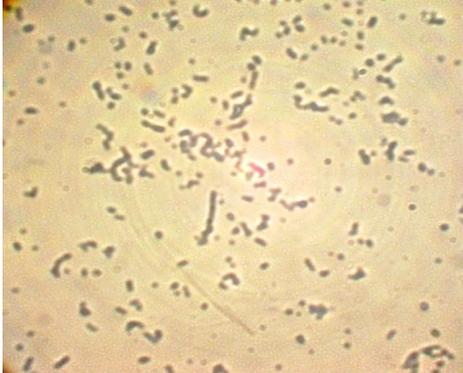
CEPA: 6	NOMENCLATURA: P6CL6	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.4 Color: semitranslúcida Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 1.5 μm-2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

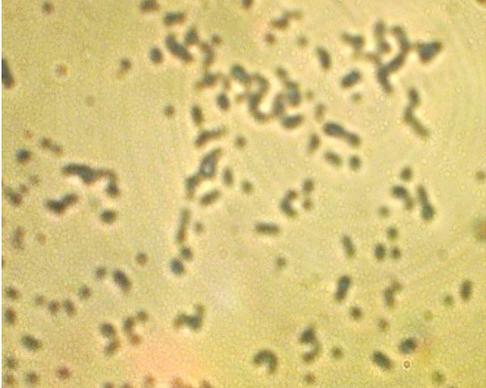
CEPA: 7	NOMENCLATURA: P6CL7	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-1.3 Color: beige Forma: irregular Borde: irregular (dentado) Elevación: elevada Consistencia: seca Tiempo de aparición: 7-9 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 2.1 μm- -3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

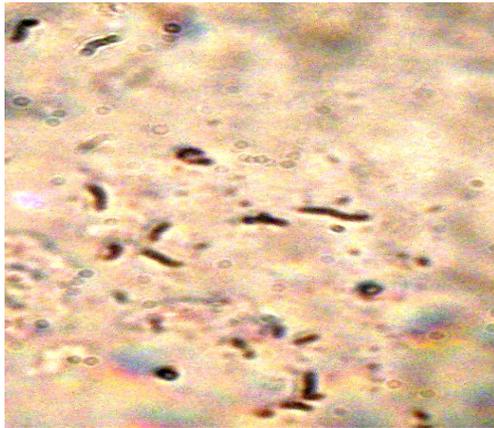
CEPA: 8	NOMENCLATURA: P6CL8	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.5-1.0 Color: amarillo Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7- 9 días de incubación.</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

CEPA: 9	NOMENCLATURA: P6CL9	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: translúcidas Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 2.5 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

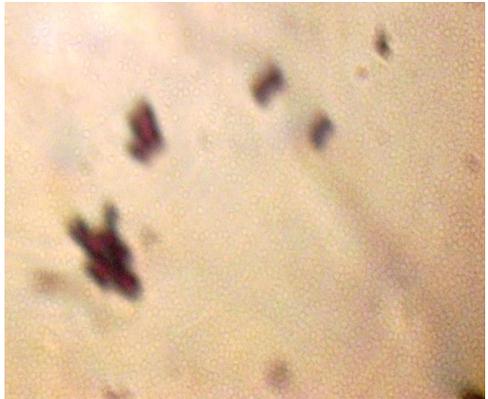
CEPA: 10	NOMENCLATURA: P5CL10	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9-1.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

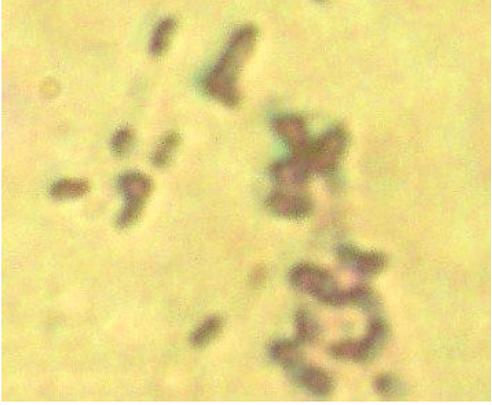
CEPA: 11	NOMENCLATURA: P1A12	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-10 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 µm-3.0 µm- Ancho: 1.0 µm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

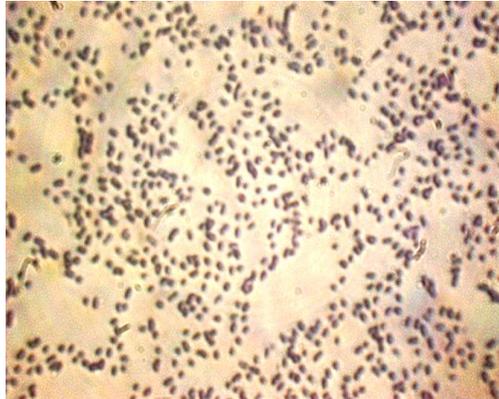
CEPA: 12	NOMENCLATURA: P7CL14	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 2.1 μm-2.9 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

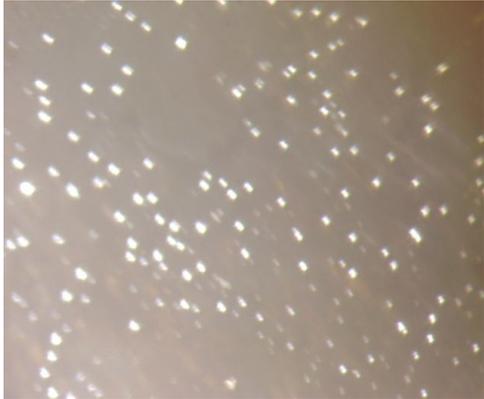
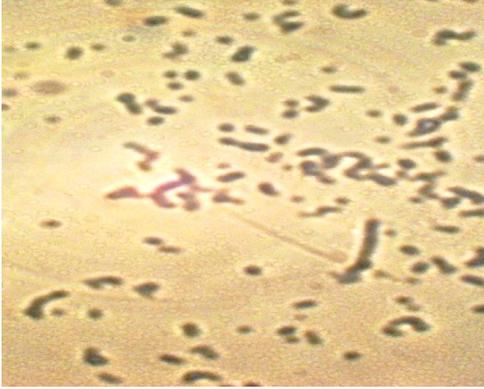
CEPA: 13	NOMENCLATURA: P3A15	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 3.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 4-5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

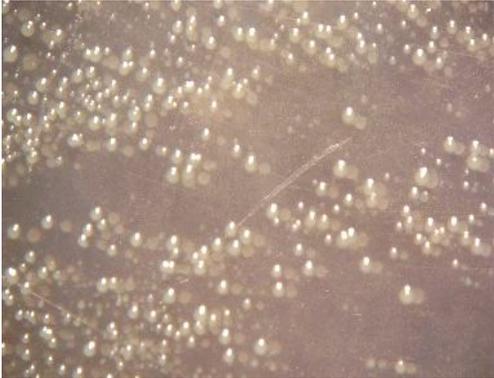
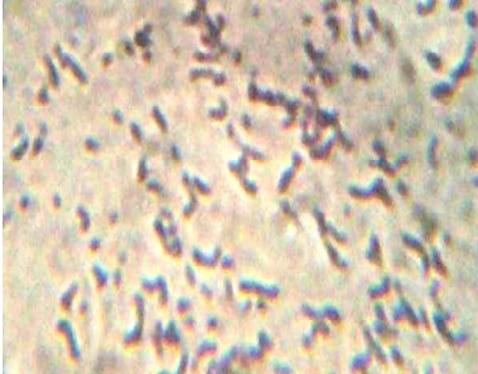
CEPA: 14	NOMENCLATURA: P6CL16	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: semitranslúcida Forma: irregular Borde: dentado Elevación: plana Consistencia: suave (mucoide) Tiempo de aparición: 7-9 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

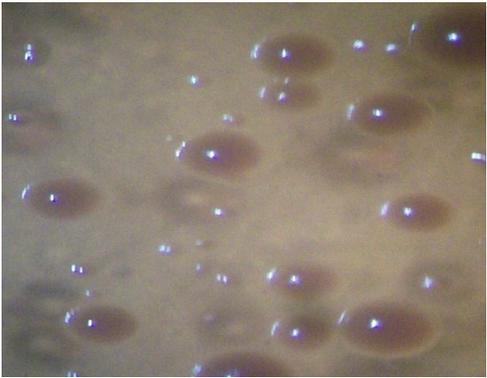
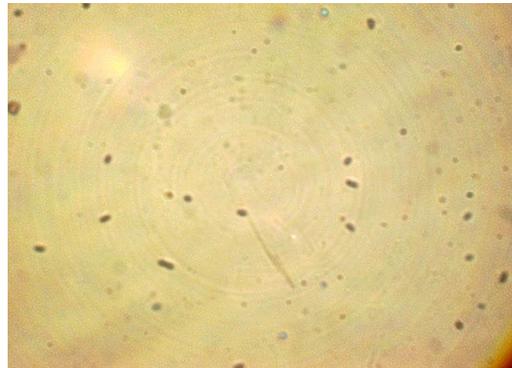
Cepa: 15	Nomenclatura: P1A17	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 2.0 Color: amarilla Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica: Género: <i>Rhizobium</i> sp.</p>	<p style="text-align: center;">Macrofotografía</p>  <p style="text-align: center;">Microfotografía</p>  <p style="text-align: center;">Tinción de Gram: Gram (-)</p>	

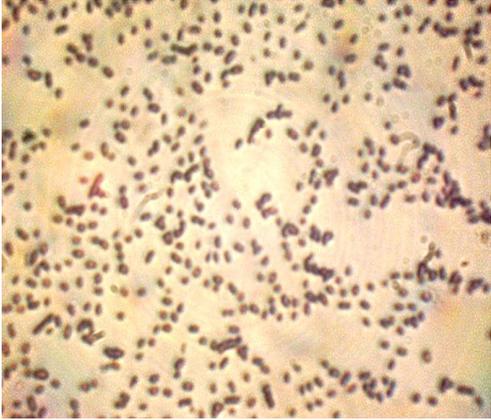
Cepa: 16	Nomenclatura: P7CL18	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: translúcidas Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 2.0 μm--3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

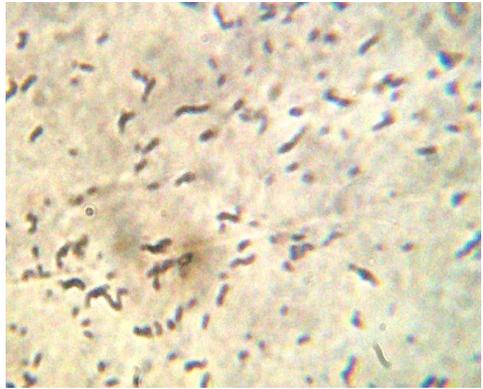
CEPA: 17	NOMENCLATURA: P6CL19	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-2.0 Color: semitranslúcidas Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 3 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: esferoidales Largo: 1.5 μm-2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p style="text-align: center;">Macrofotografía</p>  <p style="text-align: center;">Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

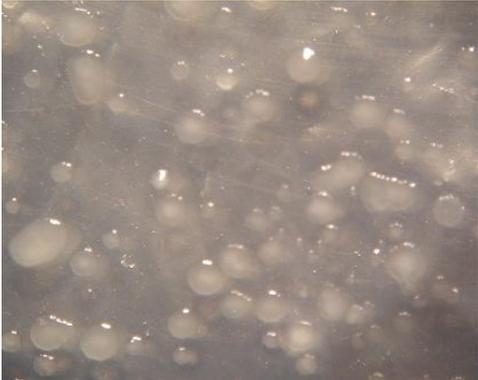
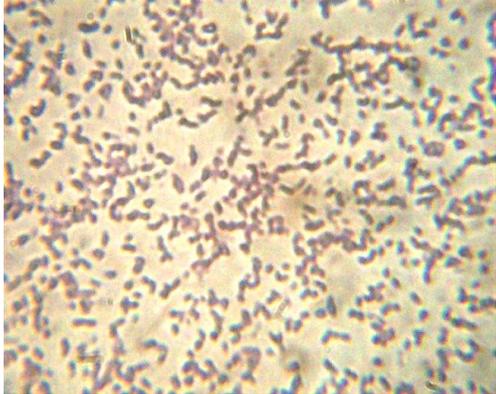
CEPA: 18	NOMENCLATURA: P6CL19	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-3.0 Color: translúcida Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5-6 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidales Largo: 2.5 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

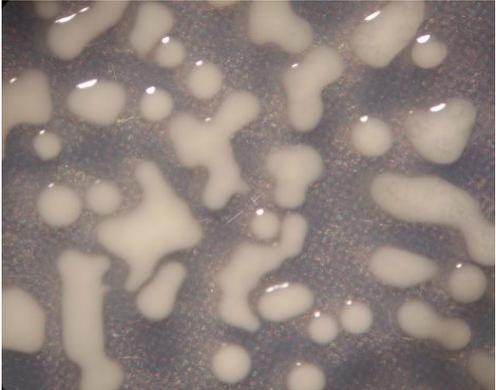
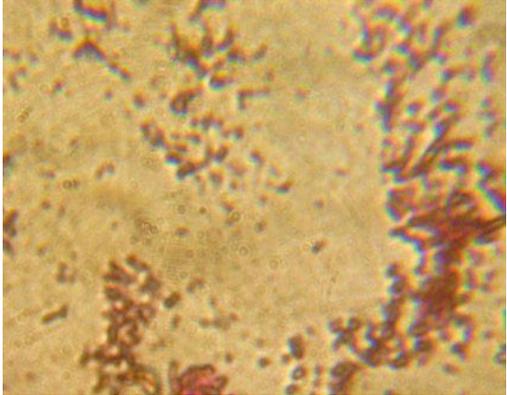
Cepa: 19	Nomenclatura: P6CL21	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9-1.0 Color: semitranslúcidas Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5-6 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.5 μm -3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

