



Determinación serológica de la competitividad simbiótica entre *Bradyrhizobium sp.* Nativo eficiente y cepa patrón, inoculados en *Vigna unguiculata* “Caupí”

Serological determination of the symbiotic competition between *Bradyrhizobium sp.* native efficient and strain pattern, inoculated in *Vigna unguiculata* “Caupí”

Wilberto Effio^a; Manuela Luján^{a,*}; Bertha Soriano^a; Renzo Valdez^b; Gardenia Prado^c; David Zavaleta^c

a. Facultad de Microbiología y Parasitología (Universidad Nacional de Trujillo) Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo Perú.

b. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto.

c. Universidad César Vallejo, Piura.

*Autor para correspondencia: manuelitaluve@yahoo.es (M. Luján).

Recibido 22 mayo 2016. Aceptado 02 junio 2016

RESUMEN

Se determinó serológicamente la competitividad simbiótica, de una cepa nativa de *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 eficientemente simbiótica, comparándola con una cepa patrón *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71. La competitividad se evaluó mediante el porcentaje promedio de ocupancia de nódulos en *Vigna unguiculata* “Caupí”. Se prepararon jarras de Leonard modificadas, se agregó a cada jarra arena estéril y 3 semillas de Caupí germinadas; las semillas fueron inoculadas con cultivos de *Bradyrhizobium sp.*, CIAT 71 y RC 458-01, a una concentración de $1,2 \times 10^9$ bact./mL, formándose un inóculo mixto. Las jarras se colocaron durante 40 días a temperatura de 15° a 35°C y 40 a 80 % de humedad. Para la evaluación serológica se realizó la producción de anticuerpos de las dos cepas de *Bradyrhizobium sp.*, para lo cual se procedió a inmunizar en *Oryctolagus cuniculus* “conejo”, vía intramuscular 1 mL de antígeno de rizobios más 1 mL de adyuvante completo de Freund; a los 14 y 21 días se inoculó con 1 mL de antígeno de rizobios más 1 mL de adyuvante incompleto de Freund, posteriormente se tomaron muestras de sangre para la obtención del suero inmune. El porcentaje promedio de ocupancia de nódulos se determinó mediante aglutinación. Se encontró que la cepa *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 mostró el mayor porcentaje de ocupancia de nódulos de Caupí respecto a la cepa *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 simbióticamente eficiente en la fijación de nitrógeno. Al análisis estadístico mediante “t” student se encontró diferencia significativa entre. Se concluye que la cepa de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 es más competitiva simbióticamente en *Vigna unguiculata* “Caupí” respecto a la cepa de *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01.

Palabras clave: *Bradyrhizobium sp.*, competitividad simbiótica, *Vigna unguiculata* “Caupí”, Serología.

ABSTRACT

This research was oriented at determining serologically the symbiotic competitiveness, a native strain of *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 symbiotic efficiently, compared with a standard strain *Bradyrhizobium sp.* 71. CIAT. The competitiveness was evaluated by the average percentage of occupancy nodules in *Vigna unguiculata* “Caupí”. For which Leonard jars modified by adding to each flask treated sterile sand, and prepared 3 seeds germinated of Caupí; the seed were inoculated with *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 and RC 458-01 cultures, at a concentration of 1.2×10^9 bact./mL, forming a mixed inoculum. The jars were placed for 40 days at a temperature of 15 °C to 35 °C and 40 to 80% moisture. Also for serological evaluation of antibody production for these strains *Bradyrhizobium sp.* was performed. For which we proceeded to immunize *Oryctolagus cuniculus* “rabbit”, 1 mL for via intramuscular rhizobia antigen plus 1 mL Freund's complete adjuvant; at 14 and 21 days was inoculated with 1 mL rhizobia antigen plus 1 mL of incomplete Freund's adjuvant, then blood samples were taken for obtaining immune serum. The antibodies produced were used to determine the average percentage of occupancy of nodules by serological agglutination test. *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 found that strain showed the highest percentage of occupancy of nodules of “Caupí” that the *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 strain symbiotically efficient in nitrogen fixation. It was determined by statistical test “t” student significant difference between the two strains of *Bradyrhizobium sp.* evaluated. Therefore, it is concluded that the strain *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 proved to be more competitive than the *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 strain.

Keywords: *Bradyrhizobium sp.*, symbiotic competitiveness, *Vigna unguiculata* “Caupí”, serology.

