

ESTUDIO COMPARATIVO  
PARA  
SELECCION DE CEPAS  
DE  
RHIZOBIUM PHASEOLI  
EN  
INVERNADERO



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE AGRICULTURA

ESTUDIO COMPARATIVO PARA SELECCION  
DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI EN  
INVERNADERO

T E S I S

RICARDO LAZO DE LA VEGA WESTRUP.

GUADALAJARA, JALISCO

1974

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE AGRICULTURA

ESTUDIO COMPARATIVO PARA  
SELECCION DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI  
EN INVERNADERO

RICARDO LAZO DE LA VEGA WESTRUP

INGENIERO AGRONOMO

1974

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE  
SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE:       ING. GUSTAVO CORTEZ GODINEZ  
SECRETARIO:        ING. JOSE ALATORRE DIAZ  
DIRECTOR TESIS:    ING. RIGOBERTO PARGA IÑIGUEZ  
ASESOR:            ING. JULIO ESPINOZA HIDALGO  
ASESOR:            ING. ANTONIO ALVAREZ GONZALEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA  
ANDERSON, CLAYTON & CO., S.A.  
PLANTA DE INOCULANTES GUADALAJARA

SUSTENTANTE

RICARDO LAZO DE LA VEGA WESTRUP

HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO AL  
Q.F.B. EDWIN RAYMOND KEDILHAK N.  
QUIEN HIZO POSIBLE LA REALIZACION  
DE ESTE ESTUDIO.

A MIS PADRES  
CON CARIÑO

A MIS HIJAS  
CON CARIÑO

A ROCIO  
CON AMOR

A MIS MAESTROS  
CON RESPETO

## INDICE

=====

CAPITULO		PAGINA
1.-	Introducción	1
2.-	Historia	2
3.-	Materiales y Métodos	20
4.-	Discusión de Resultados	36
5.-	Conclusiones	48
6.-	Bibliografía	50

## 1.- INTRODUCCION

=====

El objetivo de la presente investigación, fué la selección de cepas de *Rhizobium phaseoli* efectivas, de la colección de cepas que tiene aisladas Anderson, Clayton & Co., S. A., con las cuales preparar Inoculante para Frijol con calidad uniforme y conocida, para lo cual se utilizaron técnicas de invernadero con condiciones de temperatura, humedad y luminosidad controladas.

La evaluación de las cepas se hizo por número más probable (1) de bacterias con capacidad nodulogénica, peso de plantas y determinaciones de Nitrógeno (N<sub>2</sub>).

Los resultados se compararon contra los testigos y entre las distintas cepas probadas.

Se pudieron evaluar comparativamente las cepas distinguiéndose aquéllas con cualidades suficientes para poder ser utilizadas en la fabricación de inoculante comercial.



## 2.- HISTORIA

=====

Una de las maravillas de la naturaleza es la asociación simbiótica de ciertas bacterias con plantas leguminosas lo cual trae como resultado, la fijación de nitrógeno atmosférico. En 1886, dos científicos alemanes, Hellrigel y Wilfarth, reportaron su descubrimiento de que ciertas bacterias, posteriormente llamadas Rhizobia, penetraban en las raíces de plantas leguminosas jóvenes, induciendo la formación de nódulos en donde se lleva a cabo la simbiosis, por medio de la cual se fija el nitrógeno atmosférico y en los cuales combinan los hidratos de carbono con el nitrógeno atmosférico para formar compuestos orgánicos nitrogenados y así puede ser aprovechado por la planta. (2, 3, 5, 10, 11, 12, 16).

En condiciones normales los nitratos son la principal fuente de nitrógeno para la planta. En las prácticas agrícolas, los fertilizantes nitrogenados suministran nitratos y sales de amonio.

Cuando se cultivan plantas en soluciones, estas absorben nitratos, nitritos, sales de amonio, aminoácidos y otras formas de nitrógeno orgánico. Debe tenerse en cuenta que los nitritos en solución ácida son relativamente tóxicos para las plantas. (10)

En las células de las plantas, los nitratos son reducidos a amoníaco y a su vez se combinan con los ácidos grasos para formar aminoácidos.

Aunque el suelo es el habitat normal de Rhizobia, no siempre se encuentran presentes y muchas de las bacterias existentes, frecuentemente son de calidad inferior. La necesidad de agregar artificialmente estas bacterias, condujo a la creación de la industria de inoculante para leguminosas.

El cultivo de dichas bacterias en laboratorio para su aprovechamiento en la agricultura, comenzó poco tiempo después de que Beijerinck aislara el organismo causal de los nódulos de las leguminosas en 1888.

(3)

Los primeros intentos para el cultivo y aprovechamiento de Rhizobia como inoculante del suelo o de la semilla, obtuvieron poco éxito; aún así infinidad de laboratorios particulares y del estado (U. S. A.) prontamente estuvieron produciendo inoculantes Rhizobiales para su distribución a agricultores. Este período fué uno de grandes entusiasmos y decepciones, puntualizado por éxitos ocasionales, durante el cual hubo fabricantes con escasos conocimientos y un control de calidad que dejaba mucho que desear, es decir, el producto en sí nunca fué malo, lo que ocurrió fué que, comerciantes sin escrúpulos vieron una oportunidad dorada y queriendo sacarle el mayor provecho posible, llegaron a formarle una fama bastante inferior. Afortunadamente las vigorosas promociones crearon demanda y la industria de inoculantes para leguminosas sobrevivió. (3)

El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en México es de primordial importancia ya que actualmente se encuentran bajo cultivo dos millones doscientos mil hectá-

reas (2'200,000 Has), además de ser considerado como uno de los principales alimentos del pueblo mexicano.