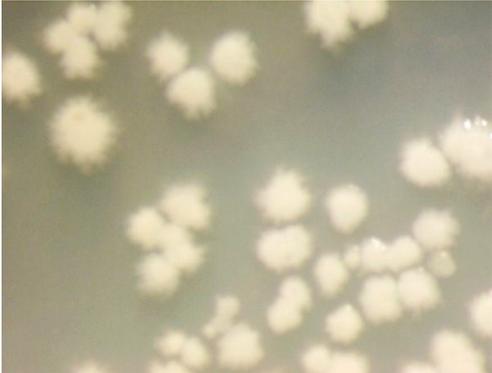
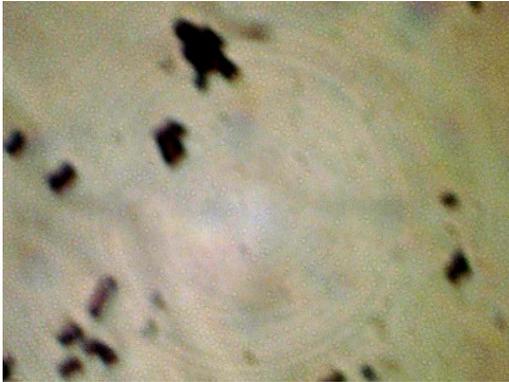
Cepa: 20	Nomenclatura: P6CL22	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-1.2 Color: beige Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: esferoidales Largo: 1.5 μm-1.9 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

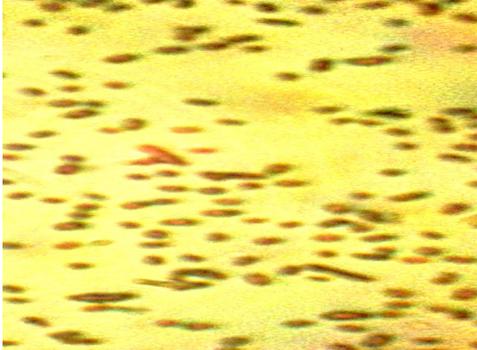
Cepa: 21	Nomenclatura: P1CL23	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-2.0 Color: semitranslúcidas Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 3 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: esferoidales Largo: 1.5 μm-2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

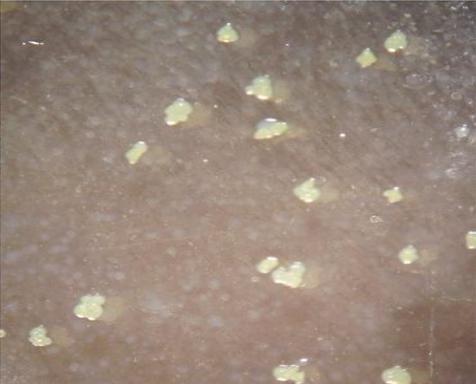
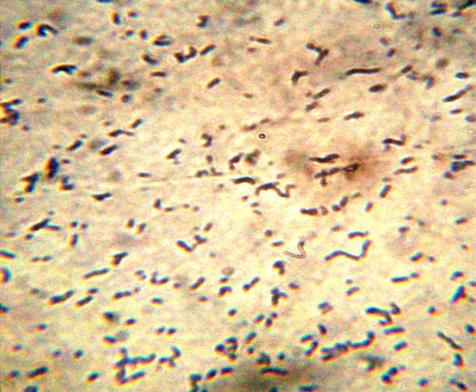
Cepa: 22	Nomenclatura: P6CL24	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: beige Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5-6 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

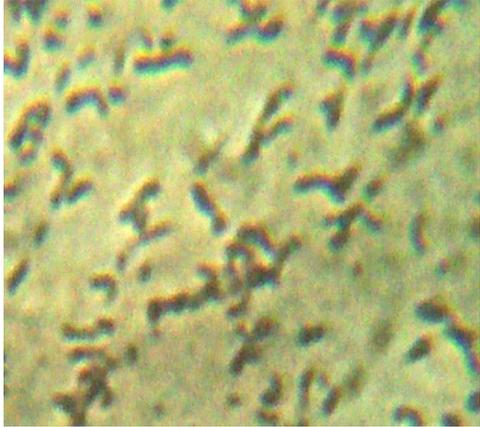
Cepa: 23	Nomenclatura: P5PB25	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.5-2.0 Color: semitranslúcidas Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p style="text-align: center;">Macrofotografía</p>  <p style="text-align: center;">Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

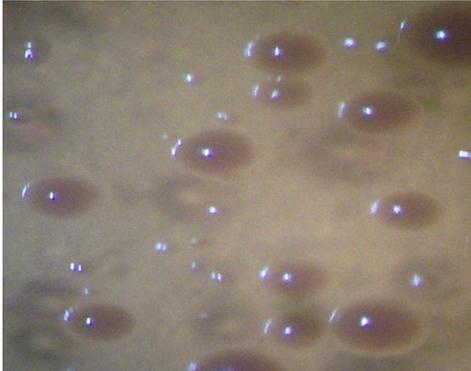
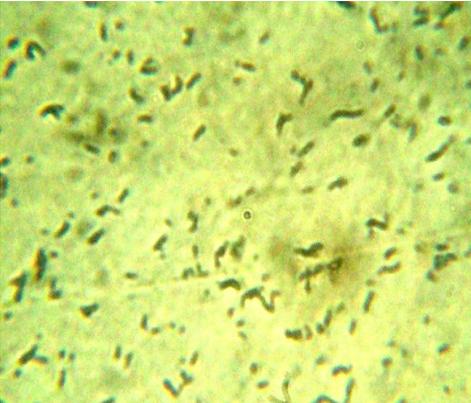
Cepa: 24	Nomenclatura: P6PB26	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-2.0 Color: beige Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: X y Y (pleomórfica) Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

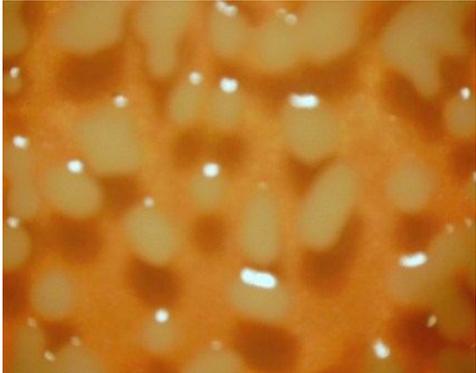
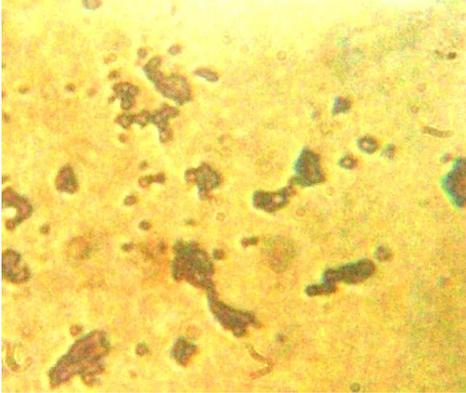
Cepa: 25	Nomenclatura: P1PB27	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.3-2.0 Color: beige Forma: irregular Borde: irregular (dentado) Elevación: elevada Consistencia: seca Tiempo de aparición: 5-6 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidales, algunas en X y Y Largo: 2.1 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

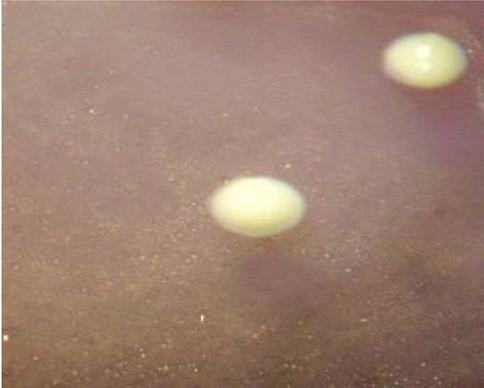
Cepa: 26	Nomenclatura: P7A30	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-3.0 Color: translúcida Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5-6 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidales Largo: 2.5 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

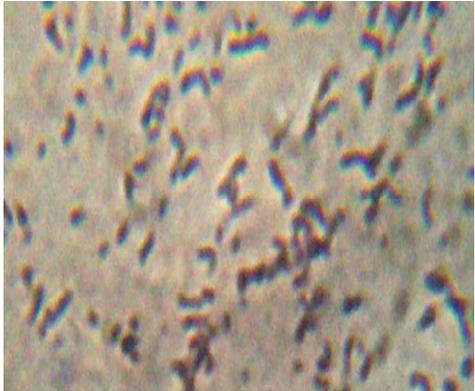
Cepa: 27	Nomenclatura: P7A31	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.5-1.0 Color: amarillo Forma: irregular Borde: irregular Elevación: elevada Consistencia: seca Tiempo de aparición: 7 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

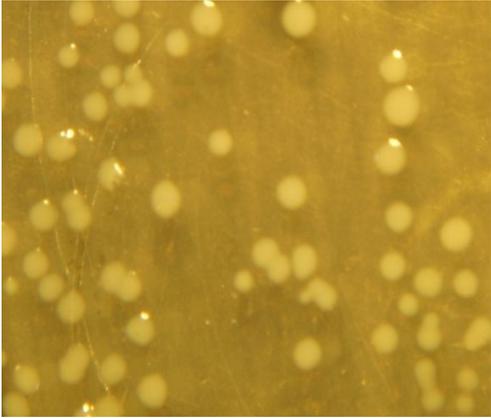
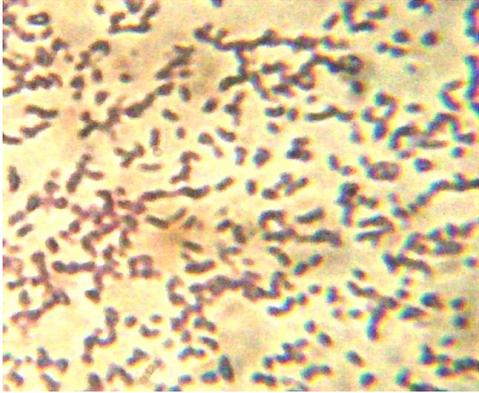
Cepa: 28	Nomenclatura: P5A32	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9-1.0 Color: semitranslúcidas Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-9 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.5 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

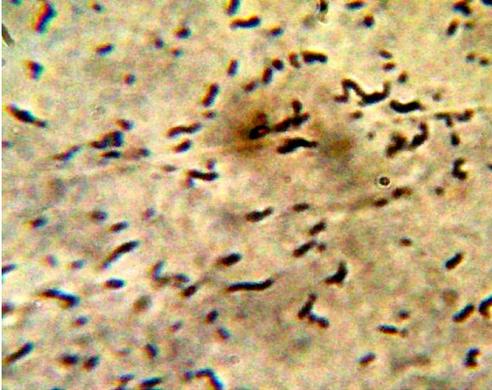
Cepa: 29	Nomenclatura: P5A33	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-1.2 Color: beige Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: esferoidales Largo: 1.5 μm-1.9 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

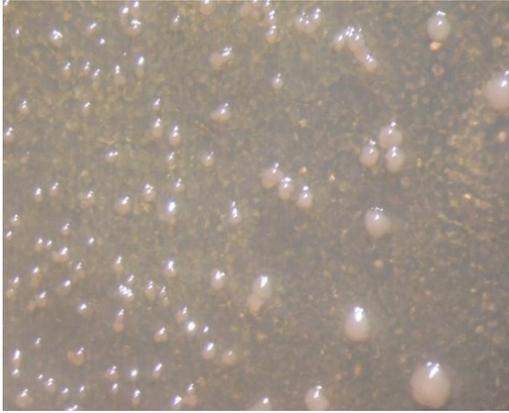
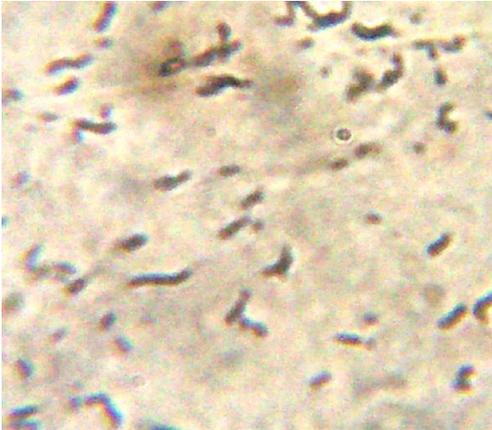
Cepa: 30	Nomenclatura: P4A34	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: amarillo Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-8 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

