

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE Rhizobium phaseoli EN UN SUELO DEL ALTIPLANO DE PASTO COLOMBIA*

ALBERTO UNIGARRO SANCHEZ
HERNAN BURBANO ORJUELA *
LUIS MOLINA VALERO**

RESUMEN

Para determinar las características de Rhizobium phaseoli presentes en un Inceptisol del altiplano de Pasto, Colombia, y la inoculación de la cepa CIAT, en frijol arbustivo var. Diacol Andino, bajo condiciones de invernadero, se establecieron cultivos a 30°C en agar manitol extracto de levadura. Las bacterias presentaron un desarrollo abundante o moderado de 2 a 5 días, colonias blancas o incoloras, con formación de moderada a mucha goma, elevadas, brillantes de aspecto mucilaginoso; la morfología y tinción presentaron bastoncitos entre cortos y medianos, endosporas ausentes, gramnegativo.

El mayor tamaño de los nódulos y número de colonias, se presentó con la cepa CIAT 57, disminuyendo en el suelo bajo condiciones normales y fue mínimo en la mezcla de las cepas nativas y CIAT 57. Los nódulos en todos los casos presentaron un mínimo desarrollo.

ABSTRACT

Rhizobium phaseoli cultures were established on yeast manitol agar at 30°C to determine the characteristics of the forms present in an Inceptisol of Pasto Highlands, Colombia and those of the strain CIAT 57. Bacteria showed moderate to abundant growth from 2 to 5 days colorless or

* Parcial de Tesis de Grado presentada por el primer autor como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo en la Universidad de Nariño.

** Profesor asociado, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

white colonies; moderate to high formation of gum; diffuse, elevated, bright appearance. By tint it was observed Gram negative reaction and little bacilli, without endospores. The highest number of colonies was obtained with CIAT 57.

When inoculated to bush bean Diacol Andino variety, the biggest size of nodules was obtained with strain CIAT 57, native strains showed an intermediate size and with the mixture the lowest size. Nodule weight was minimal in all cases.

INTRODUCCION

La simbiosis Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseoli es una posibilidad de aporte de nitrógeno en forma muy poco costosa para el cultivo del frijol. No obstante, una serie de factores hacen que esta simbiosis no presente en todos los casos niveles de eficiencia tan ventajosos como los que aparecen en cultivos de soya y tréboles. Sin embargo, se registran situaciones positivas que justifican el trabajo con esta asociación simbiótica a fin de encontrar genotipos de frijol y cepas de R. phaseoli que produzcan eficientes combinaciones para la fijación de nitrógeno (2).

El trabajo tuvo como objetivo, evaluar a nivel de laboratorio, las características del Rhizobium presente en un Inceptisol y la introducción de la cepa CIAT 57 de R. phaseoli.

REVISION DE LITERATURA

Existen algunas especificidades entre Rhizobium y leguminosas; es raro encontrar en un suelo cultivado por primera vez con una leguminosa en particular, el Rhizobium apropiado, mientras tanto las plantas sin nodulación adecuada mostrarán una deficiencia de nitrógeno y el agricultor no obtendría más que 50-60% de su rendimiento potencial (4).

Cuando de dos cepas de Rhizobium solamente una produce nódulos en las leguminosas, se puede hablar de diferencias en "infectividad". Si ambas forman nódulos, pero la fija-

ción en una es mejor, se habla de diferencias en "efectividad" (4). En la simbiosis Rhizobium-Phaseolus existe especificidad en ambos tipos, las especies de Phaseolus no todas nodulan con el mismo Rhizobium. P. vulgaris y P. gossypinus nodulan con las cepas de crecimiento rápido, mientras que P. lunatus y P. acutifolius necesitan una cepa que tenga desarrollo muy lento en medios normales de crecimiento. Es claro también que para cada variedad de frijol no todas las cepas de Rhizobium tienen el mismo nivel de efectividad (5).

Se ha demostrado por lo menos que once genes del hospedero influyen en la fijación. Ellos controlan factores tan diversos como la multiplicación del rizobio en la rizosfera y el suministro de energía para el desarrollo de los nódulos. (3,5).