1. Introducción

La degradación de los suelos es un problema ambiental y significa la reducción de la fertilidad física, química y biológica del suelo, actualmente una de las alternativas para mejorar la calidad del suelo y de la agricultura, es mediante la fijación biológica de nitrógeno; de los nutrientes minerales, el nitrógeno es cuantitativamente el más importante, ya que es el componente esencial de los aminoácidos y los ácidos nucleicos, vitales para la vida (Clark, 1996; Mayz, 2004). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es uno de los procesos de mayor importancia en la naturaleza, pues representa la utilización de un gas inerte como fuente para un grupo de microorganismos, los cuales son portadores de la enzima nitrogenasa convirtiendo el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado (López, 2002; Peña, 2000); el nitrógeno así fijado puede ser utilizado directamente por plantas de interés agrícola y forestal, constituyendo el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por los procesos microbianos de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco (Martin *et al.*, 2007).

La gran mayoría de leguminosas tiene la habilidad de asociarse en forma simbiótica con bacterias fijadoras de N₂, colectivamente llamadas rizobios, para obtener a través de la FBN gran parte del "N" que requieren para su crecimiento (INTA, 2006; Ribcón *et al.*, 2000). Esta asociación es controlada genéticamente tanto por la planta como por la bacteria y ocurre a través de una secuencia de estados de desarrollo que culminan en la formación de una estructura llamada nódulo (Mayz, 1997; Mayz, 2004). Las bacterias se alojan en el nódulo y utilizan el nitrógeno directamente del aire, siendo reducido en amoníaco y posteriormente en amonio. El amonio es posteriormente utilizado por la planta para formar el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas que finalmente se incorporan a la cadena trófica (Matos *et al.*, 1998; Barrientos *et al.*, 2002). La inoculación con cepas específicas de rizobios permite maximizar la fijación de nitrógeno e incrementar la producción de biomasa aprovechable (Urzua, 2000; Urzua *et al.*, 2001)

Las leguminosas son una enorme familia, con distribución en todo el mundo 15, en

América Latina se cultivan unas 15 especies de leguminosas de grano, de las cuales, 11 se siembran en Perú, donde se les conoce como menestras, ocupan cerca de 180000 hectáreas, en diversos ambientes de costa, sierra y selva (Valladolid y Voysest, 2006). Entre las leguminosas; el Cauquí, es uno de los pocos cultivos que no tienen problemas de madurez y secado de la cosecha, pues sus vainas impermeables, permiten el escurrimiento del agua y la conservación de los granos (Cubero, 2004). La variabilidad genética de los más importantes caracteres de interés agronómico de esta leguminosa es muy grande, por lo que hay gran variabilidad en cuanto a color de grano, ciclo vegetativo, capacidad de producción de grano y forraje, hábitos de crecimiento, tolerancia a la acidez del suelo y a la toxicidad de aluminio, a la sequía y desde luego a plagas y enfermedades (Agreda, 1986).

El Cauquí, *Vigna unguiculata*, pertenece a la familia Fabaceae, es originaria de África, de clima tropical o sub-tropical, siendo Nigeria el mayor productor mundial. Los granos poseen un elevado contenido de proteínas (18-23 %) de muy buena calidad nutricional (Avanza y Añon, 2008). Esta leguminosa a través de la simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium*, tiene la capacidad de fijar nitrógeno, los nódulos son fácilmente visibles a partir de los 15 a 20 días después de la siembra.

Una leguminosa puede preferir una o más cepas de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* para formar nódulos, las diversas cepas de rizobios pueden diferir en su selectividad por la planta huésped, es decir, por su capacidad de nodulación. Se han realizado estudios, en la cual se ha determinado una amplia variación entre genotipos para la fijación simbiótica de N; además existe un progreso en el desarrollo de variedades con alta capacidad en fijación biológica del nitrógeno, a través del mejoramiento genético; asimismo se han identificado cepas de rizobios, altamente efectivas a través de un rango variable de condiciones de suelo y clima; los factores ambientales, como acidez (menor de 4,5), temperatura ambiente y competencia con cepas nativas, afectan significativamente la capacidad de nodulación y fijación biológica del nitrógeno por el Cauquí (Villancourt y Weeden, 1992).

Además de la ocurrencia de una adecuada asociación leguminosa–rizobio para la eficiente fijación simbiótica de nitrógeno, se requieren adecuadas condiciones ambientales. La eficiencia del proceso, aunque aparentemente es constante por unidad de material fijante, van de acuerdo a diferencias en el genotipo tanto del hospedero como de la bacteria. La habilidad competitiva del *Bradyrhizobium* para invadir la raíz de la leguminosa, parece ser un factor importante en la eficiencia de fijación, pero la competencia entre las cepas de rizobios presentes en el suelo, así como las condiciones climáticas, parecen determinar la efectividad y el predominio de una u otra cepa de rizobio en la asociación simbiótica (Ayala, 1974).