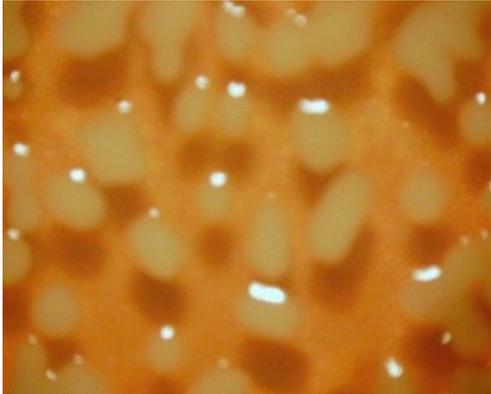
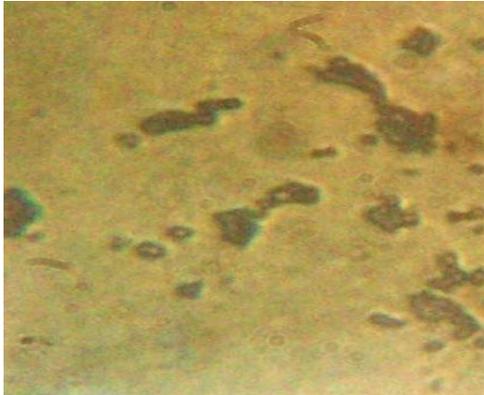
Cepa: 31	Nomenclatura: P4A35	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0-2.0 Color: amarillo Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-8 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

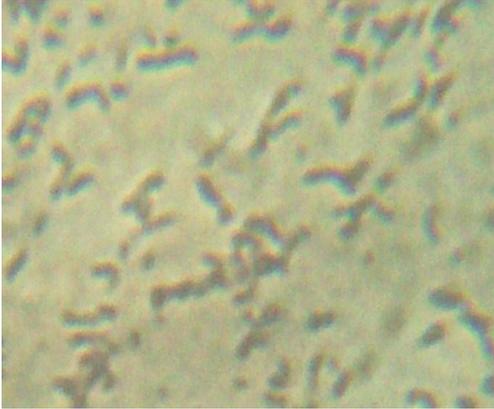
Cepa: 32	Nomenclatura: P4A36	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9 -1.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación.</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

Cepa: 33	Nomenclatura: P5A37	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 2.0 Color: beige Forma: regular (redonda) Borde: liso Elevación: elevadas convexas Consistencia: suave Tiempo de aparición: 3 -5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: elipsoidal Largo: 2.0 μm-2.5 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium</i> sp.</p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

Cepa: 34	Nomenclatura: P3A40	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.5-1.0 Color: amarillo Forma: irregular Borde: irregular Elevación: elevada Consistencia: seca Tiempo de aparición: 7 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm-3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica: Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram: Gram (-)	

Cepa: 35	Nomenclatura: P3A41	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 3.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 4-5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 µm-3.0 µm Ancho: 1.0 µm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p style="text-align: center;">Macrofotografía</p>  <p style="text-align: center;">Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-).

Cepa: 36	Nomenclatura: P6CL43a	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 1.0 Color: amarillo Forma: regular Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 7-8 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Bradyrhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
		Tinción de Gram: Gram (-)

Cepa: 37	Nomenclatura: P6CL43b	OBJ 100 X OC 10 X
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS		
<p>Características de la colonia:</p> <p>Diámetro (mm): 0.9-1.0 Color: beige Forma: regular (redondo) Borde: liso Elevación: elevada convexa Consistencia: suave Tiempo de aparición: 5 días de incubación</p> <p>Características de la bacteria:</p> <p>Forma: alargada Largo: 2.0 μm -3.0 μm Ancho: 1.0 μm</p> <p>Determinación taxonómica:</p> <p>Género: <i>Rhizobium sp.</i></p>	<p>Macrofotografía</p>  <p>Microfotografía</p> 	
	Tinción de Gram (-)	

6.6 PRUEBA DE NODULACIÓN (INOCULACIÓN)

El número promedio de nódulos/raíz en cada planta a partir de la dilución 10^{-4} varió entre 0-26, siendo más bajo con la inoculación de las cepas P6CL24 y P4A35 y más alta con la cepa P6CL43a. (Tabla 14).

Diecinueve de las cepas ensayadas (51.35%) presentaron nodulación baja, quince (40.54%) nodulación media, mientras que las tres restantes (8.11%) nodulación alta (fig. 13). (Tabla 15).

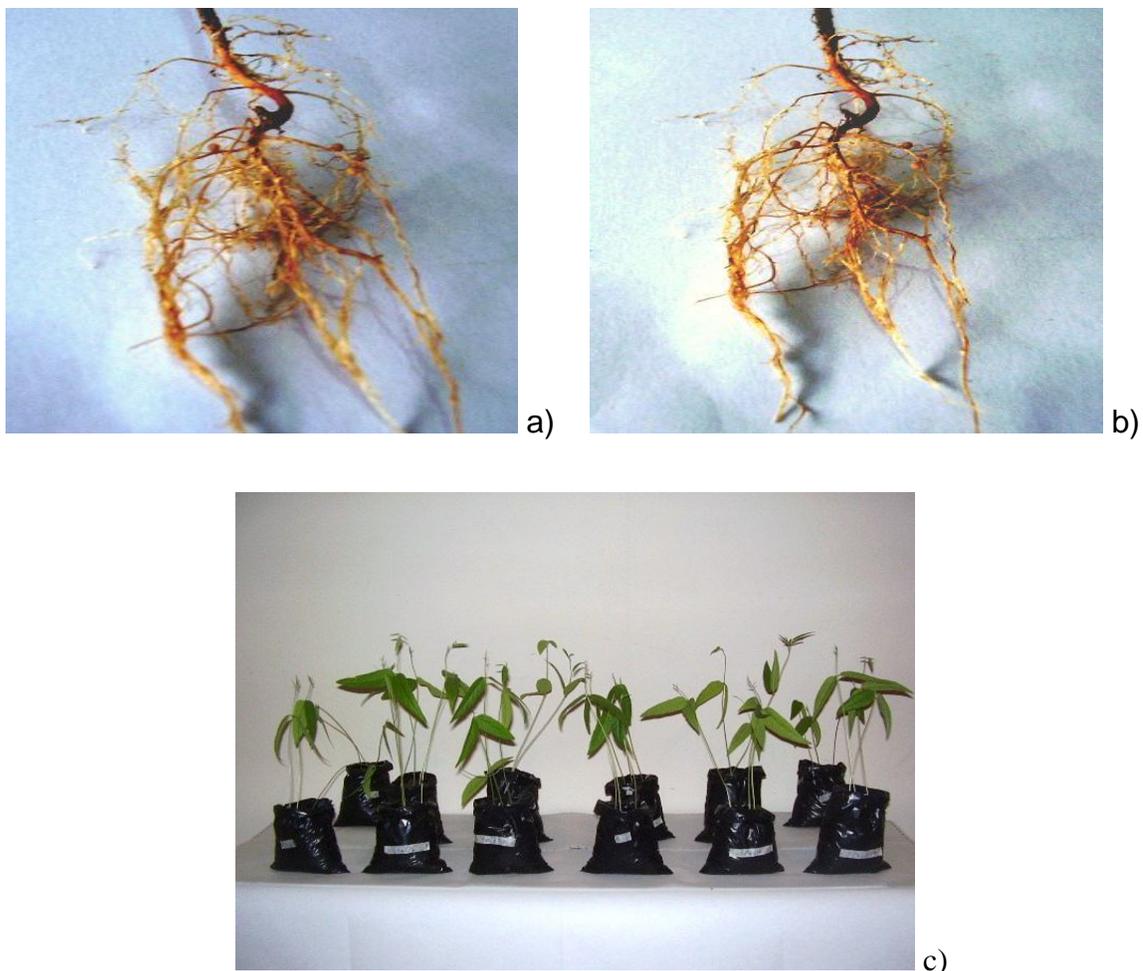


Fig. 13. a) y b). Nodulación producida en plántulas de *Cajanus cajan* durante la prueba de inoculación. c) desarrollo de plántulas bajo condiciones controladas

Fuente: autores, 2007.

Tabla 14. Prueba de nodulación (autenticación):

Tratamiento/cepa	Nº nódulos Dilución 10 ⁻⁴		Nº promedio de Nódulos aproximado	Nº de nódulos Sin dilución		Nº promedio de nódulos aproximado
	Planta 1	Planta 2		Planta 1	Planta 2	
P2CL1	12	9	11	15	19	17
P6CL2	13	11	12	20	22	21
P1CL3	10	8	9	29	21	25
P6CL4	4	5	5	15	17	16
P6CL5	8	12	10	19	22	21
P6CL6	12	9	11	14	17	16
P6CL7	2	3	3	5	5	5
P6CL8	8	7	8	12	15	14
P2CL9	22	17	20	25	32	29
P5CL10	6	8	7	12	14	13
P1A12	12	10	11	21	18	20
P7CL14	10	5	8	20	22	21
P3A15	3	4	4	10	12	11
P6CL16	15	19	17	25	22	24
P1A17	20	23	22	30	32	31
P7CL18	15	15	15	21	24	23
P6CL19	15	12	14	20	22	21
P6CL20	6	7	7	15	20	18
P6CL21	14	17	16	25	23	24
P6CL22	12	19	16	26	23	25
P1CL23	10	12	11	22	24	23
P6CL24	0	0	0	0	0	0
P5PB25	7	6	7	13	15	14
P6PB26	4	9	7	10	12	11
P1PB27	20	13	17	22	24	23
P7A30	10	12	11	20	23	22
P7A31	12	15	14	23	23	23
P5A32	21	18	20	30	31	31
P5A33	11	12	12	19	22	21
P4A34	12	16	14	22	25	24
P4A35	0	0	0	0	0	0
P4A36	12	16	14	18	23	21
P5A37	21	20	21	26	28	27
P3A40	10	11	11	20	19	20
P3A41	16	19	18	21	22	22
P6CL43a	29	23	26	32	39	36
P6CL43b	10	8	9	25	27	26
Control (-) 1	0	0	0	0	0	0
Control (-) 2	0	0	0	0	0	0
Control (+) 1	32	36	34	30	36	33
Control (+) 2	33	30	32	35	33	34

Tabla 15. Tipo de nodulación en cada tratamiento.

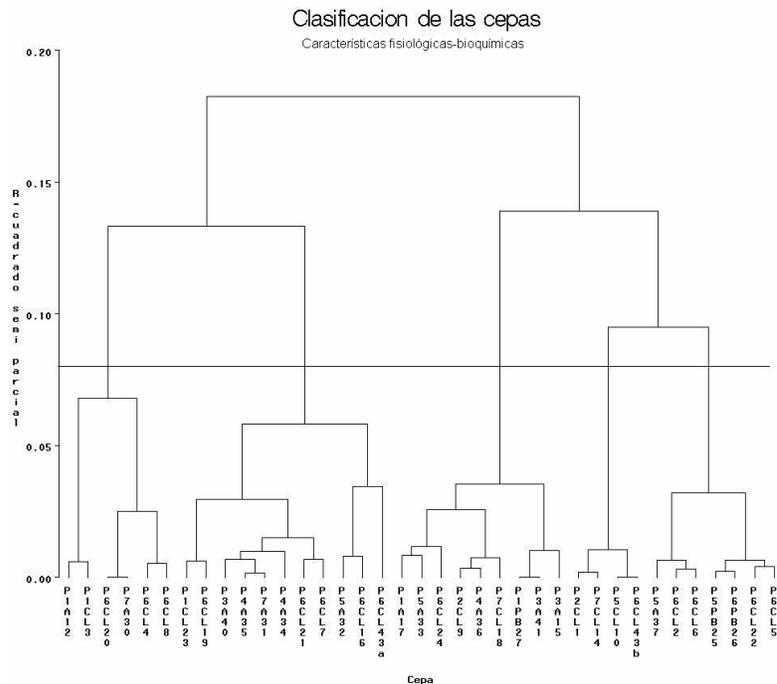
Tratamiento/cepa	Tipo de nodulación a partir de dilución 10-4
P2CL1	N.B
P6CL2	N.B
P1CL3	N.B
P6CL4	N.B
P6CL5	N.B
P6CL6	N.B
P6CL7	N.B
P6CL8	N.B
P2CL9	N.M
P5CL10	N.B
P1A12	N.B
P7CL14	N.B
P3A15	N.B
P6CL16	N.M
P1A17	N.M
P7CL18	N.M
P6CL19	N.M
P6CL20	N.B
P6CL21	N.M
P6CL22	N.M
P1CL23	N.B
P6CL24	N.N
P5PB25	N.B
P6PB26	N.B
P1PB27	N.M
P7A30	N.B
P7A31	N.M
P5A32	N.M
P5A33	N.M
P4A34	N.M
P4A35	N.N
P4A36	N.M
P5A37	N.M
P3A40	N.B
P3A41	N.M
P6CL43a	N.A
P6CL43b	N.B
Control (-) 1	N.N
Control (-) 2	N.N
Control (+) 1	N.A
Control (+) 2	N.A

N.N: nodulación nula
N.B: nodulación baja
N.M: nodulación media
N.A: nodulación alta

6.7 ANÁLISIS MULTIVARIADO

El análisis de correspondencias múltiples desarrollado para determinar cómo se integran conjuntamente las características fisiológicas-bioquímicas y las características morfológicas de las cepas bacterianas al igual que el tipo de colonias formadas, indican que para el primer caso se toman de salida cinco (5) dimensiones que explican el 82% de la variabilidad de las variables de entrada, mientras que en el segundo caso cuatro (4) que explican el 97% de la variabilidad.