Es de principal interés el aumento en producción y calidad de esta leguminosa y el método menos costoso para ello sería por medio de la aplicación de inoculantes, con tal motivo actualmente se está procurando la obtención de la mejor calidad posible de inoculante.

El presente trabajo intenta ser una pequeñísima aportación para el logro de este fin.

Pocos grupos de bacterias han sido tan extensamente estudiados como lo ha sido el género Rhizobia. Aparentemente, ha sido el único cambio significativo que ha resultado de la bacteriología. (9) A estas bacterias se les atribuye dos características significativas (2, 4, 5.)

- a) La habilidad de poder invadir las raíces de plantas leguminosas y estimular la producción de nódulos y
- b) La habilidad de poder establecer una relación simbiótica con la planta, la cual es evidente por medio de la fijación de nitrógeno atmosférico.

Lo primero es el único criterio para la existencia del género *Rhizobia* (Familia *Rhizobiaceae*), lo segundo es evidencia clara del prestigio que han alcanzado estas bacterias en la agricultura.

Desde hace tiempo se han establecido ciertos datos básicos sobre *Rhizobia*, aún así, los métodos de laboratorio para la detección de su abundancia en su hábitat natural son limitados. Contrario a reportes esporádicos de que se tiene noticia, es un hecho concluyente que sus propiedades simbiotizantes se limitan a la familia *leguminosae*. La habilidad de estas bacterias para formar nódulos es el único criterio aceptable para su identificación. Como agentes infecciosos, la relación de estas bacterias con su hospedera son anormales en comparación a los fitopatógenos y endotrofos. Finalmente la importancia de esta bacteria es ampliamente conocida y su cultivo y venta juegan un papel muy importante en el comercio agrícola.

(4)

## CITOLOGIA Y FISIOLOGIA DE LA CELULA RHIZOBIAL

=====

Nuestros conocimientos sobre Rhizobia, están restringidos a las llamadas cepas históricas cuyo número asciende a 20 especies contenidas en menos de 12 géneros vegetales.

Este rango limitado de nuestros conocimientos es aparente cuando se menciona que, a partir de 1930, más de 270 especies vegetales han sido empleadas en estudios de nodulación. A pesar de haber sido aisladas las Rhizobia a partir de nódulos de la mayoría de estas plantas, es sorprendente el número tan pequeño que han sido comprensiblemente estudiadas en el laboratorio.

(4, 16)

## CITOLOGIA

=====

La organización estructural del núcleo no ha sido definida con exactitud pero la presencia de substancias nucleares en las células Rhizobiales sí ha sido demostrada.

Aparentemente existe una gran variación en la estructura interna de diferentes Rhizobia (4, 16)

## CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y DE CULTIVO =====

Dentro de ciertos límites, Rhizobia constituye un grupo homogéneo de formas estrechamente relacionadas. Comunmente se determinan de crecimiento rápido a los cultivos de alfalfa, trébol, chícharo y frijol, debido a que producen turbidez en medio líquido y crecen bien en cultivo sólido en un lapso de 5 a 7 días. Los Rhizobia de crecimiento lento, requieren de 9 a 12 días o más para lograr el mismo desarrollo. (16)

Desafortunadamente desde un punto de vista práctico, características de cultivo, fisiológicas y bioquímicas, no se correlacionan con la habilidad de las cepas para beneficiar a la hospedera. No se han observado diferencias significativas en la composición química, actividades respiratorias y otras características, entre Rhizobia recientemente obtenidas a partir de nódulos y la misma cepa cultivada in vitro.

Datos recientes sobre la composición química de Rhizobia, muestran que, en base a materia seca, contienen de 52 a 55% de carbono y de 4 a 5% de nitrógeno- (2)

La mayor parte de los lípidos son insolubles en éter pero solubles en cloroformo; correspondientemente, los valores grasos, son de una cuantía mucho mayor que los encontrados en otras bacterias. Todas las cepas de Rhizobia tienen aproximadamente la misma tolerancia a la alcalinidad, pero se afectan de maneras diferentes por la acidez. (16)

#### RHIZOBIA COMO AGENTES DE INFECCION

\*\*\*\*\*

Literalmente Rhizobia son parásitos facultativos, aunque existe preferencia por parte de los investigadores a llamarlos simbiosis. En una relación efectiva entre Rhizobia y la planta hospedera el grado de parasitismo se atenúa debido al beneficio que obtiene la planta por la fijación de nitrógeno.

Afortunadamente, a la fecha, la evidencia nos indica que no es parásito, debido a que, cuando la fuente de carbohidratos solubles se elimina, se suprime la inva-



sión o destrucción de más tejido con la subsecuente paralización de la formación de nódulos.