El término "competitividad" se refiere a la capacidad de competencia para la formación de los nódulos, inclusive entre varias cepas de rizobios que estén presentes en el mismo ambiente; esta competitividad puede dar lugar hasta el momento de su presencia dentro de los nódulos, por lo tanto, la competitividad puede darse en diferentes niveles. En la rizósfera, las cepas compiten por la supervivencia y multiplicación incluso antes de la germinación de la semilla y hasta después de la germinación. Para este nivel inicial de competitividad, las bacterias inicialmente sobreviven para luego competir en los sitios accesibles de infección durante la penetración a través de las raíces; por último, como no todas las infecciones primarias inducen la formación de nódulos, es muy probable que la competencia exista, incluso durante el desarrollo de nódulos (Simon *et al.*, 1996).

Diversos estudios han demostrado que la capacidad de ocupación de los nódulos puede estar relacionada con la capacidad de supervivencia, establecimiento y competitividad de la cepa inoculante con otras cepas de rizobios presentes en el suelo (Martins, *et al.*, 2003). En caso particular de la competitividad, las cepas inoculadas pueden competir en la rizósfera, generando sitios de infección y penetrando en las raíces, para promover el desarrollo de los nódulos, mediante el proceso de nodulación. Por lo tanto, la competitividad unido a la eficiencia simbiótica, son deseables para una cepa de rizobio, empleado como inoculantes (Brockwell, 1981).

Los métodos de identificación de rizobios deben ser rápidos y precisos para el estudio de la competencia entre microorganismos presentes en el suelo, a menudo se prefiere métodos genéticos en comparación con otros métodos que presentan la mayor capacidad de determinar la ocupancia de nódulos (Simon *et al.*, 1996). Debido a su alto costo para identificar genéticamente la ocupancia de nódulos, una alternativa para la evaluación o determinación de la competitividad, es mediante la técnica de aglutinación, que es un método relativamente sencillo y económico, que permite evaluar la reacción antígeno –anticuerpo mediante la formación de grumos o agregados de estas partículas, de tal forma que se pueden evaluar antisueros de cepas no homologas capaces de dar una reacción cruzada; además, se puede utilizar para estudios de aspectos ecológicos de cepas de rizobios ocupante de nódulos (Somesegaran y Hoben, 1994).

Por lo tanto, la serología toma una real importancia además de la identificación de cepas, en estudios de competencia, tales como se demuestra en un estudio realizado en cultivos de soya en Brasil, en donde se evaluó la capacidad de ocupancia de nódulos, y la relación existente con el crecimiento *in vitro*; mediante la técnica de aglutinación, dichos nódulos fueron enfrentados contra los antisueros de cada una de las cepas inoculadas, determinando así la ocupancia de éstos (Reyes *et al.*, 1996). Los reportes sobre estudios de competitividad simbiótica entre cepas de *Bradyrhizobium sp.* en asociación con el cultivo de Caupí son escasos a nivel nacional e internacional, por lo que en la presente investigación se planteó el objetivo de evaluar la competitividad simbiótica de un cultivo de *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 nativo simbióticamente eficiente con una cepa de *Bradyrhizobium sp.* patrón simbióticamente eficiente y competitiva (CIAT 71), mediante la ocupancia de nódulos en la raíz; esta ocupancia se determinó por el método serológico de aglutinación, determinando el porcentaje de ocupancia de los nódulos de la cepa nativa con respecto a la cepa control, los cuales servirán para diversos estudios en la producción de inoculantes de cepas de rizobios eficientes y altamente competitivas.

2. Materiales y métodos

Material biológico: 3 ejemplares de *Oryctolagus cuniculus*, raza Nueva Zelanda “conejo”, machos de 3 meses de edad, aproximadamente 2 - 3 kg de peso, procedentes del Instituto Nacional de Salud. Cepa patrón de *Bradyrhizobium sp.* (CIAT 71) eficiente y competitiva aislada de *Stylosanthes guianensis* y cultivo de *Bradyrhizobium sp.* (RC-458-01) nativo simbióticamente eficiente, proporcionados por el Proyecto “Desarrollo de las capacidades de investigación para el uso de la Simbiosis fijadora de Nitrógeno en el incremento de la rentabilidad y calidad de las leguminosas de grano” – Sub Proyecto del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) –Universidad Nacional de Trujillo–Innovación y competitividad para el Agro Peruano. (INCAGRO).