Una vez establecidos en el suelo de pH adecuado, los rizobios son capaces de existir saprofiticamente y sobrevivirán varios años, aun sin la presencia de su hospedero. El número de nódulos posibles en un sistema radicular es más o menos constante, y controlado por el número de células somáticas de la raíz, cada nódulo formado por las cepas nativas del suelo limitará aún más el número formado por el inoculante eficiente (4, 5).

Cuando las cepas nativas del suelo tienen un alto grado de efectividad con la leguminosa sembrada, no existe realmente problema, éste viene cuando no son eficientes con el frijol sembrado, siendo aún capaces de formar nódulos (4,5).

Ortega, citado por Cuautle (1), indica que dentro de los factores biológicos que afectan negativamente la acción de cepas de Rhizobium introducidas, está el ataque de algunos patógenos como hongos, bacterias, virus, protozoarios y nemátodos que ocasionan pérdidas considerables en la cantidad de nitrógeno fijado, además de la presencia de cepas nativas de Rhizobium, las cuales están adaptadas a las condiciones ambientales. Por otro lado, el Rhizobium puede morir por toxinas de semillas o por enzimas, o ser inhibido por antibióticos y bacteriocinas.

Se llama "inoculación" a la técnica de incorporar al suelo las bacterias específicas de rizobio, procesadas comercialmente para tal efecto (9). La razón de la inoculación

de las leguminosas según Dawson, citado por Cuautle et al (1), es asegurar que la bacteria esté disponible en la zona de la raíz cuando la planta empieza a desarrollarse, y se lleve a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico.

MATERIALES Y METODOS

Para la caracterización del rizobio en el Laboratorio, se empleó una de las replications del ensayo de invernadero (10), con plantas de frijol var. Diacol Andino de 60 días a partir de la siembra, las cuales se sacaron de los materos con suelo, para lavar las raíces con un chorro suave de agua, a fin de evitar el desprendimiento de los nódulos que fueron recolectados con ayuda de pinzas.

En el ensayo de invernadero, se utilizaron materos de 8,4kg de capacidad. En el experimento se utilizó un diseño de parcelas divididas en distribución irrestrictamente al azar (7), comprendió 3 tratamientos que consistieron en suelo normal y utilización de semilla no inoculada, suelo normal y semilla inoculada y suelo estéril y semilla inoculada. Los 7 subtratamientos considerados fueron aplicaciones de: N-P-K; N-P-K-B; N-P-K-Mo; N-P-K-B-Mo; B; Mo; además de un testigo absoluto. Las aplicaciones basales de N-P-K únicamente cubrieron los requerimientos nutricionales del cultivo, según los criterios del ICA (6); cuando se hicieron aplicaciones de B y Mo, éstas fueron de 2,0 y 1,5 k/ha respectivamente.

El suelo estéril, se fumigó con formol de 40%, los materos utilizados se cubrieron con un plástico durante 4 días al cabo de los cuales se destapó, se ventiló por 5 días, se regó con abundante agua, para colocar el suelo a capacidad de campo. Los nutrientes agregados al suelo preparado para la siembra, fueron disueltos en agua y aplicados con pipeta.

Por subtratamiento se tomaron 5 nódulos al azar, para determinar su diámetro con la ayuda de un nonio; luego se pesó 0,1 g de nódulos, los cuales se desinfectaron por 3 min en hipoclorito de sodio al 5%, para pasarlos luego a

a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada esterilizada, efectuando el macerado con una varilla de vidrio estéril, cerca a la llama de un mechero.

A partir de la concentración original, se establecieron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000; 1:100000; 1:1000000, 1:10000000, 1:100000000, teniendo en cuenta tuubo de ensayo con 9 cc de agua destilada esterilizada. De cada una de las 3 últimas diluciones, con pipetas estériles, se pasaron cantidades de 1 ml a cajas de Petri esterilizadas, donde se vertió agar, manitol, extracto de levadura diluido aproximadamente a 45°C, efectuando la homogenización de la suspensión bacteriana con el medio. Cada dilución, se replicó 4 veces.

Las cajas de Petri con el medio de cultivo sólido, se colocaron invertidas en la estufa de incubación a 30°C por 5 días, al cabo de los cuales se contabilizó las colonias.