Con el mismo criterio que la protogenicidad es elusiva a menos que se utilice el animal adecuado, la potencialidad de fijación de nitrógeno de una cepa Rhizobial es un enigma sin la ayuda de la hospedera adecuada. (4)

#### INFECCION

=====

Se reconocen ciertas bien definidas etapas en el desarrollo de la simbiosis. Durante la infección y formación del nódulo, el Rhizobia es el agresor, mostrando por el modus operandi de su entrada, diseminación, multiplicación y la incitación de la proliferación de tejidos. El período de madurez y función del nódulo es de equilibrio. Durante la decadencia del nódulo el Rhizobia es subordinado a la planta. Obviamente las divisiones entre estas etapas son algo vagas.

La entrada de Rhizobia a las raíces leguminosas, ocurre a través de la infección de los pelos radiculares,

rompimientos en los tejidos epidérmicos y corticales y heridas en el sitio de emergencia de las raíces laterales.

El mecanismo exacto de la penetración aún es algo -- -- obscuro. Ciertos datos, asocian la infección con la -- -- producción y extrusión en las raíces de una substancia estimuladora, al tiempo de la formación de la prime-- -- ra hoja verdadera. La infección de los pelos radícula -- -- res, es seguida inmediatamente por un alineamiento -- -- del Rhizobia dentro del filamento que procede a crecer directamente hacia la célula basal. Migraciones de -- -- Rhizobia del sitio de infección a la pared interior de la célula epidérmica requieren de 18 a 48 horas depen-- -- diendo de la especie vegetal. (4, 16)

#### NODULACION =====

Para que exista la posibilidad de que Rhizobia induzca la proliferación de las células corticales de la raíz, -

toplasma y núcleo, el incremento de vacuolas, el -  
arresto eventual de la división celular y la desaparición del núcleo. (16)

Varios investigadores han descrito un agrandamiento del núcleo en células recientemente infectadas y en células adyacentes a la vía de infección.

Naturalmente surge la pregunta respecto a la reacción clave que explique el estímulo del crecimiento de las células de la planta hospedera, que resultan en la formación del nódulo. La mera presencia de Rhizobia en las células radicales de la hospedera no es una explicación completa. Se ha supuesto que la formación de nódulos es consecuencia de la producción, acumulación y difusión de una o más sustancias resultantes de la interacción del citoplasma de la célula hospedera y el simbiote.

#### MADUREZ Y FUNCION DEL NODULO =====

Se han descrito dos tipos de nódulo con respecto a su-

origen. En el tipo de infección exógena, se limita a las células parenquimáticas. Aparte de los conductos capilares, la endodermis y demás tejidos dentro de la raíz no se encuentran directamente involucrados en su formación.

Se consideran 4 áreas generales en todos los nódulos:

- a) La porción exterior que consiste en una capa esponjosa de células del parénquima cortical con muy poco contenido y laxamente unidas;
- b) Dentro de esta corteza nodular, existe un sistema vascular periférico que une con el xilema primario de la raíz.
- c) En seguida se localiza el área bacteria que consiste en células vegetales llenas con Rhizobia;
- d) Una zona meristemática de pequeñas células compactas, en continua actividad divisoria, no contaminadas con Rhizobia, ubicada entre los extremos de las ramas vasculares y la zona in-

vadida de Rhizobium. En síntesis, un nódulo es, -  
agrupamiento sistemático y ordenado de tejido es-  
pecializado.

Siempre se ha tratado de dar cierto énfasis para sen-  
tar las diferencias inherentes entre nódulos efectivos  
e inefectivos. En general, los primeros tienen inte-  
riores rosados o rojizos, se encuentran sobre la raíz  
principal y laterales primarias y tienden a ser gran -  
des e irregulares. Los segundos en la misma planta,  
son comparativamente más pequeños, blancos, úni- -  
cos y diseminados en los extremos radicales. Sor---  
prendentemente, el desarrollo inicial de ambos tipos  
es igual.

A la fecha se han identificado tres pigmentos en nó- -  
dulos:

- a) Leghemoglobina (rosado)
- b) Legcholeglobina (verde)
- c) Legmethemoglobina (café)

Los principales puntos de nuestro conocimiento sobre Leghemoglobina se sumarizan como sigue:

- 1.- Químicamente es una hemoproteína, cuyo contenido es comparable a la de la hemoglobina de la sangre.
- 2.- La presencia de Leghemoglobina, es peculiar de la asociación simbiótica de leguminosas y Rhizobia y su ocurrencia es única ya que no ha sido encontrada en vegetales ni es producida independientemente por éstos ni por Rhizobia.
- 3.- Esfuerzos por detectar Leghemoglobina en Azotobacter, Clostridium y los nódulos de *Alnus s.p.* han sido negativos.
- 4.- La Leghemoglobina se encuentra únicamente en nódulos efectivos, durante la etapa activa de fijación de nitrógeno y es considerada indispensable para la fijación de nitrógeno.
- 5.- La presencia de Leghemoglobina, en cantidades detectables en nódulos efectivos, coincide -

con la diferenciación de la zona bacterial y nunca la precede.

Unicamente se puede demostrar su presencia en las células llenas de Rhizobia, no se encuentran en la zona meristemática, la corteza del nódulo, las células no invadidas dentro de la zona bacterial ni en las células Rhizobiales.