Semillas certificadas de *Vigna unguiculata* “Caupí” var. CAU-9.

Reactivación de las cepas de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 y *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 y obtención de cultivos puros

La reactivación de las cepas de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 Y RC 458-01, fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, según la metodología sugerida por el CIAT (CIAT, 1988). Una vez obtenidas las cepas, fueron sembradas por estría en placas Petri, conteniendo el medio Agar Extracto Levadura Manitol (ELMA); luego se incubaron a 28°C por 3-5 días. Posteriormente a partir de las colonias obtenidas, se evaluó el crecimiento y pureza de las colonias, mediante coloración Gram, obteniendo cultivos puros de cada una de las cepas en el medio ELMA (Somesegaran y Hoben, 1994; Sanchez, 1997).

Inoculación en semilla de Caupí

a. Preparación de jarras de Leonard modificada

El recipiente de la jarra de Leonard estuvo conformado por la parte superior de una botella de vidrio de un litro de capacidad cortada a 14 centímetros de su base y en cuyo pico se colocó tocuyo. Esta parte fue llenada con 500 g de arena de río lavada y tratada con ácido muriático diluido al cuarto. El reservorio consto de la otra fracción de la botella de aproximadamente 600 mL de

capacidad en el que se agregó solución Jensen modificado sin nitrógeno y diluida al cuarto. Luego ambas partes fueron selladas, se cubrió la parte superior de la botella con papel de aluminio, y se envolvió toda la jarra con plástico negro. Finalmente las jarras fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C por 90 minutos. Se prepararon siete jarras de Leonard modificadas (Somesegaran y Hoben, 1994).

b. Preparación y estandarización del inóculo de las cepas de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 y *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01

Cada uno de los cultivos de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 y *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 fueron sembrados en frascos conteniendo medio ELMA y se incubaron a 28°C durante 3 – 5 días (Vincent, 1975). Para la obtención de los inóculos se agregó solución salina fisiológica estéril (SSFE) realizando una suspensión homogénea, y luego estandarizándola comparándola con el tubo número cuatro del nefelómetro de Mac Farland, hasta llegar a una concentración aproximada de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL (Somesegaran y Hoben, 1994).

c. Germinación de las semillas

Las semillas de *V. unguiculata* “Caupí” var. CAU-9 fueron seleccionadas por uniformidad en tamaño color forma y que hayan presentado un porcentaje de germinación mayor al 85 %. La desinfección, se realizó por un traspaso sucesivo en etanol al 70 % por 1 minuto e hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos, enjuagado de 5 6 veces con agua destilada estéril (ADE). Luego se colocó las semillas en placas estériles conteniendo papel toalla humedecidos con ADE y se incubo en estufa a 28 °C por 14 horas en condiciones de oscuridad (Somesegaran y Hoben, 1994).

d. Siembra e inoculación de la semilla

En cada una de las jarras se sembraron tres semillas germinadas, para lo cual se realizaron tres hoyos en la arena con una bagueta estéril y en cada uno se colocaron las semillas germinadas inmediatamente. Luego, en cuatro jarras de Leonard modificada se agregaron 0,5 mL del inóculo de cada una de las cepas de *Bradyrhizobium sp.* (CIAT 71 y RC 458-01) a cada semilla germinada, realizándose una co-inoculación. Una jarra no se inoculó formándose así un blanco, de las dos jarra restantes, a una se le agregó 0, 5 mL de inóculo de

Bradyrhizobium sp. CIAT 71 y a la otra 0,5 mL de inóculo de *Bradyrhizobium* sp. RC-458-01. Posteriormente se cubrió cada semilla con arena y con su tapa respectiva de papel aluminio; esta tapa se retiró cuando las plántulas obtuvieron 2 cm de altura (Somesegaran y Hoben, 1994).



Figura 1 Siembra e inoculación A. siembra de semilla B. toma de inóculo estandarizada C. inoculación a la semilla D. tapado de la semilla con arena E. jarras inoculadas.

e. Condiciones de crecimiento y obtención de los nódulos

Una semana después de la siembra se evaluaron cada una de las plantas presentes en las jarras, eligiendo a las dos mejores, luego se procedió a cubrir la superficie con arena parafinada estéril. Posteriormente se colocaron las jarras en casa de malla durante 40 días; durante este tiempo se procedió a corregir periódicamente el nivel de solución nutritiva, además se reguló la temperatura ambiental y humedad relativa (Hungria *et al.*, 2000). Luego, de los 40 días de crecimiento de la planta, se procedió a la separación de la raíz y lavado de los nódulos de Caupí. Los nódulos se colectaron en bolsas pequeñas de polietileno; se utilizó una bolsa por cada planta, seguidamente se procedió a sellar y etiquetar cada bolsa (Somesegaran y Hoben, 1994).