El análisis de conglomerados (CLUSTER) con el método del vecino más cercano, utilizando como entrada los resultados del análisis de correspondencias múltiples para la clasificación de las cepas con respecto a las características fisiológicas-bioquímicas de las cepas aisladas, indica la formación de cinco (5) grupos o clúster homogéneos (gráfica 1).



Gráfica 1. Dendrograma A. Análisis de conglomerados clúster para características fisiológicas-bioquímicas de cepas aisladas.

El clúster N° 1, está integrado por nueve (9) cepas que en un 88.88% pertenecen al género *Rhizobium*, mientras que en un 11.11% son del género *Bradyrhizobium*, con nulo crecimiento en pH: 4.0, 10.0 y en presencia de Co^{+2} , buen crecimiento en manitol y producción de metabolitos ácidos; ellas corresponden a P1A17, P1PB27, P2CL9, P3A15, P3A41, P4A36, P5A33, P6CL24 Y P7CL18.

El clúster N° 2 está integrado por cuatro cepas por cuatro (4) cepas que en un 100% pertenecen al género *Rhizobium*, con nulo crecimiento en pH: 4.0, 4.5, 10.0 y NaCl 1 %, escaso crecimiento en pH: 9.0, nulo crecimiento en temperatura de 37°C y Co^{+2} , producción de metabolitos ácidos, buen crecimiento en presencia de manitol, descarboxilación de la lisina y generadoras de nodulación baja, convirtiéndose en el grupo con mayores características en común, con las cepas: P2CL1, P5CL10, P6CL43B Y P7CL14.

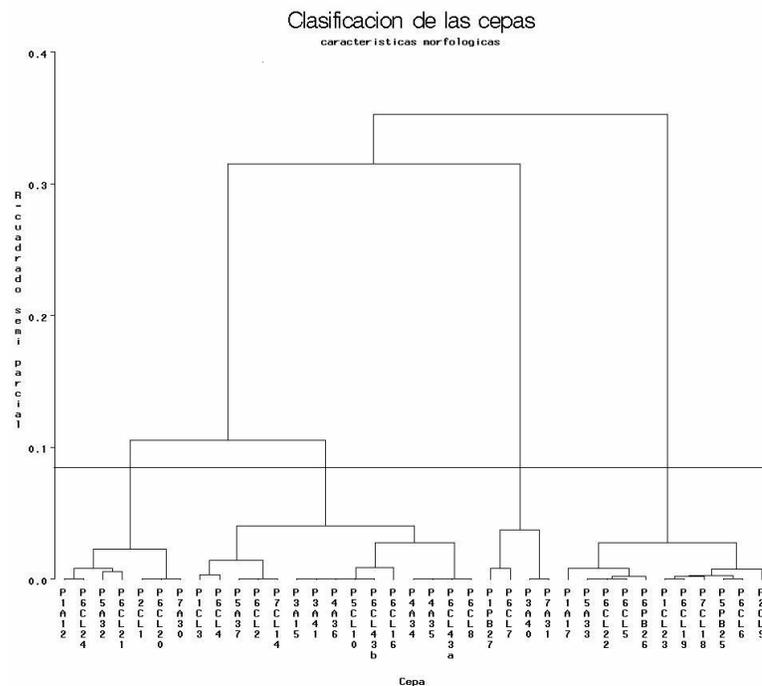
El clúster N° 3 está integrado por seis (6) cepas que en un 66.66 % pertenecen al género *Bradyrhizobium* y en un 33.33% al género *Rhizobium*, con nulo crecimiento en pH: 4.0, 9.0, 10.0 y NaCl 2%, buen crecimiento en presencia de manitol, descarboxilación de la lisina y generación de nodulación baja, estando representado por las cepas: P1A12, P1CL3, P6CL20, P6CL14, P6CL8 y P7A30.

El clúster N° 4 está integrado por once (11) cepas, que en un 72.72% pertenecen al género *Bradyrhizobium* y en un 27.28% al género *Rhizobium*, con nulo crecimiento en pH: 4.0 y 10.0, escaso crecimiento en pH: 4.5 y 9.0, nulo crecimiento en temperatura de 37 °C y buen crecimiento en presencia de manitol, con las cepas: P1CL23, P3A40, P4A34, P4A35, P5A32, P6CL16, P6CL19, P6CL21, P6CL43a, P6CL7 y P7A31.

El clúster N° 5 está integrado por siete (7) cepas que en un 100% pertenecen al género *Rhizobium*, con nulo crecimiento en pH: 4.0 y 10.0, escaso crecimiento en

pH: 5.0 y 9.0, nulo crecimiento en presencia de Co^{+2} , buen crecimiento en dextrosa y manitol, y producción de metabolitos ácidos, estando representado por las cepas: P5A37, P5PB25, P6CL2, P6CL22, P6CL5, P6CL6 Y P6PB26.

El análisis de conglomerados (CLUSTER) con el método del vecino más cercano, utilizando como entrada los resultados del análisis de correspondencias múltiples para la clasificación de las cepas con respecto a las características morfológicas, indica la formación de cuatro (4) grupos o clúster homogéneos (gráfica 2).



Gráfica 2. Dendrograma B. Análisis de conglomerados clúster para características morfológicas de cepas aisladas.

El clúster N° 1 está integrado por quince (15) cepas de las cuales el 53.3% pertenecen al género *Rhizobium* y el 46.6% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde la mayoría de las cepas se desarrollan lentamente colonias de color beige, con forma regular, borde liso, de tipo elevadas convexas, consistencia suave, de diámetro igual a 1.0 mm, mientras que la forma de la bacteria es alargada. Las

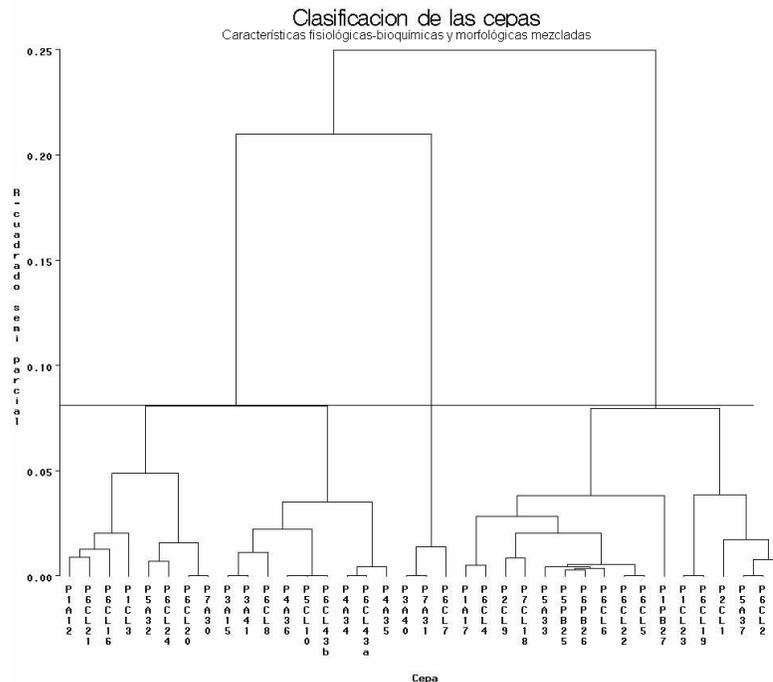
cepas correspondientes son: P1CL3, P3A15, P3A41, P4A34, P4A35, P4A36, P5A37, P5CL10, P6CL16, P6CL2, P6CL4, P6CL43a, P6CL43b, P6CL8 y P7CL14.

El clúster N° 2 está integrado por diez (10) cepas de las cuales el 90% pertenecen al género *Rhizobium* y el 10% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde la mayoría de las cepas se desarrollan rápidamente colonias semitranslúcidas, con forma regular, borde liso, de tipo elevadas convexas, consistencia suave, de diámetro mayor a 1.0 mm, mientras que la forma de la bacteria es esferoidal y pleomórfica. Las cepas correspondientes son: P1CL23, P2CL9, P5A33, P5PB25, P6CL19, P6CL22, P6CL5, P6CL6, P6PB26 y P7CL18.

El clúster N° 3 está integrado por siete (7) cepas de las cuales el 71.43% pertenecen al género *Rhizobium* y el 28.57% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde la mayoría de las cepas se desarrollan rápidamente colonias translúcidas, con forma regular, borde liso, de tipo elevadas convexas, consistencia suave, de diámetro mayor o igual a 1.0 mm, mientras que la forma de la bacteria es alargada. Las cepas correspondientes son: P1A12, P2CL1, P5A32, P6CL20, P6CL21, P6CL24 y P7A30.

El clúster N° 4 está integrado por cuatro (4) cepas de las cuales el 75% pertenecen al género *Rhizobium* y el 25% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde la mayoría de las cepas se desarrollan lentamente colonias de color beige y amarillo, con forma y borde irregular, de tipo elevadas, consistencia seca, de diámetro variable, mientras que la forma de la bacteria es alargada y elipsoidal; las cepas correspondientes son: P1PB27, P3A40, P6CL7 y P7A31.

El análisis de conglomerados (CLUSTER) con el método del vecino más cercano, utilizando como entrada los resultados del análisis de correspondencias múltiples para la clasificación de las cepas combinando las características fisiológicas-bioquímicas y las morfológicas, indica la formación de cuatro (4) grupos o clúster homogéneos (gráfica 3).



Gráfica 3. Dendrograma C. Análisis de conglomerados clúster combinando características fisiológicas-bioquímicas y morfológicas de cepas aisladas.

El clúster N° 1 está integrado por 14 (catorce) cepas de las cuales el 57.14% pertenecen al género *Rhizobium* y el 42.86% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde es común encontrar nulo crecimiento de las cepas en pH: 4.0, 10.0, buen crecimiento en manitol, forma de la colonia regular, borde liso, elevadas convexas y consistencia suave en la mayoría de los casos.

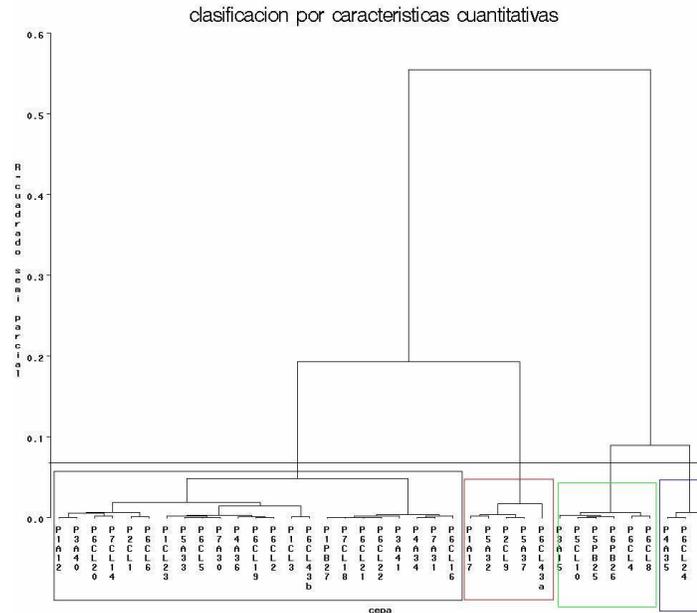
El clúster N° 2 está integrado por siete (7) cepas de las cuales el 57.14% pertenecen al género *Rhizobium* y el 42.86% restante al género *Bradyrhizobium*, en donde es común encontrar nulo crecimiento de las cepas en pH: 4.0, 10.0, escaso crecimiento en pH: 5.0, buen crecimiento en dextrosa y manitol, forma de la colonia regular, borde liso y, consistencia suave en la mayoría de los casos.

El clúster N° 3 está integrado por trece (13) cepas de las cuales el 92.31% pertenecen al género *Rhizobium* y el 7.69% restante al género *Bradyrhizobium*,

en donde es común encontrar nulo crecimiento de las cepas en pH: 4.0, 10.0, buen crecimiento en manitol, producción de metabolitos ácidos, forma de la colonia regular, borde liso y, consistencia suave en la mayoría de los casos.

El clúster N° 4 está integrado por tres (3) cepas de las cuales el 100% pertenecen al género *Bradyrhizobium*, en donde es común encontrar nulo crecimiento de las cepas en pH: 4.0, 10.0, escaso crecimiento en pH: 5.0, 9.0 y NaCl 2%, buen crecimiento en manitol, producción de metabolitos alcalinos, forma de la colonia irregular, borde irregular y, consistencia seca en la mayoría de los casos.

El análisis de conglomerados (CLUSTER) con el método del vecino más cercano, teniendo como base las características cuantitativas, indica la formación de cuatro (4) grupos o clúster homogéneos (gráfica 4).



Gráfica 4. Dendrograma D. Análisis de conglomerados clúster para características cuantitativas de cepas aisladas.