- 6.- Respecto al origen, es concluyente que la Leghemoglobina es un producto de la simbiosis y existe una correlación positiva entre la cantidad presente y la efectividad del Rhizobia.
- 7.- No existe relación entre la presencia de cuerpos Rhizobiales amorfos e inflamados y la producción de Leghemoglobina en nódulos efectivos.
- 8.- No se obtiene fijación de nitrógeno con bacterias Rhizobiales libres en presencia de Leghemoglobina.

Se han propuesto 3 papeles posibles de la Leghemoglobina:

- a) Participa en las primeras etapas de fijación de nitrógeno a través de su átomo trivalente de hierro que oxide la molécula de nitrógeno.
  - b) Actúa como un portador de oxígeno.
  - c) Funciona en las etapas avanzadas del proceso de fijación en la conversión de nitratos a amoníaco.
- (4)

#### SENECTUD Y DEGENERACION DEL NODULO

=====

Los conocimientos de las causas de la decadencia del nódulo son desgraciadamente muy escasos. Las explicaciones de la pérdida del nódulo, más comúnmente aceptadas son:

La fructificación de la planta, cambio repentino de sequía a humedad excesiva, poda de parte superior de la planta y la falta de fotosíntesis adecuada.

En nódulos efectivos, la transición de Leghemoglobina a Legcholeglobina (verde), es aceptado como una indicación de la cesación de la fijación de nitró-



geno, esto se basa principalmente en que esta trans -  
formación es irreversible. La desaparición del ácido  
oxalacético así como la cesación de la fijación de ni -  
trógeno, permite el cambio de Leghemoglobina a - - -  
Legmethemoglobina (café). (4)

### 3.- MATERIALES Y METODOS

=====

#### Procedimientos Generales de Invernadero

-----

##### I.- Preparación de las Charolas de germinación.

Las charolas de germinación se preparan de la siguiente manera:

- a) Esterilización: Se cubren primero con papel aluminio y luego se coloca la tapadera de latón; se envuelven en papel o se meten en bolsas adecuadas para esterilización. Se esterilizan a 120 grados centígrados con 20 lbs. de presión durante 20 minutos.
- b) Preparación del Medio: Para las charolas se prepara Agar al 1.5%, el cual se esteriliza antes de vaciar.
- c) Vaciado: El medio estéril se vacía en las charolas previamente esterilizadas, en condiciones estériles, (mesa lavada con benzal, mechero y todas las precauciones necesarias).

Existen dos tamaños de charolas: unas grandes con división en medio y otras chicas sin división. A las charolas grandes se vacía la cantidad de 150 mililitros de Agar al 1.5% en cada uno de los lados, a las charolas chicas se vacía una cantidad de 300 mililitros de Agar al 1.5%.

- d) Prueba de esterilidad: Las charolas ya preparadas con Agar deben de permanecer durante 48 horas en algunas de las estufas o en el cuarto-estufa a 20 grados centígrados. Ya pasada la prueba de esterilidad pueden conservarse dichas charolas en el refrigerador envueltas con papel hasta su uso. (8)

## II.- Preparación y germinación de semilla

-----

Esterilización: Se selecciona la semilla para el experimento y se esteriliza de la siguiente manera: (1)

- a) Se colocan las semillas en cajas de Petri -  
utilizando tantas como sean necesarias pa-  
ra la cantidad de semilla requerida para la  
prueba. Debe utilizarse únicamente la se-  
milla necesaria para cubrir el fondo de las  
cajas, las cuales deben ser estériles.
- b) Se cubren las semillas con alcohol etílico-  
durante 5 minutos sin agitar. Pasado los -  
5 minutos se decanta.
- c) Se agrega cloruro mercurico al 1 por -, -  
1,000 en cantidad suficiente para cubrir --  
todas las semillas durante 5 minutos, agi -  
tando levemente, pasado los 5 minutos se -  
decanta.
- Los tres pasos anteriores, se hacen fuera-  
de la zona del mechero, pero en condicio--  
nes de limpieza. El siguiente paso debe - -  
hacerse ya en la zona del mechero.
- d) Se lavan las semillas 10 veces con agua es-  
téril. El procedimiento para cada lavado es

el siguiente: Se cubren las semillas con -  
agua estéril y se agitan con movimiento -  
circular 20 veces. Se decanta y repite nue-  
ve veces.

- e) Terminadas las 10 lavadas se cubren nue-  
vamente las semillas con agua y se dejan-  
en reposo durante 2 horas. Es convenien-  
te llenar totalmente el recipiente con agua  
para evitar que se sequen las semillas an-  
tes de que terminen las 2 horas. Pasado es-  
te lapso se decanta el agua y las semillas -  
quedan listas para pasarse a las charolas -  
de germinación.

NOTA: Las condiciones del invernadero . -  
fueron totalmente controladas, la tempera-  
tura se mantuvo entre 20 y 26 grados cen -  
tígrados, la humedad relativa se mantuvo -  
entre 55-65%, la luminosidad fué constante  
durante 16 horas diarias habiéndose utiliza -  
do lámparas Glo-Lux G.E.

### Germinación.-

Las semillas previamente esterilizadas se siembran en las charolas de germinación de la siguiente manera: En primer lugar todo el procedimiento de siembra debe efectuarse en condiciones estériles. Con cuidado se quita la tapadera de latón y se levanta el papel aluminio con pinzas se colocan las semillas en columnas de diez, separadas cada una por medio centímetro aproximadamente. Las columnas de semillas necesarias para llenar cada charola varía con el tamaño de las semillas, pero aproximadamente deben haber de 100 a 150 semillas grandes en las charolas chicas y de 80 a 100 en cada uno de los lados de las charolas grandes.