Figura 2. Obtención de los nódulos A. plantas de Caupi después de 40 días de crecimiento B. Extracción de las raíces de Caupi D. lavado de las raíces E. obtención de los nódulos.

Obtención de anticuerpos

a. Preparación del antígeno

Los cultivos puros de CIAT 71 y RC-458-01, fueron sembrados en frascos Roux por siembra en superficie y se incubaron a 28 °C por 3–5 días, luego se realizó la cosecha o recolección de las colonias, para lo cual se agregó 10 mL de SSFE. La suspensión correspondiente a cada cultivo fueron colocados en tubos de ensayo debidamente rotulados. A continuación se centrifugaron los tubos para la eliminación de antígeno soluble y flagelar, se desechó el sobrenadante y se re suspendió el sedimento con SSFE; este paso se repitió tres veces, luego se ajustó a una concentración de $1,2 \times 10^9$ células/mL, comparándola con el tubo número cuatro del nefelómetro de Mac Farland. Luego se procedió a transferir las suspensiones a botellas estériles, las cuales se taparon con un tapón de caucho estéril. Se calentó la solución del antígeno, sumergiendo parte de la botella en agua hirviendo durante aproximadamente una hora, la cual sirve para eliminar cualquier antígeno flagelar restante (Somesegaran y Hoben, 1994; Arce *et al.*, 2007).

b. Inmunización del conejo

En este procedimiento se utilizaron tres conejos, dos de los cuales fueron inmu-

zados con el cultivo de *Bradyrhizobium sp.* nativo simbióticamente eficiente (RC-458-01) y el otro conejo con cultivo de CIAT 71. Previa a la inmunización, se obtuvo el suero pre-inmune. Se extrajo 3 - 4 mL de sangre mediante punción endovenosa, la cual fue colocado en tubo de ensayo sin anticoagulante, el cual se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos. Mediante una pipeta Pasteur se removió el suero y colocó en un tubo estéril, el cual se incubó en baño María por 30 minutos a 56 °C para inactivar el complemento. El suero pre-inmune se almacenó en frascos adecuados, para su posterior utilización (Somesegaran y Hoben, 1994; Arce *et al.*, 2007). Para la inmunización de los conejos se preparó una emulsión de 1 mL de cada antígeno con 1 mL de adyuvante completo de Freund, que se mezcló homogéneamente hasta llegar una consistencia adecuada, la que se inoculó vía intramuscular en la pata posterior del conejo. Después de 2 y 4 semanas se volvió a inocular nuevamente el antígeno con adyuvante incompleto, para reforzar la respuesta inmunológica.

c. Determinación del título de anticuerpos
Aproximadamente a una semana después de la última inoculación, se determinó el nivel de anticuerpos mediante titulación, para ello, se extrajo sangre a los conejos por punción cardíaca, las cuales fueron centrifugados a 2000rpm por 15 minutos para la separación del suero. A partir del suero se realizó las diluciones dobles para la determinación del título de anticuerpos. El suero inmune restante se colocó en refrigeración para su posterior utilización 30. El título de anticuerpos obtenido fue 1:1600.

Determinación de la competitividad

a. Obtención de los antígenos a partir de los nódulos

Se procedió a colocar cada una de las bolsas que contienen los nódulos. Con la ayuda de una pinza estéril se procedió a transferir los nódulos a cada pocillo de la placa de aglutinación, y se enumeró según la cantidad de nódulos, se les agrego con una pipeta estéril 6 gotas de SSF a cada pocillo, se presionó suavemente por las paredes de los pocillos cada nódulo (no homogenizar), remover suavemente el contenido de cada pocillo y cuidadosamente extraer el tejido del nódulo. Con una micropipeta se transfirió 300 μ L de los antígenos de cada

pocillo, a tubos de aglutinación. Se trabajó 15 nódulos por planta.

a. Prueba de aglutinación

Luego, se procedió a preparar una dilución del anticuerpo (1/25), diluyendo 0,4 mL de anticuerpos en 9,6 mL de SSF. Se colocó 300 μ L de los anticuerpos en cada tubo ya enumerado, los cuales se mezclan suavemente; para este paso se procedió a utilizar un blanco y un control. Se taparon los tubos con algodón y se colocaron en una incubadora a 37 °C por 2 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a refrigerar a 4 °C por toda una noche. Al día siguiente se observó los resultados y se anotaron para su respectivo análisis, en la cual se determinó el porcentaje de ocupancia de los dos cultivos en Cauquí.