El cluster N° 1 está integrado por veintitrés (23) cepas, de las cuales el 69.56% corresponde al género *Rhizobium*, mientras que el 30.44% al género *Bradyrhizobium*, que en su mayoría fueron aisladas de las zona N° 2 (Achiote), diámetro de las colonias ≤ 1.0 mm., tiempo de incubación ≤ 5.0 días; largo de la bacteria ≥ 2.5 μ y de ancho 1.0 μ . Siendo las cepas: P3A12, P1CI23, P1CI3, P1PB27, P2CL1, P3A40, P3A41, P4A34, P4A36, P5A33, P6CI16, P6CI19, P6CI2, P6CI20, P6CI21, P6CI22, P6CI43b, P6CI5, P6CI6, P7A30, P7A31, P7CI14 y P7CI18.

El clúster N° 2 está integrado por seis (6) cepas, de las cuales el 66.66% pertenecen al género *Rhizobium* y el 33.33% restante al género *Bradyrhizobium*, que en su mayoría fueron aisladas de las zona N° 2 (Achiote), diámetro de las colonias > 1.0 mm., tiempo de incubación 5.0 días; largo de la bacteria 2.5 μ y de ancho 1.0 μ ; siendo las cepas: P3A15, P5CI10, P5PB25, P6CI4, P6CL8 y P6PB25.

El clúster N° 3 está integrado por tres (3) cepas, de las cuales el 66.66% corresponden al género *Rhizobium* y el 33.33%, que en su mayoría fueron aisladas de las zona N° 2 (Achiote), diámetro de las colonias > 1.0 mm., tiempo de incubación > 5.0 días; largo de la bacterias > 2.0 μ y ancho 1.0 μ . Siendo las cepas: P4A35, P6CI24 y P6CI7.

El clúster N° 4 está integrado por cinco (5) cepas, de las cuales el 60.0% pertenecen al género *Rhizobium* y el 40.0% al género *Bradyrhizobium*, que en su mayoría fueron aisladas de las zona N° 1 (Calle larga), diámetro de las colonias 1.0 mm., tiempo de incubación ≥ 5.0 días; largo de la bacterias 2.75 μ y ancho de 1.0 μ . Siendo las cepas: P1A17, P2CI9 y P5A32, P5A37 y P6CI43a.

7. DISCUSIÓN

El análisis físico – químico de suelos de las parcelas agrícolas seleccionadas para la obtención de las muestras empleadas en esta investigación, indica que el nivel de pH oscila entre fuertemente ácido a casi neutro; sin embargo la mayor parte de los suelos presentan niveles de acidez ligera a mediana, lo cual permite el desarrollo los rizobios, puesto que los suelos demasiado ácidos pueden llegar a ocasionar deficiencias en la nutrición mineral de elementos como Ca, Mg, y K, tanto para la leguminosa hospedante como en el rizobio (Sherman *et al.*, 1991; Mayea *et al.*, 1998; Jiménez y Lamo, 1998; Pérez – Galdona y Kahn, 1994). De acuerdo al centro internacional de información sobre cultivos de cobertura (2004) *Cajanus cajan* y los rizobios asociados a ella se desarrollan en suelos pobres con pH 4.5 – 8.4 (opt. 5.0 – 7.0) y textura arenosa – franco a arcillosa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro análisis de suelo.

La iniciación de los nódulos en leguminosas es sensible a la acidez algunas horas luego cuando el encurvamiento se ha completado, así como el cordón de infección. Los niveles críticos de pH para la nodulación varían con las especies y aún dentro de estas, situándose entre pH 3.5 y 5.5, con mayor tolerancia en especies tropicales (Frioni, 1999).

La gran abundancia de nódulos con coloración interna roja se explica por la presencia de la leghemoglobina, que se encarga de aportar O₂ a los bacteroides y controlar los niveles de este elemento, al tiempo que protege a la nitrogenasa de los altos niveles de O₂ para evitar la inactivación de la enzima (Matos, G., E. Ormeño, y D. Zuñiga, 2001). De igual forma la coloración interna roja de nódulos indica una fijación eficiente de nitrógeno, característica que se asocia a una abundancia de cationes divalentes en el suelo (Mayea *et al.*, 1981). En algunos de

los nódulos analizados se observó una coloración externa e interna verde oscuro, esto se debe a una degeneración de la leghemoglobina, como respuesta al envejecimiento de los tejidos bacterianos que se traduce en una disminución notable de la fijación de nitrógeno (Grisales *et al.*, 2005).

En las células la constante de equilibrio para la oxigenación de la leghemoglobina ($0.04 \cdot 10^{-6}$ M) asegura que los bacteroides suspendidos en solución parcialmente oxigenada de este pigmento, se encuentren en concentraciones de O₂ libre en el rango para la óptima producción de ATP y para la fijación del N₂. En los nódulos, la concentración de leghemoglobina es del orden de 1mM, o sea 10^5 veces superior a la concentración para su máxima actividad. El efecto tampón es muy grande, minimizando el efecto de concentraciones fluctuantes de O₂. (Frioni, 1999).

El contenido de fósforo de muy alto a alto, encontrado en gran parte de los suelos analizados indica un buen desarrollo de las plantas; no obstante algunos de ellos mostraron un porcentaje regular de fósforo y esto se ve reflejado en el contenido deficiente de Nitrógeno, pues este hecho genera una reducción en la fijación de N₂ por efectos específicos en la iniciación, crecimiento del nódulo y actividad de la nitrogenasa (Montes, 1999).

El número de nódulos en las plantas es controlado por mecanismos de autorregulación y por factores externos como los nitratos. Al momento de seleccionar los nódulos empleados en nuestra investigación se pudieron encontrar nódulos de tamaño pequeño o raíces poco noduladas, lo cual pudo deberse básicamente a un exceso de nitratos en los suelos, con % de nitrógeno medio que esté inhibiendo la nodulación, por disminución de deformación de pelos capilares, adhesión de bacterias a sus paredes, número de cordones de infección y aumento en el número de abortos de eventos iniciales de la infección (Frioni, 1999). Se considera que los altos niveles de fósforo tienden a incrementar la absorción de manganeso, el cual causa un descenso en el número de los nódulos (Sherman *et al.*, 1991; Pérez y Torralba, 1997), lo cual se refleja en

aquellos suelos que muestran altos contenidos de fósforo, pero con un número de nódulos no tan alto. Sin embargo, en algunos de los suelos el elevado nivel de fósforo es proporcional al número de nódulos debido al papel decisivo que juega éste elemento en el desarrollo y establecimiento del rizobio en la leguminosa. Coiné (2000) afirma que el número de nódulos depende de la fertilidad del suelo y de los elementos como el P, el cual aumenta el peso seco de los nódulos, estimula su cantidad y porcentaje de fijación de Nitrógeno.

La morfología del nódulo depende de la forma y el tamaño del meristema y de la tendencia hacia la bifurcación (Vargas, 1969). En nuestro caso se pudo caracterizar nódulos que en su gran mayoría presentaron forma esférica y superficie lisa.

La utilización del Agar MacConckey como parte de las pruebas bioquímicas tendientes a diferenciar bacterias fermentadoras de no fermentadoras del azúcar lactosa, nos permitió descartar de 68 cepas aisladas inicialmente como posibles rizobios 24 de ellas, ya que estas últimas fueron capaces de fermentar este azúcar y producir un cambio en el pH del medio, lo cual se evidenció como consecuencia del color violeta de las colonias.

La confirmación de la fermentación o no del azúcar lactosa en agar Kligler, permitió realizar una selección de 37 cepas presuntivas de rizobios, ya que estas no generaron un cambio en el color rojo del medio (característica importante de éste grupo de bacterias aerobias). En este caso los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO_2 que se elimina y no modifica el pH del medio, lo cual no ocurrió con aquellas cepas que fueron descartadas ya que generaron un viraje a color amarillo en la superficie del tubo inclinado, puesto que las aminos no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación.

En todo sistema de cultivo en el laboratorio o natural, los factores físico – químicos dirigen el crecimiento microbiano y su actividad; la acción de todas las enzimas microbianas depende del ion H^+ , y por lo tanto están influenciadas por el pH del suelo y éste a su vez influye en la diversidad de las especies (Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto 2000). Las pruebas de tolerancia a factores abióticos con respecto a niveles de acidez o alcalinidad llevadas a cabo en nuestra investigación, indican que ninguna de las cepas de rizobios pudo crecer a pH 4.0 y 10.0, lo cual concuerda con lo establecido por Fernández y Novo (1988) quienes afirman que no es común encontrar un buen desarrollo de los rizobios en un pH igual o mayor de 8.0, sin embargo Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto, (2000) encontraron crecimiento de cepas rizobiales de *C. virginianum* y *Neonotonia wightii* en pH 10.0, lo cual puede estar vinculado al tipo de suelo y a la planta hospedante.

La ausencia de crecimiento a niveles bajos de pH puede obedecer al hecho que en esas condiciones los rizobios se debilitan o pierden su virulencia, disminuye notablemente su metabolismo y cesa la actividad de la enzima nitrogenasa (Antipchuck, 1994). Cabe destacar que en este caso se encontró escaso crecimiento de las colonias en un alto porcentaje a niveles de pH 4.5, 5.0 y 9.0 en cuyo último caso existe una cercana similitud con los resultados obtenidos por Bordeleau Prévost (1994) quienes plantearon que de 17 cepas de *Bradyrhizobium sp* evaluadas en su tolerancia a pH 8.5, ninguna presentó crecimiento significativo en el medio EL – MARC.

Con respecto a niveles extremos de NaCl 2%, se encontró escaso o nulo crecimiento en la mayor parte de las cepas caracterizadas, lo cual coincide con datos de Elsheikh y Wood (1995), Odee *et al* (1995) y Mpeperekí *et al* (1997) quienes no obtuvieron crecimiento en concentraciones mayores de 1% con cepas de *Bradyrhizobium sp*.

Matos *et al* (2001) encontraron resultados variables con respecto a la respuesta del crecimiento de rizobios a NaCl (1% y 2%) puesto que en ambos casos se registraron nulo, escaso y buen crecimiento permitiéndoles dividir al grupo de bacterias en determinados subgrupos, lo cual concuerda con lo observado en nuestra investigación, debido a que la respuesta de crecimiento en NaCl 1% y 2% fue variable.

La temperatura puede afectar en forma más estrecha el metabolismo de bacterias y leguminosas del sistema simbiótico (Bordeleau Prévost, 1994). En el caso de los microorganismos la desnaturalización de las enzimas es el factor limitante en las altas temperaturas, y este varía de acuerdo al género o especie. Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto, (2000) no encontraron crecimiento de cepas nativas de rizobios aislados de leguminosas forrajeras en temperaturas extremas (5 °C y 40 °C) aunque cinco de las cepas crecieron a 37°C esto concuerda con nuestro resultados, puesto que a 5 y 40 °C no se evidenció crecimiento de las colonias bacterianas, aunque a 37°C algunas de ellas lograron crecer, y esto puede estar vinculado con las temperaturas máximas (hasta 42°C) mencionadas por Alexander (1982) para los rizobios de zona tropicales, pues otros autores indican que sólo una temperatura menor a 5 °C inhibe completamente el desarrollo de rizobios de zonas tropicales, y se plantea un rango de temperatura para el crecimiento de los mismos entre 25 – 30 °C y 20 – 31 °C, lo cual está vinculado al hecho que no poseen endosporas (Matos *et al.*, 2001; Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto, 2000).

Nogueira *et al.*, (2007) observaron que en poblaciones nativas de rizobios, todas ellas lograron soportar una temperatura de 37 °C, en relación a la temperatura de trabajo más elevadas (39 °C), pero no hubo crecimiento a una temperatura de 40°C.

El cobalto tiene un papel esencial en la síntesis microbiana de algunos compuestos requeridos para la formación de la leghemoglobina. Matos *et al* (2001)

encontraron que de 36 cepas aisladas, nueve fueron resistentes a la presencia de 40 mg/ml de Co^{+2} , de crecimiento lento (5 – 7 días) y alcalinizaron el medio LMA (Extracto de Levadura – Manitol – Agar), mientras que las 27 cepas restantes no crecieron en presencia de este metal pesado, fueron de crecimiento rápido (2-4 días) y acidificaron el medio LMA. En nuestro caso la mayor parte de las cepas (30 de 37) no lograron crecer.

Martínez – Viera (1986) establece que todas las cepas de rizobios emplean para su desarrollo compuestos específicos. En presencia de carbohidratos (Dextrosa), la mayor parte (27 de cepas) presentaron buen crecimiento, sin embargo, Bécquer, J., D. Prévot, y A. Prieto, (2000) encontró que ninguna de las cepas de rizobios caracterizadas en su estudio pudo crecer en Dextrosa (10 g/l).

Con respecto a la prueba de lisina, once de las cepas ensayadas generaron un cambio de color del medio LMA con la adición de lisina de violeta amarillo. Las enterobacterias por fermentación de la glucosa producen ácido, el cual hace virar el indicador a color amarillo; al poseer la bacteria una lisina descarboxilasa, por la descarboxilación de la lisina se produce una amina, la cual neutraliza el ácido producido por la fermentación de la glucosa retornando el medio a su color original violeta.

De acuerdo a la última edición del manual de Bergey las bacterias de los nódulos radiculares de las leguminosas o rizobios incluyen dos grupos bien definidos, que se diferencian por su velocidad relativa de crecimiento y producción de acidez en el medio Extracto de Levadura – Manitol – Agar (LMA). El género *Rhizobium* incluye a todas las cepas de crecimiento rápido (3-5 días para observar las primeras colonias) y productoras de metabolitos ácidos; mientras que las cepas del género *Bradyrhizobium* son de crecimiento lento (5-7 días) y producen metabolitos alcalinos (Matos *et al.*, 2001).