Terminada la colocación de las semillas se vuelven a colocar el papel aluminio y la tapadera de latón. Se pasan a la estufa a 26 grados centígrados para su germinación.

El tiempo necesario para la germinación en -  
éste caso es de aproximadamente 24 horas. -

(1)

III.- Siembra de semillas germinadas en frascos -  
-----

de Leonard.  
-----

- 1.- Siembra de semillas: Los frascos se etiquetan antes de empezar el experimento. La etiqueta debe llevar la fecha de siembra, especie de la planta, lote de inoculante o número de cepa utilizada. Los frascos deben ser estériles y contener solución nutritiva.
- 2.- Para sembrar las semillas se utilizan pinzas estériles y todo el trabajo se efectúa junto al mechero. Se quita la tapadera del papel aluminio del frasco de Leonard y con las pinzas se remueve un poco la -

arena, haciendo una depresión poco profunda en el centro para colocar las semillas.

3.- Se flamean las pinzas tomándose las semillas de una en una y se colocan en el frasco, ~~teniendo cuidado en cada caso de~~ colocar las semillas por pares.

4.- Las semillas se inoculan con un mililitro en cada frasco de la dilución correspondiente del inoculante o cepa que se van a utilizar. En caso de ser cepas, estas han sido conservadas en refrigeración de 2 a 4 grados centígrados en medio de Agar-Manitol. Previamente a la inoculación de las semillas, se recupera la cepa con 10 mililitros de s.s.i. (7)

Se inocula en proporción 1:50 en medio líquido de extracto de levadura-manitol,(7) se deja incubar 48 horas para obtener



una población máxima en fase estacionaria.

Esta operación se efectúa con pipeta de un mililitro. Una vez inoculadas las semillas se cubren con la arena estéril, se coloca la cantidad suficiente de arena para cubrir totalmente la semilla, terminado este paso se vuelve a colocar la tapa de papel aluminio y se repite el procedimiento con cada uno de los frascos.

Ya sembrados e inoculados los frascos, deben ser colocados sobre una mesa fuera de la luz hasta que broten las plantas.

Ya brotadas todas las plantas se coloca la mesa debajo de las lámparas a una distancia de 15 pulgadas, tomándose como punto de referencia la punta de la planta más alta. Esta distancia debe mantenerse durante todo el experimento.(2,8).

IV.- Colocación de los frascos sobre la mesa de -----

Invernadero  
-----

a) Pruebas estadísticas para determinar el número más probable (NMP) de bacterias por gramo de inóculo. (1)

Para éstas pruebas generalmente se utilizan 6 grupos de 8 frascos cada uno. 4 grupos corresponden a las diferentes diluciones utilizadas y 2 corresponden a los testigos, uno positivo (Se agrega al testigo positivo la cantidad de nitrógeno óptima para el buen desarrollo del cultivo por medio de la adición de  $K_2NO_3$ ) y uno negativo. Esto dará un total de 48 frascos que se colocan en la mesa.

b) Pruebas para determinar la capacidad nodulogénica y fijación de nitrógeno en las plantas: (2, 5, 10, 11, 12, 16). Para ésta prueba se colocan hasta diez unidades de 8 frascos ca-

da una sobre la mesa. 8 unidades corres-  
ponden a diferentes cepas y 2 correspon-  
den a los testigos positivo y negativo, es-  
decir, que en cada mesa se pueden probar  
8 cepas.

V.- Cuidado de las plantas durante el tiempo que dura

---

el experimento

---

El experimento puede durar de 4 a 6 semanas -  
según el estado general de las plantas y la dife-  
rencia entre testigos negativos y problemas. -  
Durante este período deben revisarse diaria--  
mente las plantas para observar y anotar cual -  
quier cambio en su desarrollo si se llegara a -  
presentar. También deben revisarse diaria--  
mente las lámparas para que su funcionamiento  
sea correcto. Deben ajustarse también según -  
el crecimiento de las plantas, la altura de las -

lámparas para que siempre estén a 15 pulgadas de distancia de la punta de la planta más alta. (2)

Muchas veces la planta crece demasiado y no puede sostenerse por sí misma por lo que se coloca un soporte de madera.

Este se adhiere al frasco de Leonard con cinta scotch y ligas procediendo luego a enredar la planta de ésta. Por lo general pasada la tercer semana empieza a terminarse la solución nutritiva de los frascos, por lo que se deben regar las plantas evitando así que sequen. Se riegan diariamente con 10 mililitros de solución nutritiva estéril. (6)

#### VI.- Preparación de soluciones nutritivas y reactivos

---

para el Invernadero. (1,6,8,13)

---

##### a) Solución Nutritiva:

Stocks

1o.- Stock de Magnesio

Mg Cl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub> O            17.82 Gs. X 100 ml.

Mg SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub> O            25.65 Gs. X 100 ml.

2o.- Stock de Potasio

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    16.47 Gs. X 100 ml.

K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>                    8.235 Gs. X 100 ml.

3o.- Stock de Fierro

Quelato de Fe            2.0 Gs. X 100 ml.