Análisis Estadísticos

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante comparación de medias utilizando la prueba “t” *student* ($p=0,05$) entre los promedios del porcentaje de ocupancia por cada cepa de rizobios.

3. Resultados y discusión

En la evaluación de la competitividad de las cepas de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 y RC 458-01 mediante inóculo mixto, el porcentaje de ocupancia de nódulos se determinó mediante la técnica serológica de aglutinación. Se encontró que el porcentaje de ocupancia de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 fue de 58,33 %, es mayor con respecto a la cepa de *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 con un 41,67 % de ocupancia de nódulos (Figura 3).

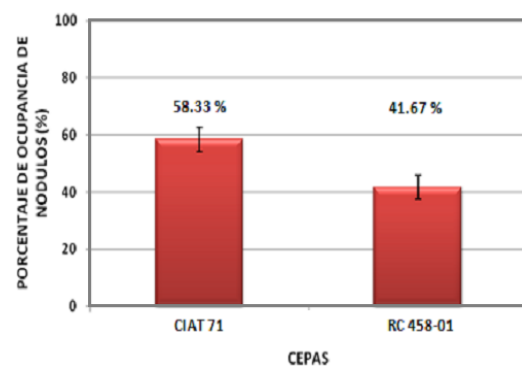


Figura 3. Porcentaje promedio de ocupancia de nódulos, inoculados con *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 y *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01 (inóculo mixto), en *Vigna unguiculata* “Cauquí”, determinado mediante el método de aglutinación.

La simbiosis de las leguminosas con *Rhizobium*, se establece como resultado de la expresión de unas características propias del microbio, de la planta hospedadora, y de la asociación de ambos. Entre las propiedades de las simbiosis cabe destacar, que la especificidad, inefectividad y efectividad son tres parámetros muy importantes para que pueda haber una buena asociación simbiótica entre el microbio y la planta, y de esta manera extender la ventajas de la simbiosis. Para la selección de una determinada cepa de *Rhizobium* se deben considerar los siguientes criterios: alta especificidad con la leguminosa, buena infectividad, adecuado grado de competitividad con otras cepas; en tal sentido la investigación se orientó al estudio de una cepa eficientemente simbiótica en *Bradyrhizobium* sp. (RC 458-01), para determinar su competitividad, comparándola con una cepa patrón *Bradyrhizobium* sp. (CIAT 71).

La cepa RC 458-01 fue menos competitiva debido a que su porcentaje de ocupancia de nódulos fue menor (41,67%), con respecto a la cepa CIAT 71 (58,33%). Esto se comprueba al realizar el análisis estadístico mediante comparación de medias empleando la prueba "t" de *student*, que determinó que existe diferencia significativa entre los porcentajes de ocupancia de nódulos por las dos cepas evaluadas CIAT 71 y RC 458-01 (Tabla 01).

Tabla 1. Análisis estadístico de la comparación de medias aritméticas mediante la prueba de "t" *Student* del porcentaje de ocupancia de nódulos de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. CIAT 71 y *Bradyrhizobium* sp. RC 458-01.

Bradyrhizobium sp. CIAT 71 y Bradyrhizobium sp. RC 458-01	
Frecuencia	4
Media	16.665
Varianza	74.0593
Desviación típica	8.60577
Error estándar	4.30289

Comparación de Medias:

95% intervalo de confianza para la media de *Bradyrhizobium* sp. CIAT 71 y *Bradyrhizobium* sp. RC 458-01.

95% intervalos de confianza para la diferencia de medias de *Bradyrhizobium* sp. CIAT 71 y *Bradyrhizobium* sp. RC 458-01.

Hipótesis nula: media = 0. 0

Hipótesis alterna: diferencia

t= 3.87298 P-valor= 0.034663

Para que se concrete el proceso de infección de las raíces de Caupí por las cepas inoculadas se requiere un encuentro entre los rizobios y los pelos radiculares de la leguminosa, además estos se reconozcan como simbiosis, ya que de lo contrario se activan los sistemas de defensas de las plantas para contrarrestar la infección bacteriana, además algunas variables del medio ambiente edáfico contribuyen con el proceso de infección, inclusive, la misma planta tendría un papel más activo en la selección cepa variedad como se evidencia en algunas leguminosas. Esta última característica cobra una alta relevancia en este estudio debido a que investigaciones en Caupí han demostrado que esta leguminosa aparte de poseer una alta efectividad al fijar nitrógeno en simbiosis con rizobios, debido a que crece en un rango variable de condiciones de suelo y clima, posee una cierta selectividad por diversas cepas de rizobios existentes en su mismo ambiente (Villancourt y Weeden, 1992).