Según Thies *et al.*, 1991, los rizobios son capaces de nodular el fríjol de palo (*Cajanus cajan*), sin embargo, no presentan la misma infectividad y efectividad en todos los hospederos. Con el aislamiento de las cepas encontradas en nuestra investigación se observaron colonias con características morfológica típicas de la familia *Rhizobiaceae*. La mayoría de los aislamientos (67.57%) presentaron características propias del género *Rhizobium*, es decir, crecimiento rápido y producción de acidez en el medio LMA con adición del indicador de pH azul de bromotimol, sólo el 32.43% presentaron las características típicas del género *Bradyrhizobium*; cabe resaltar que las placas se incubaron por un periodo máximo de 12 días, por lo que hubo tiempo suficiente para el desarrollo de los rizobios de crecimiento lento.

Los resultados indican una alta diversidad morfológica y fisiológica de los rizobios que nodulan *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués - Departamento de Sucre, pues se presentaron colonias de diámetro entre 0.5-2.5 cm., de colores beige, amarillo, blanco, translúcidas y semitranslúcidas, con forma redonda y borde elevado convexo en su gran mayoría. Tanto los rizobios caracterizados como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* presentaron formas diversas como: elipsoidales, alargadas, pleomórficas (X y Y) y esferoidales.

Según CIAT (1988) el dimorfismo presentado en las cepas de *Rhizobium* es característico y muy frecuente en este género, lo cual no es un indicativo de que sean especies de diferente género. Los rizobios sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las células del nódulo dando lugar a bacterias pleomórficas, de formas muy irregulares en Y, X o de clave, denominadas bacteroides, que carecen de flagelos y no se dividen (Frioni, 1999), lo cual explica las formas X y Y identificadas en nuestro estudio.

Para clasificar taxonómicamente los rizobios durante nuestra investigación en los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* se tuvo en cuenta criterios de diferentes autores, como los citados por Matos *et al* (2001) según los cuales los miembros

del género *Bradyrhizobium* no puede crecer a 2% de NaCl, característica que se sustenta con lo dicho por Hamdi (1985), quien sitúa a los *Bradyrhizobium* como los menos tolerantes a la alcalinidad.

Otro criterio tenido en cuenta fue el de Tong y Somasegaran (1994), según el cual las cepas del género *Bradyrhizobium* son tolerantes a la presencia de 40 mg/ml de Co^{+2} , ya que ninguna de las cepas de *Rhizobium* ensayadas en sus estudios y en otras investigaciones afines ha podido crecer en presencia de este metal pesado.

En estudios realizados por Matos *et al* (2001) sólo las cepas de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) toleran la presencia de cobalto en el medio de cultivo, mientras que las cepas de crecimiento rápido (*Rhizobium*) no lo pudieron hacer, lo cual confirma lo expuesto por los anteriores autores y fue de gran utilidad para determinar la taxonomía de los rizobios aislados en este caso.

Con respecto a la prueba de inoculación, autores como Sánchez *et al* (1996) establecen que independientemente de la condición a la que ésta se encuentre sometida, el número de nódulos en la planta se ve afectado por factores como el período de humedad y luminosidad. En nuestra investigación se pudo comprobar la identidad de los rizobios aislados como perteneciente a la familia Rhizobiaceae, ya que en su gran mayoría mostraron la capacidad de producir nódulos en plantas de *Cajanus cajan* en condiciones controladas, con una cantidad de nódulos y morfología cercana a la identificada en la forma natural del proceso de nodulación. Con dos de las cepas ensayadas (P6CL24 y P4A35) no se presentó nodulación, lo cual puede deberse a posibles condiciones de estrés; esto concuerda con los resultados obtenidos por González (1996) quien caracterizó cepas de la familia *Rhizobiaceae* aisladas de plantas de Caupí (*Vigna unguiculata*), en las que realizó un ensayo de inoculación sin obtener indicios de nodulación, posiblemente a causa de la dificultad de producir las condiciones climáticas óptimas para el crecimiento de la planta señalado a nivel de laboratorio.

CONCLUSIONES

Se realizaron 37 aislamientos positivos de rizobios de parcelas agrícolas establecidas con la especie de leguminosa *Cajanus cajan*, distribuida en tres zonas del municipio de Sampués en el Departamento de Sucre, de los cuales 25 de ellos según las pruebas realizadas podrían ser clasificados taxonómicamente dentro del género *Rhizobium*, es decir un 67.57% del total; mientras que los 12 restantes (32.43%) corresponderían al género *Bradyrhizobium*. La zona que mayor número de aislamientos presentó fue la número 1 (Calle larga) con veintidós cepas rizobiales, mientras que la zona número 3 (Piedras blancas) fue la de menor presencia de rizobios con tan sólo dos aislamientos.

La caracterización morfológica de nódulos de la leguminosa *Cajanus cajan* indicó que en su gran mayoría estos presentaron una coloración interna de rojo a rosado, lo que determina una adecuada asociación de la planta con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y, por ende una eficiente fijación de nitrógeno en el sitio de estudio. El color externo de los nódulos fue en su gran mayoría parecido a la raíz vecina (café claro), con superficies lisas y costrosas, formas esféricas, lobulares, largos y ramificados, con un número promedio de 5-35, siendo mayor en la parcela N° 1 de Calle larga y menor en la parcela N° 6 de Achote, distribuidos con mayor frecuencia en las raíces laterales.

Existe una alta diversidad morfológica, fisiológica y bioquímica de los rizobios aislados, evidenciado mediante la evaluación macroscópica de colonias y microscópicas de bacterias con características particulares de gran interés para el desarrollo de prácticas agrícolas en la región sucreña.

La prueba de inoculación permitió comprobar la identidad de la mayor parte de las cepas aisladas, como bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*; sin

embargo dos de ellas resultaron ser Nod- posiblemente por factores de estrés vinculados a su manipulación en el laboratorio, o la dificultad de reproducir las condiciones naturales del proceso de nodulación en el lugar donde se mantuvieron las plántulas de *Cajanus cajan*.

El análisis de conglomerados (clúster), con el método del vecino más cercano utilizando como entrada los resultados del análisis de correspondencias múltiples para la clasificación de las cepas con respecto a las características fisiológicas – bioquímicas indicó la formación de cinco (5) grupos homogéneos, cuatro (4) para las características fisiológicas y otros cuatro (4) para las estas tres (3) características mezcladas, lo cual expresa una alta variabilidad entre las cepas aisladas.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que las cepas aisladas y caracterizadas corresponden a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, encontrándose asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués, se plantean las siguientes recomendaciones para el desarrollo de futuras investigaciones:

1. Evaluar el uso de nuevas metodologías para aislar y caracterizar rizobios, a partir de otro tipo de pruebas bioquímicas, fisiológicas y moleculares.
2. Realizar estudios de bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en otras regiones del país, complementando conocimientos adquiridos con investigaciones moleculares.
3. Desarrollar pruebas de biofertilización con los géneros de rizobios asociados a *Cajanus cajan* como alternativa para mejorar las condiciones físico-químicas de los suelos, en beneficio de la productividad agrícola sucreña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.O., O. RIVA, y E. PELZER (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports co evolution in centers of host diversification. PNAS. Vol.101, N° 37. 13548-13553. En: <<http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/37/13548>>

ALARCÓN, P.E., A. LOZANO, Y H. CHAPARRO (1997). Caracterización fenotípica de aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia sp*) y Retamo (*Teline monpessulana*). Colombia. Revista de química. Vol. 26 N° 2.

ALEXANDER M. Introducción a la Microbiología del suelo. John Wiley Sons. New York. 1980. pp: 136-150.

ÁLVAREZ, ORQUIDEA *et al.*, (1997): Base Metodológica para la localización, colección y caracterización de leguminosas nativas y naturalizadas en las principales áreas ganaderas del país. Resultado científico IIPF.

ALLEN E. K. And O. ALLEN (1958). Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. Encyclop. Plant Physiol. 8: 48 – 118. Ed. W. Ruhland, Springer – Verlag, Berlin.

ALLEN, O. N. and E. K. ALLEN 1981. The *Leguminosae*. University of Wisconsin press, Madison. Macmillan Publishing Company, London. 812 pp.

ALEXANDER M. (1982). Introducción a la Microbiología del suelo. John Wiley Sons. New York. pp: 136-150.

ANDREW, C. And D. O. NORRIS 1961. Comparative responses to calcium of five tropical and four temperate pasture legume species. Aust. J. Agric. Res. 12: 40 – 55.

ANTIPCHUCK, A.F. (1994): "Ekologicheskie aspekty sieleksii rizobii y povuysheñia effektivnosti simbioz" Fiziologuia y biojimia kult. rastieñii. 26 (4). st. 315-332.

ARRESE *et al.*, 1999. Regulación de la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas por la actividad sacarosa sintasa. En: <(http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nutricion/s.3-11.html).>

AZCÁRRAGA, R y S. RABIZA 2001. El mundo de las Plantas III. Libro Universitario Regional. Costa Rica.

BATTISTI, L; C. LARA and J. A. LEIGH 1992. Specific oligosaccharide from of the *Rhizobium meliloti* exopolisaccharide promotes nodule invasion in Alfalfa. Proc. Nati. Acad. Sci. US. 89: 5625 – 5629.

BEADLE, N. 1998. Nitrogen economy in arid and semi arid plant communities. III. The symbiosis nitrogen fixing organisms. Proc. Linm. Soc. N. S. W. 89: 273 – 286.

BECK, D. *et al* (1993). Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo. 389 pp.

BÉCQUER, J. C., D. PRÉSVOST, y A. PRIETO (2000). Caracterización fisiológica-bioquímica de cepas de rizobios aislados en leguminosas forrajeras. Rev. De Biología. Vol.14, N°1. Cuba. En <(http://intranet.dict.uh.cu/Revistas/BIO2000/B00141K.Doc.)>

BÉCQUER, A., and A. PÜHLER (1998). Production of exopolysaccharides, p, 97-118. En: H. P. SPAINK, A. KONDOROSI, and P. J. J. HOOYKAAS (eds), The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

BETTHIN, A. J. (1998). La Sabana "por su integración y cultura". Cuarta edición. Sampedrés, Sucre-Colombia. P: 3.

BORDELEAU, L.M. and DANIELLE PRÉVOST (1994): "Nodulation and Nitrogen fixation in extreme environment". Plant and soil. 161: 115-125.

BURDMAN *et al.*, 1998. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In C. ELMERICK, A. KONDORSI, y W. E. NEWTON. Eds. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. 609 - 612.

CABA, J.M.; Poveda, J.L. y Ligeró, F. 2001. Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas. En: <<http://193.146.205.198/sefin/Ligeró.html>>

CENTRO INTERNACIONAL DE INFORMACIÓN SOBRE CULTIVOS DE COBERTURA (CIDICCO). Gandul (*Cajanus cajan*). Brasil, 2004. En: <<http://www.cidicco.hn/gandul.htm>>

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1988. The legume-*Rhizobium* symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. Cali. United Nations Development Programme (UNDP). 172 p.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT) 1987. Simbiosis Leguminosas-*Rhizobium*. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Sección microbiología de suelos. Programa de pastos tropicales y programas de frijol. Cali-Colombia. 189pp

COINÉ, M. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo. España, 2000. 416 pp.

DAVEY y cols (1973). Symbiosis between *Rhizobium* and non-legume, *trema aspera*. Nature, 244: 459 – 461.

DE LA GRAZA-REQUENA, R. Caracterización bromatológica y rizobilógica de algunas leguminosas de la reserva de la biosfera “el cielo”. Tamaulipas- México. En: <<http://Revista Biotam ecología.uat.mx/biotam/v2n1/art6.htm> (accedido en 2007)>

DUKE, DE JAMES A. (1983). Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press. New York.

ELKA, G (1992). Taxonomy of the rhizobia. Caan. J. Microbiol. 38: 446-450

ELSHEIKH, E.A.E. and M. WOOD (1995): "Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt tolerant rhizobia or salt-sensitive *Bradyrhizobia* in saline soil". Soil Biol. Biochem. 27 (4/5) 65-661.

FAO (1995). Manual técnico de la fijación del nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.. pp: 10-35.

Fernández C. 2003. Manual de nodulación. Buenos Aires, Argentina. En: <<http://www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf>>

FERNÁNDEZ, C. y R. NOVO (1988): En: Vida microbiana en el suelo. Universidad de La Habana, 525 p.

FRIONI, L. Procesos microbianos. Ed. de la Fundación Univ. Nacional de Rio Cuarto. Argentina, 1999. Cap. 15: 203 – 220 pp.

GARCÍA, D., I. Reinaldo., J. TORRES, y A. HERNÁNDEZ (2004). Aislamiento y caracterización fenotípica de especies de rizobios procedentes del cultivo de soya (*Glicine Max (L) Merril*). San José, La Habana-Cuba. En: <[http://www.virtualcentre.org/es/en/BTJ%20Taller/garcía damarys.htm](http://www.virtualcentre.org/es/en/BTJ%20Taller/garcía%20damarys.htm)>

GRISALES, T. V. y J. E. FUENTES (2005). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volúbilis* sw en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento de Sucre. Universidad de Sucre-Colombia. 122 pp.