Este reactivo deberá renovarse por lo menos cada dos semanas pues tiende a contaminarse con facilidad.

4o.- Stock de elementos menores

Mn Cl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub> O            3.62 Gs. X 1,000 ml.

H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub>                    2.86 Gs. X 1,000 ml.

Cu SO<sub>4</sub>                    0.16 Gs. X 1,000 ml.

Zn SO<sub>4</sub>                    0.22 Gs. X 1,000 ml.

Mo O<sub>3</sub>                    0.09 Gs. X 1,000 ml.



- 2o.- Oxido de Mercurio o Mercurio Metálico grado - reactivo libre de nitrógeno.
- 3o.- Sulfato de Potasio grado reactivo libre de nitrógeno.
- 4o.- Acido Salicílico grado reactivo libre de nitrógeno.
- 5o.- Solución de Tiosulfato de Sodio (solución de 80 - Grs. de Tiosulfato por litro).
- 6o.- Hidróxido de Sodio libre de nitrógeno (450 Grs.- por litro)
- 7o.- Gránulos de Zn. grado reactivo.
- 8o.- Rojo de metilo como indicador (Un gramo de rojo de metilo en 200 mililitros de agua)
- 9o.- Un standard de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico de 0.5 normal o 0.1 cuando la cantidad de nitrógeno es pequeña.
- 10o.- Standard de hidróxido de sodio 0.1 normal.

Procedimiento:

Pesar la muestra y que el peso esté entre 0.7 -

y 2.2 gramos.

Añadir 0.7 gramos de óxido de mercurio, 10 -  
gramos de sulfato de potasio y 25 mililitros de  
ácido sulfúrico, si el peso de la muestra es -  
mayor que 2.2 gramos, se aumenta la canti --  
dad de ácido sulfúrico, 10 mililitros por gra--  
mo de muestra. Poner a digerir durante 30 -  
minutos o más si es necesario hasta que el lí-  
quido esté completamente cristalino.

Enfriar y añadir aproximadamente 700 milili -  
tros de agua fría y 25 mililitros de tiosulfato,  
unos gránulos de zinc y algunas perlas de vi --  
drio para facilitar la ebullición y 75 mililitros  
de la solución de hidróxido de sodio. Poner a-  
destilar, recibiendo el destilado en 25 o 50 mi -  
lilitros de ácido clorhídrico 0.1 normal, agre-  
gar unas gotas de rojo metilo, destilar sufi --  
ciente volumen hasta completar 150 mililitros-  
del destilado. El destilado se titula con la so--  
lución de hidróxido de sodio 0.1 normal, em--



pleando rojo de metilo como indicador, al mismo tiempo se corre un blanco utilizando solo reactivos.

Cálculos.-

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(B-S) (N) (0.014) (100)}{\text{Peso de la muestra}}$$

B = Mililitros de hidróxido de sodio empleados en la titulación en blanco

S = Mililitro de hidróxido de sodio empleado de la titulación del problema

#### 4.- DISCUSION DE RESULTADOS

=====

Al término de 4 semanas de establecido el cultivo de frijol en los frascos de Leonard, se procedió a la lectura de nodulación. Como se estableció cada cepa con cuatro diluciones, ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ) con cuatro repeticiones, se consideró la dilución menor, asumiendo que las condiciones de la prueba, permitirían a una (única) célula Rhizobial, la multiplicación y la subsecuente producción del nódulo. El número más probable (NMP) (3) de Rhizobia se pudo determinar, a partir de la tabla de Fisher y Yates \* (Tabla adjunta) con la aplicación de la fórmula NMP por ml. de cultivo =  $\frac{m \times d}{v}$  en la que:

m = NMP de Tablas

d = Menor dilución de la serie

v = Volumen de la alicuota

Los resultados que se obtuvieron se muestran a continuación en el Cuadro No. 1

CEPA No.	NODULACION NMPX10 <sup>6</sup>
1	< 700*
2	< 700*
3	< 700*
4	< .06
5	0.17
6	< .06
7	> 700*
8	< .06
t-	
t+	
9	> 700*
10	< 0.6
11	1.7
12	> 700*
13	17
t-	
t+	

CUADRO No. I

En este cuadro aparecen marcadas con un asterís -  
 co las cepas que, tomando en consideración unica -  
 mente el número mas probable (NMP) de bacterias  
 nodulogénicas, aparentemente fueron las mejores.  
 Obviamente éstas cepas que tuvieron más de 700 -  
 millones de bacterias nodulogénicas por mililitro -  
 de cultivo, mostrando una nodulación bastante bue -  
 na.