Una leguminosa bien nodulada tiene su propio suministro de nitrógeno, pero el óptimo crecimiento y fijación de nitrógeno depende del suministro de fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, boro, zinc, cobre, cobalto, molibdeno y cloro (FAO, 2005).

La deficiencia de fósforo, azufre y potasio se manifiesta principalmente en la reducción del crecimiento de la leguminosa, lo que ocasiona una reducción en la fijación de nitrógeno, aunque también puede afectar la formación de nódulos. En suelos tropicales ácidos, el fósforo parece ser de mayor importancia en la formación de los nódulos en comparación al potasio, debido al alto contenido de aluminio en estos suelos. Con respecto a los micronutrientes, el boro participa en la actividad meristemática, tanto del nódulo como de la planta huésped; el cobre es necesario para el desarrollo del nódulo, su deficiencia causa nódulos pequeños, similares a nódulos inefectivos, la función específica del cobre en la simbiosis no es clara.

A nivel nacional los principales problemas que afectan la competitividad de simbiosis Rizobios-leguminosa de las cadenas productivas, están relacionadas a la escasez de tecnologías eficientes de producción y de variedades altamente productivas, con tipos

de grano y bioinoculantes requeridos por el mercado; y sobre todo, con resistencia a enfermedades para reducir costos de producción y lograr productos de mejor calidad. Estos problemas constituyen los principales escollos para desarrollar la competitividad de este grupo de cultivos. La simbiosis de Caupí con las cepa estudiada (RC 458-01) podría ser una práctica muy importante para el mejoramiento del suelo, como se puede apreciar por las cantidades de nitrógeno fijadas por el Caupí (73-374 kg/ha de N) (FAO y NIFTAL, 1985).

En la actualidad, la agricultura sustentable, plantea mejorar la efectividad de la fijación de nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y rizobios competitivos, capaces de ser usados y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede descartar a la cepa nativa (RC 458-01) eficientemente simbiótica, para el desarrollo de bioinoculantes, los cuales mejoran la calidad de los cultivos de Caupí y reducen el uso agrícola de fertilizantes nitrogenados.

Los beneficios de la aplicación de fertilizantes biológicos no se aprecian solamente en términos económicos, sino que además eliminan los efectos nocivos de la fertilización nitrogenada en la absorción, asimilación y disponibilidad de los diferentes nutrientes. Los biofertilizantes mas comercializados son inocuos para el hombre y el medio ambiente y la mayor respuesta agronómica se ha encontrado en suelos de baja fertilidad. Son más económicos y de fácil transportación. El uso de estos productos ha mejorado la comprensión de la relación planta-microorganismo en su contribución a minimizar los riesgos de degradación de los suelos y a maximizar el regreso de energía a los procesos de producción (Turian, 2005).

Existe gran interés en el uso de inoculantes comerciales pero no se cuenta con la tecnología apropiada para su producción masiva; por lo que se podría asegurar que la cepa RC 458-01 no ofrece resultados en experimentos en laboratorio resultarían inadecuadas para un posterior trabajo masivo en campo, por lo que es muy importante realizar varios ensayos previo a su liberación como inoculante; además se ha demostrado que no por ser una cepa eficientemente simbiótica, deberá ser

competitiva, por lo tanto se deberá someter a procesos de evaluación en macetas y en campo para determinar si la cepa es competitiva con los rizobios nativos presentes en el suelo.

4. Conclusiones

La cepa de *Bradyrhizobium sp.* CIAT 71 es más competitiva simbióticamente en *Vigna unguiculata* "Caupí" respecto a la cepa de *Bradyrhizobium sp.* RC 458-01.