El número de colonias de cada caja se multiplicó por el factor de dilución, para obtener finalmente el número promedio de bacterias por centímetro cúbico de agua, con base en los resultados de las tres diluciones. Además, se observó las características culturales de las colonias, realizando pruebas de tinción y bioquímicas usuales, con el fin de relacionar los resultados con los criterios de Vicent (11) y de Roza (8).

RESULTADOS Y DISCUSION

La acumulación de peso de los nódulos entre 0,00505 y 0,01975 g para los diferentes tratamientos, presentaron su mayor frecuencia de 13 a 19 por los subtratamientos, lo cual indica un desarrollo mínimo de los nódulos en las raíces del frijol a los 60 días en la variedad de frijol Diacol Andino, bajo condiciones de invernadero (Fig. 1).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los tratamientos, hay una alta infectividad en la nodulación de la cepa CIAT 57, la cual parece no tener tanta competencia con las cepas nativas, que podrían competir entre sí y, posiblemente están cumpliendo en el suelo mayor actividad saprofitica que simbiótica.

El diámetro de los nódulos, indica que cuando se inoculó la semilla, éstos presentaron mayores proporciones que aquellos formados por las cepas nativas (Tabla 1).

A partir de la incubación del Rhizobium a 26-28°C aislado de nódulos de cada uno de los subtratamientos para cada uno de los tratamientos considerados y sembrados en un medio de agar manitol extracto de levadura, las colonias se desarrollaron en el medio de cultivo en un período de 4-5 días. Desde el punto de vista de la velocidad de crecimiento, el Rhizobium phaseoli, se clasifica en el grupo de crecimiento rápido, teniendo en cuenta el tiempo requerido para crecer bien en la superficie del medio sólido.

En cuanto al desarrollo en el medio de cultivo empleado se presentó poco o ningún desarrollo de las colonias en las primeras 24 horas; abundante o moderado en 2-5 días; colonias incoloras o blancas; generalmente de moderada o mucha formación de goma, estas características corresponden a las citadas por Vincent (11), para Rhizobium phaseoli.

A partir de las colonias obtenidas en los diferentes tratamientos y subtratamientos, se realizaron frotis de la manera habitual para poder observar una característica cualitativa de los rizobios, mediante la coloración de Gram; la morfología y tinción presentaron: bastoncitos entre cortos y medianos (11), endosporas ausentes, gramnegativo.

Otras características que se pueden esperar en la mayoría de las cepas de crecimiento rápido según Jensen, citado por de Roza (8), la gelatina es lentamente licuada por la mayoría de las cepas de crecimiento rápido y producen una zona superficial de suero en la leche. Según Vincent (11), la producción de ácidos a partir de carbohidratos es tá relacionada con la actividad de los rizobios de crecimiento rápido.

Harris, citado por Roza (8), menciona que los organismos de crecimiento rápido producen sobre agar colonias difusas, elevadas, brillantes, semitranslúcidas, de aspecto mucilaginoso, aspecto que pudo observarse en los diferentes cultivos.

El mayor número de colonias, se obtuvo de las bacterias aisladas de nódulos del tratamiento suelo estéril y semilla inoculada con un promedio de $970,39 \times 10^6$ colonias por gramo de nódulos, menor número de colonias se obtuvieron en los tratamientos suelo normal y semilla no inoculada y suelo normal y semilla inoculada con un promedio de $830,45 \times 10^6$ y $275,21 \times 10^6$ colonias por gramo de nódulos, respectivamente.

El mayor número de colonias se obtuvo con la aplicación de Mo, en los tratamientos suelo estéril y semilla inoculada $6,59 \times 10^9$ y suelo normal y semilla no inoculada $2,32 \times 10^9$ colonias por gramo de nódulos,

El menor número de colonias con la aplicación de N-P-K-B $1,12 \times 10^6$ y $3,01 \times 10^6$ colonias por gramo de nódulos en los tratamientos suelo normal y semilla no inoculada y suelo estéril y semilla inoculada, respectivamente. Se obtuvo $2,46 \times 10^6$ y $1,86 \times 10^6$ colonias por gramo de nódulos en el tratamiento suelo normal y semilla no inoculada y suelo estéril y semilla inoculada, respectivamente (Tabla 2).