Cálculo del Número más probable (NMP)

Número de unidades positivas cuando han sido probadas en		Número más probable en la alicuota de la di-
Duplicado	Cuadruplicado	lución menor.
8	16	700
	15	700
7	14	690
	13	340
6	12	180
	11	100
5	10	59
	9	31
4	8	17
	7	10
3	6	5.8
	5	3.1
2	4	1.7
	3	1.0
1	2	0.58
0	1	0.5
	0	

$$\text{NMP por ml. de cultivo} = \frac{m \times d}{v}$$

m = NMP de Tablas

d = Menor dilución de la serie

v = Volumen de la alicuota

Sin embargo esto no quizo decir forzosamente -  
 que fueran buenas cepas fijadoras de nitrógeno,-  
 por lo cual se procedió en seguida a considerar  
 el peso promedio por planta (13), lo cual nos --  
 indicó, como se muestra en el cuadro No. II, -  
 que comparados los pesos contra el testigo po--

Cepa No..	P.P./Planta Gramos	P.P./Planta % t-	P.P./Planta % t+
1	2.28	116	54
2	1.91	97	45
3	2.72	138*	65
4	1.87	95	44
5	2.25	114	53
6	2.29	116	54
7	2.39	121	57
8	1.81	92	43
t-	1.96		
t+	4.18		
9	3.85	134*	54
10	3.20	112	45
11	3.00	105	42
12	2.92	102	41
13	2.95	103	41
t-	2.85		
t+	7.00		

CUADRO No. II

sitivo, todos dieron porcentajes menores de -  
100; sin embargo, considerando del 100 al 110%  
como malo (Cuadro No. VIII) y de 111 a 130% co-  
mo regular, unicamente hubo dos cepas que lo- -  
graron alcanzar pesos que se pueden considerar  
como buenos, es decir, por encima del testigo -  
negativo y se indican en este cuadro con un aste -  
risco (\*). Luego se procedió a determinar el con-  
tenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl, (13)  
considerando los pesos fresco y seco por separa -  
do. Los resultados, junto con las comparaciones  
en por cientos contra testigos negativos y positivos  
se muestran en los cuadros Nos. III, IV, V y VI.

\*NOTA: Se ha considerado que en suelos carentes-  
de nitrógeno las simbiósis a que nos estamos refi-  
riendo, suple en gran parte esta falta, teoricamen-  
te debería suplirla en su totalidad pero experimen-  
talmente hemos notado que no es así. (2, 5, 6, 10, 11,  
12, 16.)

Cepa No.	Mg N <sub>2</sub> /100g	%t(-)	%t(+)
	Fresco	Fresco	Fresco
1	2.64	100	75
2	3.97	150*	112*
3	3.42	129	97
4	2.50	94	71
5	2.64	100	75
6	2.50	94	71
7	3.66	138*	104*
8	2.57	97	73
t-	2.64		
t†	3.52		
9	3.70	165*	106*
10	2.24	100	64
11	2.24	100	64
12	3.30	147*	94
13	2.90	129	83
t-	2.24		
t†	3.48		

### CUADRO No. III

Cuadro No. III en el que se muestra miligramos de nitrógeno por 100 gramos de peso fresco y se muestran marcados como cepas buenas las Nos. 2, 7, 9 y 12; de las cuales la última es la única que no concuerda con los porcentajes altos en la comparación con testigo positivo.

Cepa No.	MgN <sub>2</sub> /Planta	MgN <sub>2</sub> /Planta	MgN <sub>2</sub> /Planta
	Seco	%t(-) Seco	%t(-) Seco
1	.0481	116	36
2	.0632	152*	47
3	.0843	204*	63
4	.0445	107	33
5	.0517	125	38
6	.0439	106	32
7	.0831	201*	62
8	.0387	93	29
t-	.0413		
t-	.1335		
9	.1293	226*	73
10	.0624	109	35
11	.0558	97	31
12	.0803	140*	45
13	.0725	126	41
t-	.0570		
t-	.1750		

CUADRO No. IV

Se consideraron las cepas que tuvieron rangos de -  
bueno a muy bueno en cada uno de los cuadros IV,-  
V y VI mostrados y que fueron los siguientes: -  
Cepas Nos. 1, 2, 3, 7, 9, 12 y 13. De los cuales - -



Cepa No.	MgN <sub>2</sub> /Planta	MgN <sub>2</sub> /Planta	MgN <sub>2</sub> /Planta
	Fresco	%t(-) Fresco	%t(-) Fresco
1	.0602	116	40
2	.0758	146*	51
3	.0930	179*	63
4	.0467	90	31
5	.0594	114	40
6	.0572	110	38
7	.0874	168*	59
8	.0465	89	31
t-	.0517		
t-	.1471		
9	.1424	222*	58
10	.0716	111	29
11	.0672	104	27
12	.0963	150*	39
13	.0855	133*	35
t-	.0638		
t-	.2436		

CUADRO No. V

son constantemente buenas las Nos. 2,3,7,9 y -  
12 unicamente.

En seguida se procede a hacer la evaluación de -  
cepas, considerando en conjunto los lugares que

Cepa No.	MgN <sub>2</sub> /100g. Seco	MgN <sub>2</sub> /100g. %t(-) Seco	MgN <sub>2</sub> /100g. %t(-) Seco
1	2.11	100	65
2	3.31	156*	103*
3	3.10	146*	96
4	2.38	112	74
5	2.30	108	71
6	1.92	90	60
7	3.48	164*	108*
8	2.14	101	66
t-	2.11		
t-	3.20		
9	3.36	168*	134*
10	1.95	97	78
11	1.86	93	74
12	2.75	137*	110*
13	2.46	123	98
t-	2.00		
t-	2.50		

CUADRO No. VI

ocupan en cada una de las determinaciones anteriores y comparando con las lecturas de nodulación.