Referencias

- Clark, F. 1996. Soil microbiology and biochemistry. 2^{ed}. United States of American: Academic Press.
- Mayz, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Rev. UDO Agrícola 4(1):1-20.
- FAO y NIFTAL. 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. 5 pp.
- FAO. 2005. Plant Nutrition. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/publicat/faobul4/faobul4/b402.htm>.
- López, I. 2002. Rhizobium y su destacada simbiosis con leguminosas. Centro de Investigación sobre la Fijación de Nitrógeno. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peña, J. 2000. Introducción. La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Acuerdo Regional para la Promoción de la ciencia y la tecnología nucleares en América Latina y el Caribe. España: IMPROSA.
- Martin, G.; Rivera, R.; Mujica, Y. 2007. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno de la Canavalia ensiformes por el método de la diferencia de N total. Rev. Cultivos Tropicales 28 (4): 75-78.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2006. Uso de biofertilizantes: Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en cultivo de soja. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Ribcón, J.; Clavero, T.; Razz, R.; Pietrosemoli, S.; Mendez, F.; Noguera, N. 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 17: 342-357
- Mayz, J. 1997. Simbiosis Leguminosas/Rhizobia. Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad de Oriente de Venezuela 113p.
- Matos, G.; Ormeño, E.; Zúñiga, D. 1998. Diversidad de los Rhizobios que nodulan el cultivo del pallar (*Phaseolus lunatus L.*) en la costa central del Perú. Ecología 1(1): 42-46.
- Barrientos, L.; Higuera, M.; Acuña, H.; Guerrero, J.; Ortega, F.; Seguel, I. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium sp.* (Lotus) en plantas de tres especies del género Lotus de Chile. Agricultura técnica. 62(2): 226-236.

- Urzúa, H. 2000. Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable. En: Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (IDEMA/U.S. Agustín). Arequipa, Perú; p. 221-228.
- Urzúa, H.; Urzúa, J.; Pizarro, R. 2001. Pre-selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* en vivía forrajera, para abonos verdes. Cien. Inv. Agr. 28(1): 3-6.
- Valladolid, A.; Voyses, O. 2006. Clases Comerciales de Leguminosas de grano. Catálogo para Orientar la comercialización en los mercados nacionales e internacionales. Perú.
- Cubero, J. 2004. Al otro lado del Atlántico: España. Variedades tradicionales de leguminosas de grano para alimentación humana. España: ETSIAM.
- Agreda, T. 1986. Posibilidades de la utilización de leguminosas forrajeras para mejorar la productividad agrícola y ganadera en la selva peruana. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Perú.
- Avanza, M.; Añon, C. 2008. Aislamiento y caracterización fisicoquímicas y funcional de proteínas de Caupí (*Vigna unguiculata*). Argentina: Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad Nacional Del Nordeste.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2000. Crop records: Dry beans.
- Villancourt, R.; Weeden, N. 1992. Chloroplast DNA polymorphism suggests nigerian center of domestication for the cowpea, *Vigna unguiculata* (*Leguminosae*). American Journal of Botany 79 (19): 1194-1199.
- Ayala, L. 1974. Evaluación preliminar de la eficiencia de *Rhizobium* de maní aislado de cuatro zonas geográficas de Venezuela. Venezuela: CENIAP. Agronomía Tropical 24(5): 353-363.
- Simon, T.; Kalalova, S.; Petrzik, K. 1996. Identification of *Rhizobium* Strains and Evaluation of their competitiveness. Folia Microbiol 41(1): 65-72.
- Martins, L.; Xavier, G.; Rangel, F.; Riebiro, J.; Neves, M.; Morgado, L.; Rumjanek, N. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. Biology and Fertility of Soil 38: 333-339.
- Brockwell, J. 1981. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations. In: Gibson A, Newton H. Current Perspectives in Nitrogen. Amsterdam: North Holland Elsevier p. 277-315.
- Somesegaran, P.; Hoben, H. 1994. Handbook for Rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology. United States of American: Springer-Verlag.
- Reyes, A.; Ramírez, M.; Lozano, A. 1996. Caracterización de cepas de *Rhizobium* sp. que nodulan frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Colombia: Centro de Investigaciones Tibaitatá.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Simbiosis Leguminosa-Rhizobio. Manual de métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Colombia.
- Sánchez, J. 1997. Producción de inoculantes para leguminosas y gramíneas. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Vincent, M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. Argentina: Hemisferio Sur.
- Hungria, M.; Andrade, D.; Churier, L.; Probanza, A.; Guttierrez, F.; Megías, M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biology & Biochemistry 32: 1515-1528.
- Arce, M.; Yolanda, A.; Rosas, L. 2007. Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria. México: Manual Moderno S.A.
- Turian, T.; Ponzio, M.; Morgante, C.; Ibañes, F.; Angelini, J.; Castro, S.; Fabra, A. 2005. Caracterización de plásmidos simbióticos y competitividad de rizobios nodulantes de maní obtenidos de suelos maniseros de la provincia de Córdoba. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