GONZÁLEZ, J. E., and B. L. REUHS (1996). Low molecular weight EPSII of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8636-8641.

HAMDY, Y.A. (1985): La fijación biológica del nitrógeno. Roma, FAO. 160 p.

HIRSCH, A., M. LUM and J. DOWNIE (1992). What makes the rhizobia – legume symbiosis so special. Plant physiology. Rockville.

INFORME DE COYUNTURA ECONÓMICA REGIONAL (ICER). (2004).
Departamento de Sucre-Colombia. P: 40.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI (1998). Estudio general de
suelos y zonificación de tierras. Departamento de Sucre-Colombia. 188 pp.

KIVAN, M. *et al.*, 2006. Characterization of *Rhizobium* sp. Isolated from bean.
Turquía, Turk. J. Biol. 30: 127 – 132 pp.

LÓPEZ *et al.*, 1995. Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by
lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium*
strain GRH2. Plant Mol. Biol. 29: 465-477.

LÓPEZ, S. 2007. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *rhizobium*
aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad. En:
<<http://virtualcentre.org/es/enl/BTJ%20Taller/lopezraul.htm> (accedido en 2007)>

LUQUE *et al.*, 1999. Distribución de la nodulación y la biosíntesis de etileno en
raíces de soja (*Glycine max*) cv. Bragg. En:
<<http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nuticion/p.3-30.html>>

MADIGAN *et al.*, 1999. Biología de los microorganismos de Brock. 9th edition.
Prentice - Hall.

MARTÍNEZ-VIERA, R. (1986): En: Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo.
Editorial Científico-Técnica. La Habana. 167 p.

MASEFIELD, G. B. (1958). Some factors affecting the nodulation in the tropic. In
nutrition of the legume. Ed. E. G. Hallsworth, Butterworth Scientific Publications.
London, pp. 202 – 215.

MATOS, G., E. ORMEÑO, y D. ZÚÑIGA (2001). Diversidad De los rizobios que
nodulan el cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus L.*) en la Costa central del Perú.
Ecología. 1(1): 42-49. En:
<<http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/Articulo%209.pdf>>.

MAYEA S, *et al.*, 1998. Microbiología Agropecuaria. Tomo II. Ed. Félix Varela. La
Habana. pp 156-178.

MONTES, L. Efecto del fósforo en la nutrición nitrogenada del frijol común (*P. vulgaris*). 1999. En:
<(http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nutricion/s.3-6.html)>

MOORE, *et al.* 1995. Botany w.m. c. Brown publisher. Chicago.

MOREL, F. Y G. PICCOLO (2004). Evaluación del guandú para recuperar la fertilidad del suelo. INTA. Rivadavia 1439 (1033). Buenos Aires-Argentina,. En:
<(http://www.inta.gov.ar/cerroazul/investigacion/suelos_anuales/guandu.htm.)>

MORTON, J.F. (1996). The pigeon pea (*Cajanus cajan* Millsp.), a high protein tropical bush legume.. HortScience 11(1):11–19.

MPEPEREKI, S.; F. MAKONESE and A.G. WOLLUN (1997): “Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils”. Symbiosis. 22: 275-292.

NOGUEIRA *et al.*, (2007). Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. Goiânia-GO, Brasil. Pesq. Agropec. Trop. 37(1): 16-21.

NORRIS, D. (1956). Lime in relation to the nodulation of tropical legumes. In nutrition of the legumes. Ed. E. G. Hallsworth, Butterworth Scientific Publications. pp. 164 – 182.

NUTMAN, P (1956). The influence of the legume root nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev. 31: 109 – 151

ODEE, D. W. *et al.* (1997): “Phenotypic characteristic and composition of rhizobia associated with wood legumes growing in diverse Kenyan conditions”. Plant and Soil. 188: 65-75.

PAZOS, M. *et al.*, 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Barí. Rev. Cultivos Tropicales 21(3): 19-23.

PÉREZ, S. y A. TORRALBA (1997). La fijación de nitrógeno por los seres vivos. Seminario de fisiología vegetal, 21.01. P: 21. En:

<<http://scriptusnature.8m.com>>

PÉREZ – GALDONA, R. y M. KAHN (1994). Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. Microbiol. 140: 1231 – 1235.

RODRÍGUEZ, S. (2002). Caracterización de cepas de *Bradyrhizobium* de leguminosas arbustivas ibéricas. Implicaciones ecológicas de la interacción planta-microorganismo. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente. N°3.

REDONDO, M., *et al.*, 2007. Fijación biológica de nitrógeno. (Accedido en 2007).

En:

<http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm>

SALAZAR, M. *et al.*, 2001. Caracterización de la bacteria nitrificante del Suribio (*Pithecelobium lanceolatum* Benth). Rev. N° 048 FITOPATOLOGÍA. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

SÁNCHEZ *et al.*, (1996). Caracterización mediante marcadores moleculares de cepas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que maximicen la fijación simbiótica de nitrógeno con Caupí (*Vigna unguiculata*). Universidad de Córdoba-Colombia. En:

<<http://www.unavarra.es/genmic/publicaciones/tfc/David%20Sanchez.htm>>

SCHREVEN, D. A. VAN (1958). Some factors affecting the uptake of nitrogen by legume. In nutrition of the legume. Ed. E. G. Hallsworth, Butterworth Scientific Publications. London. pp. 137 – 163.

SKERMAN, P; D. CAMERON y F. RIVEROS (1991): Leguminosas forrajeras tropicales. FAO. Roma 326 p.

SIQUIERA, J. y A. FRANCO (1988). Biotecnología de solo, fundamentos e perspectivas, MEC_ESAL-FAEPE-AABEAS, Brasilia.

SOMASEGARAN, P. y H. HOBEN (1994). Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Proyecto NIFTAL. Hawai. 367 pp.

SPAINK, H. *et al.*, (1998). The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

SPAINK, H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54: 257-288.

SPRENT, J. 2001. Nodulation in Legumes. Royal Botanical Gardens, Kew, 146 pp.

STEVENS, W. D., C. ULLOA U., A. POOL Y O. M. MONTIEL (EDS.) 2001. Flora de Nicaragua. Vol. 85, tomos I, II y III. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis Missouri.

TANNER, J. and ANDERSON, I. (1963). An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation. *Nature* 198: 303 – 304.

THE NITRAGIN COMPANY, INC (1990). Legumes, inoculation and nitrogen fixation, understanding the relationship. Milwaukee. U.S.A. 7p.

THIES, *et al.*, 1991. Subgroups of the cowpea miscellany: Symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogea*, and *Macroptilium atropurpureum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1540 - 1545.

TONG, Z., y M. J. SADOWSKY (1994). A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 581-586.

VALARINI, M. (1994). Contribuição da fixação simbiótica de nitrogênio na produção do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Sci. Agric.*, Piracicaba, 51(3). p 500-504

VINCENT, J. (1982). Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sydney. 288 p.

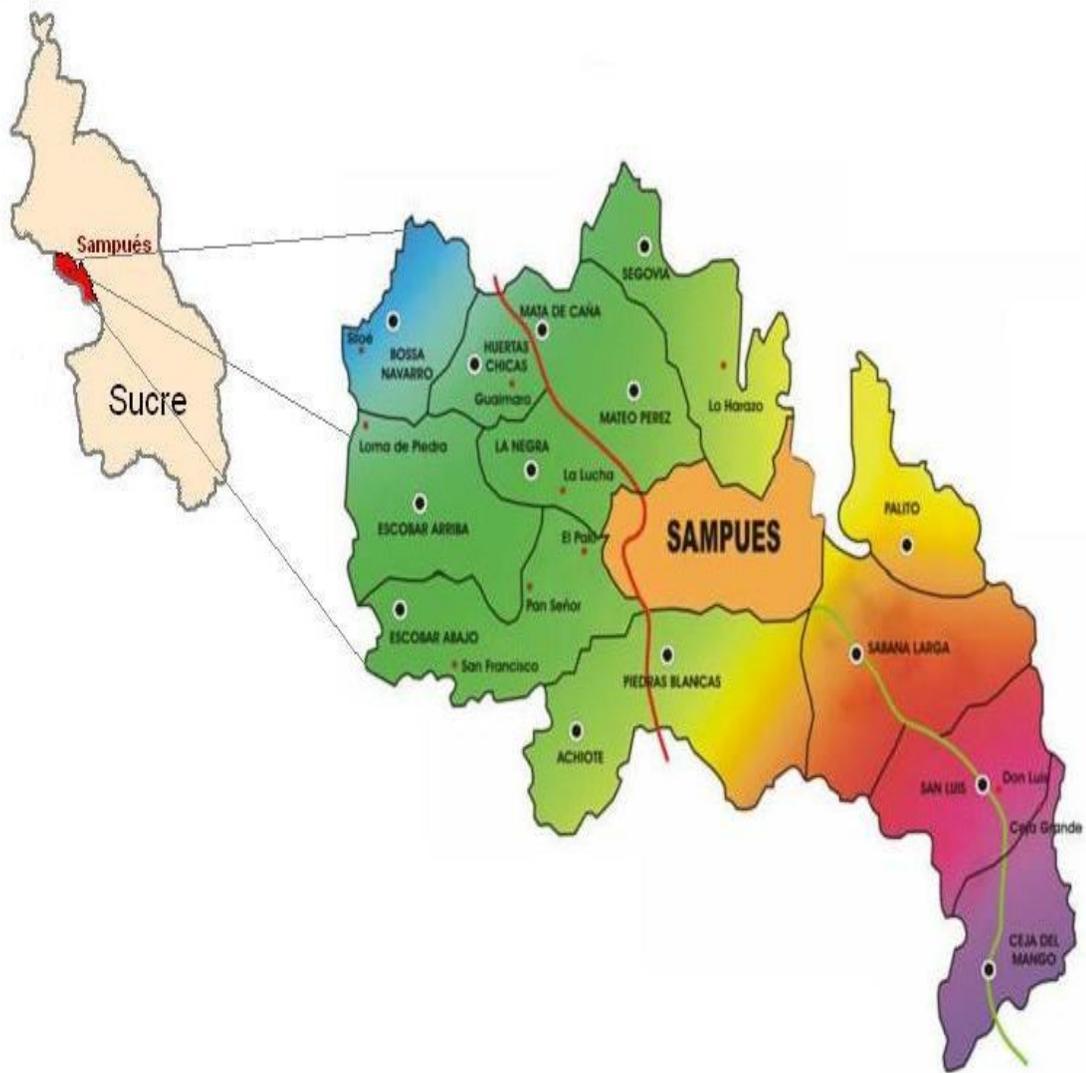
VINCENT, J. (1975). *Manual práctico de Rhizobiología*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

VARGAS DE ROZO, E (1969). Aspectos microbiológicos de la fijación simbiótica del nitrógeno por el *Rhizobium*. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá-Colombia. 198 pp.

WANG, T. y J. MARTÍNEZ. Taxonomía de los rizobios. (Accedido en 2007). En: (http://www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/capitulo12.pdf).

ANEXOS

ANEXO A. MAPA DEL MUNICIPIO DE SAMPUÉS EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE.



ANEXO B. Formato guía para encuestar a propietarios de parcelas agrícolas en el municipio de Sampués, departamento de sucre.

Modificado de Grisales, T., *et al.*, 2003.

A. DATOS DEL LUGAR:

Fecha _____ Muestra N° _____
Municipio _____ Corregimiento _____ Parcela _____
Propietario _____ N° de hectárea _____

B. DESCRIPCIÓN DE LA PAECELA

Topografía: Plana Ondulada Quebrada Erosionada

Drenaje: Encharcada Inundada Bien drenada

Especies de pastos presentes _____

C. DATOS DE LA LEGUMINOSA CAJANUS CAJAN:

Estado de la leguminosa: _____

Nombre vulgar conocido: _____

Distribución de la leguminosa en la parcela: _____

Tipo de uso: _____

Otras leguminosas sembradas: _____

D. PROBLEMAS SANITARIOS

Insectos / plagas presentes: _____

Enfermedades comunes de las leguminosas: _____

Malezas predominantes: _____

E. PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

FERTILIZANTES O AGROQUÍMICOS UTILIZADOS.

Nombre	Dosis	Fecha de aplicación
_____	_____	_____

ANEXO C. Datos de las parcelas seleccionadas para el estudio.