CONCLUSIONES

1. Se presentó un mínimo desarrollo y diámetro de los nódulos; los mayores valores se presentaron con la cepa CIAT 57, en comparación con las cepas nativas o su mezcla.
2. Las características analizadas corresponden en todos los casos a las descritas para Rhizobium phaseoli.
3. El mayor número de colonias se presentó con la inoculación de la cepa CIAT 57, siendo mayores cuando estuvieron involucradas aplicaciones de molibdeno.

BIBLIOGRAFIA

1. CUAUTLE, F., NÚÑEZ, E. y VALDES, R. Efecto de la fertilización, fumigación del suelo e inoculación con Rhizobium, sobre la nodulación, contenido de nitrógeno y rendimiento de frijol (Phaseolus vulgaris).

- ris L.) en Chapingo, México. *Agrociencia (México)* 43: 19-35. 1981.
2. FISCHER, C. y TASISTRO, A. Efecto de diversos herbicidas sobre la simbiosis (Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris). Chapingo (México) 31-32: 53-60. 1981.
 3. GRAHAM, P. El ciclo de nitrógeno. *Suelos Ecuatoriales (Colombia)* 4 (1): 119-140. 1972.
 4. GRAHAM, P. La nodulación y la fijación de nitrógeno en Phaseolus vulgaris L. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1977. 20 p.
 5. GRAHAM, P. Nitrógeno: fuentes químicas y biológicas en la fertilización del fríjol. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1979. 24 p.
 6. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Fertilización en diversos cultivos, cuarta aproximación. Tibaitatá, Colombia, 1982. 61 p. Manual de Asistencia Técnica n° 25.
 7. MUÑOZ, J. y AMEZQUITA, M. Manual estadístico para la experimentación en fríjol (Phaseolus vulgaris L.) Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1978. p. "irr".
 8. ROZO, E., DE. Aspectos microbiológicos de la fijación simbiótica del nitrógeno por el Rhizobium. Bogotá, Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Colombia, 1975. 139 p.
 9. THE NITRAGIN COMPANY, INC. Leguminosas, inoculación y fijación de nitrógeno: análisis y explicación, Wisconsin (EE.UU), s. f. 6 p.
 10. UNIGARRO, A., BURBANO, H. y MOLINA, L. Influencia de la inoculación con Rhizobium y de la fertilización en la fijación de nitrógeno por fríjol en el altiplano de Pasto, Colombia. *Revista de Ciencias Agrícolas (Colombia)* 9 (1-2): 45-63. 1985.

11. VINCENT, J. Manual práctico de rizobiología. Trad. del inglés por Carlos Batthyany. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1975. 200 p.

TABLA 1

DIAMETRO EN MILIMETROS DE LOS NODULOS DE FRIJOL Diacol Andino, A LOS 60 DIAS DE LA SIEMBRA EN INVERNADERO

Subtratamientos	TRATAMIENTOS	
	Suelo normal y semilla no inoculada	Suelo normal y semilla inoculada
NPK	1,08	1,76
NPKB	2,08	1,86
NPKMO	0,96	2,00
NPKBMO	1,06	2,13
B	1,05	1,80
Mo	1,50	2,34
Testigo	1,76	2,60
\bar{x}	1,36	2,07

(*) Promedio de 5 nódulos tomados al azar del cuello de la raíz.

TABLA 2

COLONIAS POR GRAMO DE NODULOS AISLADOS DE FRIJOL Diacol Andino, EN INVERNA DERO, A LOS 60 DIAS DE LA SIEMBRA

Subtratamiento	TRATAMIENTOS	
	Suelo normal y semilla no inoculada	Suelo normal y Semilla inoculada
NPK	14,00 X 10 ⁶	490,00 X 10 ⁶
NPKB	1,12 X 10 ⁶	8,64 X 10 ⁶
NPKMO	137,00 X 10 ⁶	752,00 X 10 ⁶
NPKBMO	3,25 X 10 ⁹	194,00 X 10 ⁶
B	2,46 X 10 ⁶	86,60 X 10 ⁶
Mo	2,32 X 10 ⁹	389,00 X 10 ⁶
Testigo	88,60 X 10 ⁶	6,20 X 10 ⁶
\bar{x}	830,45 X 10 ⁶	275,21 X 10 ⁶