ORDEN	MgN <sub>2</sub> /100g.		MgN <sub>2</sub> /Planta		P.P./Planta	NMP	
	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco		
1o.	9	9	9	9	3	1	
2o.	2	7	3	3	9	2	
3o.	12	2	7	7	7	3	Bueno
4o.	7	3	12	2	1	7	
5o.	3	12	2	12	6	9	
6o.	13	13	13	13	5	12	
						==	
7o.	1	4	1	5	10	13	
8o.	5	5	5	1	11	11	Regular
9o.	10	8	10	10	13	5	
						==	
10o.	11	1	6	4	12	4	
11o.	8	10	11	6	2	6	
12o.	4	11	4	11	4	8	Malo
13o.	6	6	8	8	8	10	

CUADRO No. VII

En el cuadro No. VII se han clasificado las cepas por su número más probable (NMP) en orden decreciente, considerando su capacidad nodulogénica. Estas se comparan con las demás determinaciones de acuerdo al lugar que ocupan en cada una de ellas, considerando a la vez la comparación con ambos testigos.

El siguiente cuadro (Núm. VIII) nos dá una idea más clara de la calidad de las cepas en cada una de las determinaciones, mostrando cada una de ellas dentro del rango que le corresponde.

Rango de %	MgN <sub>2</sub> /100g.		MgN <sub>2</sub> /Planta		P.P./Planta	
	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco	
0 - 100, 101- 110	1-5-10-11-8-4-6,	1-10-11-6 5-8	4-8 6-11	11-8 10-4-6	2-4-8 11-13-12	M
111- 120 121- 130	3-13	4 13	1-5-10	1 13-5	1-6-5-10 7	R
131- 140 141- 150	12-7 2	12 3	13 12-2	12	3-9	
151- 160 161- 170 171- 180		2 9-7	7	2		B
181-190 191-200 201-210 211-220 221-230 231-240			9	3-7 9		MB

CUADRO No. VIII

## 5.- CONCLUSIONES

=====

- 10.- La metodología empleada en la elaboración -  
del presente trabajo, resulta satisfactoria -  
para la evaluación comparativa de cepas de -  
Rhizobium phaseoli.
- 20.- De acuerdo con el resumen de resultados he -  
cho en el cuadro No. VIII, se consideraron -  
como las mejores cepas en capacidad nodulo -  
génica y de fijación de nitrógeno, las cepas -  
Nos. 2,3,7,9,12. (14)
- 30.- Habiendo considerado el rango en el cuadro -  
Núm. VIII y la capacidad nodulogénica, se -  
consideraron cepas regulares las Nos. 1,5 y  
13. (14)
- 40.- Las cepas Nos. 4,6,8,10 y 11 obviamente se -  
tuvieron que considerar como malas (14)
- 50.- De acuerdo con los puntos 20., 30., y 40., -  
debe concluirse que las cepas que pueden ser  
tomadas en cuenta para la fabricación de un -  
inoculante comercial para frijol, serán unica-

mente las que se clasificaron como buenas -  
(14)

6o.- El presente trabajo debe ser tomado como -  
un experimento preliminar y deberá ser ---  
confirmado posteriormente con otros simi--  
lares.

7o.- Sería conveniente hacer pruebas de campo -  
con las cepas consideradas como buenas, - -  
para asegurar que factores externos como--  
pH del suelo, temperaturas, flora y fauna -  
normal del suelo de cultivo, etc. no hagan -  
variar la efectividad simbiótica de estas ce-  
pas. (15)

## B I B L I O G R A F I A

-----

- 1.- Sankaram, A. (1959). The Proceedings of The Indian Academy of Sciences. Vol. L, No. 1, - Sec. B.
- 2.- Burris, H.R. (1956). Natural Products ---- Seminar Report No. 4.
- 3.- Vincent, J.M. (1965). Australian Studies of - The Root-Nodule Bacteria.
- 4.- Allen, E.K. and Allen, O.N. (1950). - - - - - Biochemical and Simbiotic Properties of The - Rhizobia.
- 5.- Wilson, P.W. and Burris, R.H. (1953) Biolo- gical Nitrogen Fixation.
- 6.- Burton, J.C. and Allen, O.N. and Burger, - - K.C. (1961). Effects of Certain Mineral Nutri- ents on Growth and Nitrogen Fixation of Inocu- lated Bean Plants.
- 7.- Allen, O.N. (1953) Agricultura Tropical. -- Vol. 9, No. 6
- 8.- Labandera, C. y Vincent, J.M. (1972). Impor- - tancia del Mantenimiento, Control Periódico y Selección Cualitativa de las Cepas de - - - - - Rhizobium, usadas en los Inoculantes Comer- - ciales.
- 9.- Sankaram, A. (1960). Science and Culture. - Vol. 25
- 10.- Allen, E.K. and Allen, O.N. (1958). Hand Book of Plant Phisiology.



- 11.- Nutman, P.S. (1956). Biological Reviews -  
Cambridge.
- 12.- Shields, L.M. (1953) Botanical Reviews.
- 13.- Sankaram, A. (1959). Studies on Selec -  
tion of Efficient Strains of Root Nodule -  
Bacteria.
- 14.- Jordan, D.C. (1952). Studies on The - -  
Legume Root Nodule Bacteria
- 15.- Leonard, L.D. (1938). Soil Science, ---  
Society of America. Proceedings 2.
- 16.- Postgate, J.R. (1971) The Chemistry -  
and Biochemistry of Nitrogen Fixation.