Nombre	N°	Corregimiento	Propietario	Topografía	Drenaje	Extensión (hectárea)
San Isidro	1	Calle Larga	Luís Matías	Ondulada	Bien drenada	2
Las Manuelas	2	Calle Larga	Manuela Montes	Plana	Encharcada	1
La Granja	3	Calle Larga	Valeria Polo Mora	Plana	Bien drenada	½
El Retiro	4	Calle Larga	Duval Martínez	Plana	Bien drenada	1
Los Martínez	5	Calle Larga	Eniano Martínez	Plana	Bien drenada	½
La Cantaleta	6	Calle Larga	Gabriel Tovar	Ondulada	Bien drenada	3
Bocagrande	7	Calle Larga	Gabriel Tovar	Ondulada	Encharcada	3
Corozalito etapa 1	8	Achiote	Bentura Pérez	Plana	Bien drenada	1
Corozalito etapa 2	9	Achiote	Hernán Pérez	Plana	Bien drenada	½
Aguilar etapa 2	10	Achiote	Tilso José Bolívar	Plana	Bien drenada	½
Aguilar 1	11	Achiote	Patricia Martínez	Plana	Bien drenada	½
Doña Librada	12	Achiote	Librada Polo	Plana	Bien drenada	½
No específico	13	Achiote	Luz Dary Montes	Plana	Bien drenada	2
El Palmar	14	Achiote	Custodio Pérez	Plana	Bien drenada	1
Terrenal	15	Piedras Blancas	Ana Contreras	Plana	Bien drenada	½
Benturera etapa 1	16	Piedras Blancas	Luís Ludueñas	Plana	Bien drenada	1
El Solar etapa 1	17	Piedras Blancas	José Contreras	Plana	Bien drenada	1
No específico	18	Piedras Blancas	Ciro Hernández	Plana	Bien drenada	2
El Solar etapa 2	19	Piedras Blancas	Rafael Contreras	Plana	Bien drenada	1
No específico	20	Piedras Blancas	Julio Guevara	Plana	Bien drenada	½
Benturera etapa 2	21	Piedras Blancas	Luís Ludueñas	Plana	Bien drenada	1

ANEXO D. Formato guía para evaluar la morfología de nódulos presentes en raíces de *Cajanus cajan*.

Parcela agrícola: _____ Muestra N°: _____
Fecha: _____

CARACTERÍSTICAS EXTERNAS:

A. Color: _____

B. Forma: _____

___ clava ___ lobular ___ largo ___ ramificados ___ esféricos

C. Tamaño.

Diámetro promedio de los nódulos: _____

D. Distribución:

___ Raíz principal ___ Raíces laterales

E. Tipo de nodulación.

___ Nodulación en corona ___ nodulación baja ___ nodulación de raíz lateral

F. Número: _____

CARACTERÍSTICAS INTERNAS

A. Color: _____

OBSERVACIONES ADICIONALES:

ANEXO E. Datos de la leguminosa empleada en la investigación

Parcela Nº	Nombre vulgar	Uso	Otros cultivos	Pastos presentes	Fertilizantes/ agroquímicos
1	Guandú	Alimentación humana y de animales	Fríjol y habichuela	Cocuyo y faragua	Ninguno
2	Guandú	Alimentación humana	Yuca y ñame	Ninguno	Olva y Gramosson
3	Guandú	Alimentación humana.	ají	Ninguno	Ninguno
4	Guandú	Alimentación humana.	Yuca, ñame, y maíz	Ninguno	Ninguno
5	Guandú	Alimentación humana.	Yuca, ñame, y frutales	Ninguno	Ninguno
6	Guandú	Alimentación humana y forraje.	Yuca, ñame, y fríjol.	Ninguno	Ninguno
7	Guandú	Alimentación humana y forraje.	Ñame, plátano y maíz	Ninguno	Ninguno
8	Guandú	Alimentación humana y de aves	Maíz, ñame, y yuca	Ninguno	Ninguno
9	Guandú	Alimentación humana.	Maíz	Ninguno	Ninguno
10	Guandú	Alimentación humana y de animales	Maíz y frutales	Ninguno	Ninguno
11	Guandú	Alimentación humana.	Yuca, ñame y frutales	Ninguno	Ninguno
12	Guandú	Alimentación humana y de animales	Yuca, ñame y maíz	Ninguno	Ninguno
13	Guandú	Alimentación humana y forraje.	Ñame	Ninguno	Ninguno
14	Guandú	Alimentación humana y forraje.	Yuca, ñame y frutales	Ninguno	Ninguno
15	Guandú	Alimentación humana	Fríjol y plátano	Ninguno	Ninguno
16	Guandú	Alimentación humana y de animales	Maíz, frutales y yuca,	Ninguno	Ninguno
17	Guandú	Alimentación humana y de animales	Yuca, ñame y ají	Ninguno	Ninguno
18	Guandú	Alimentación humana	Plátano, fríjol y maíz	Ninguno	Ninguno
19	Guandú	Alimentación humana y de animales	Yuca, ñame y frutales	Ninguno	Ninguno
20	Guandú	Alimentación humana y de animales	Frutales	Ninguno	Ninguno
21	Guandú	Alimentación humana y de animales	Frutales, fríjol	Ninguno	Ninguno

ANEXO F. Datos de la evaluación morfológica de nódulos.

Parcela Nº	Nº promedio	Diámetro promedio (mm)	Distribución	Forma	Tamaño	Color externo	Color interno	superficie
1	35	1.5 – 2.0	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 4.0	Café oscuro	Rojo - rosado	Liso
2	23	1.5 – 2.0	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 4.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
3	32	2.0 – 2.5	Raíz lateral	Ramificados	4.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo – rosado Algunos verde	Costroso
4	25	1.0 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	2.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
5	12	1.5 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
6	27	2.0 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	4.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
7	25	1.5 – 2.5	Raíz lateral	Ramificados	3.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
8	27	1.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
9	9	1.5 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo – rosado, café oscuro	Liso
10	17	1.0 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	2.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
11	22	1.5 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Costroso
12	24	1.5 – 2.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0 – 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso

13	5	0.5 - 1	Raíz principal	Esféricos	2.0	Café claro (raíz vecina)	Rosado	Liso
14	21	1.5 - 2.5	Raíz lateral	Esféricos	3.0 - 5.0	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
15	31	0.5 - 0.75	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.5	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Liso
16	27	0.5 - 0.85	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.7	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Costroso
17	7	0.5 - 0.6	Raíz lateral	Lobular	1.0	Café claro (raíz vecina)	Rosado	Costroso
18	30	0.5 - 0.6	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.2	Café oscuro	Rojo - rosado	Costroso
19	29	0.5 - 0.6	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.2	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Costroso
20	15	0.5 - 0.75	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.5	Café oscuro	Rojo - rosado	Liso
21	25	0.5 - 0.6	Raíz lateral	Largos	1.0 - 1.2	Café claro (raíz vecina)	Rojo - rosado	Costroso

ANEXO G. Formato guía para la determinación taxonómica de géneros *Rhizobium*
y/o *Bradyrhizobium*

Tomado de Pérez A., 2003

Parcela agrícola N°: _____ Zona N°: _____ Corregimiento: _____
Cepa: _____

OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS

A. Forma de La colonia

Redonda Irregular

B. Diámetros de La colonia (mm) _____

C. Color de la colonia: _____

D. Consistencia de la colonia: _____

Mucilaginosa Suave Gomosa Seca

E. Borde:

Liso Irregular

F. Elevación de La colonia:

Elevada plana Convexa Pulvinada

G. Reacción con azul de Bromotimol

Amarillo Azul

H. Tiempo de aparición de la colonia: _____

OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

A. Tamaño de la bacteria:

Ancho (μ): _____ Largo (μ): _____

B. Forma de la bacteria:

Células esferoidales Células alargadas
 Células elipsoidales Células irregulares

ANEXO H. Análisis físico – químico de los suelos de las parcelas agrícolas en estudio del municipio de Sampués por zonas.

ZONA 1. Calle larga

PARCELA	DETERMINACIÓN	VALOR	INTERPRETACIÓN
1	pH (Agua 1:1 p/v)	6.45	Ligeramente ácido
	% Materia orgánica	2.67	C
	% Nitrógeno total	0.1335	Medio
	Fósforo (ppm). Bray II	46.92	B
	Potasio (meq/100 g suelo)	1.04	A
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
2	pH (Agua 1:1 p/v)	6.40	Ligeramente ácido
	% Materia orgánica	2.87	C
	% Nitrógeno total	0.1435	Medio
	Fósforo (ppm). Bray II	49.19	B
	Potasio (meq/100 g suelo)	2.24	C
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
3	pH (Agua 1:1 p/v)	6.08	Medianamente ácido
	% Materia orgánica	1.60	D
	% Nitrógeno total	0.080	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	30.52	B
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.7	B
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
4	pH (Agua 1:1 p/v)	5.66	Medianamente ácido
	% Materia orgánica	1.74	D
	% Nitrógeno total	0.087	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	5.49	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.52	B
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
5	pH (Agua 1:1 p/v)	5.95	Medianamente ácido
	% Materia orgánica	1.83	D
	% Nitrógeno total	0.0915	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	32.80	B

	Potasio (meq/100 g suelo)	0.50	B
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
6	pH (Agua 1:1 p/v)	5.49	Fuertemente ácido
	% Materia orgánica	2.16	C
	% Nitrógeno total	0.108	Medio
	Fósforo (ppm). Bray II	20.50	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.27	C
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
7	pH (Agua 1:1 p/v)	6.60	Muy ligeramente ácido
	% Materia orgánica	1.30	D
	% Nitrógeno total	0.0652	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	16.40	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.88	C
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
ZONA 2. Achiote			
1	pH (Agua 1:1 p/v)	6.66	Muy ligeramente ácido
	% Materia orgánica	1.66	D
	% Nitrógeno total	0.083	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	22.32	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.68	B
	Textura (M. Bouyoucos)	F.	Franco
2	pH (Agua 1:1 p/v)	6.14	Medianamente ácido
	% Materia orgánica	1.97	D
	% Nitrógeno total	0.0985	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	31.43	B
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.68	B
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco arcilloso
3	pH (Agua 1:1 p/v)	7.03	Casi neutro
	% Materia orgánica	1.86	D
	% Nitrógeno total	0.093	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	22.32	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.60	E
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar	Franco Arcilloso

4	pH (Agua 1:1 p/v)	6.67	Muy Ligeramente ácido
	% Materia orgánica	1.83	D
	% Nitrógeno total	0.0915	Bajo
	Fósforo (ppm). Bray II	121.62	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	3.55	M.E
	Textura (M. Bouyoucos)	A. F	Arenoso Franco

5	pH (Agua 1:1 p/v)	6.25	Ligeramente ácido
	% Materia orgánica	2.25	C
	% Nitrógeno total	0.1125	C
	Fósforo (ppm). Bray II	25.05	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	1.23	E
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar	Franco Arcilloso

6	pH (Agua 1:1 p/v)	6.08	Medianamente ácido
	% Materia orgánica	1.77	D
	% Nitrógeno total	0.0885	D
	Fósforo (ppm). Bray II	20.50	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	1.04	A
	Textura (M. Bouyoucos)	F. Ar	Franco Arcilloso

7	pH (Agua 1:1 p/v)	6.27	Ligeramente ácido
	% Materia orgánica	1.74	D
	% Nitrógeno total	0.087	B
	Fósforo (ppm). Bray II	19.13	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.73	A
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar.A	Franco Arcilloso Arenoso

ZONA 3. Piedras Blancas

1	pH (Agua 1:1 p/v)	6.31	Ligeramente Ácido
	% Materia orgánica	1.74	D
	% Nitrógeno total	0.085	
	Fósforo (ppm). Bray II	18.68	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.73	A
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar	Franco Arcilloso

pH (Agua 1:1 p/v)	6.29	Ligeramente Ácido
-------------------	------	-------------------

2	% Materia orgánica	1.69	D
	% Nitrógeno total	0.0845	
	Fósforo (ppm). Bray II	79.26	A
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.68	B
	Textura (M. Bouyoucos)	Ar	Arcilloso
3	pH (Agua 1:1 p/v)	6.56	Ligeramente Ácido
	% Materia orgánica	1.69	D
	% Nitrógeno total	0.0845	
	Fósforo (ppm). Bray II	51.93	A
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.93	A
	Textura (M. Bouyoucos)	Ar	Arcilloso
4	pH (Agua 1:1 p/v)	6.29	Ligeramente Ácido
	% Materia orgánica	2.11	C
	% Nitrógeno total	0.1055	
	Fósforo (ppm). Bray II	22.78	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	1.83	E
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar	Franco Arcilloso
5	pH (Agua 1:1 p/v)	6.00	Medianamente Ácido
	% Materia orgánica	2.02	C
	% Nitrógeno total	0.101	
	Fósforo (ppm). Bray II	20.04	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	1.18	A
	Textura (M. Bouyoucos)	Ar	Arcilloso
6	pH (Agua 1:1 p/v)	6.37	Ligeramente Ácido
	% Materia orgánica	2.11	C
	% Nitrógeno total	0.1055	
	Fósforo (ppm). Bray II	26.42	C
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.87	A
	Textura (M. Bouyoucos)	Ar	Arcilloso
7	pH (Agua 1:1 p/v)	6.05	Medianamente Ácido
	% Materia orgánica	1.97	D
	% Nitrógeno total	0.0985	
	Fósforo (ppm). Bray II	44.64	B
	Potasio (meq/100 g suelo)	0.89	A
	Textura (M. Bouyoucos)	F.Ar	Franco Arcilloso

**ANEXO I. Protocolo de preparación del medio de aislamiento para rizobios
EL-MARC**

1. Se pesan por separado 10.0 gr de manitol; extracto de levadura 4.0 gr; K_2PHO_4 0.5 gr; $MgSO_4$ 0.2 gr; NaCl 0.1 gr; agar 15 gr; rojo Congo 81 gr/400 ml de agua destilada en cantidad de 10 ml para un litro de medio,
2. Se mezclan todos los reactivos y el pH es ajustado a 6.8.
3. Finalmente se somete a calentamiento por espacio de 3-4 minutos.