

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CARRERA DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
SANTO DOMINGO

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE CEPAS DE “RHIZOBIUM”, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), COMO CULTIVO COBERTURA DE LA PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq).”

AUTOR:

GONZALO DARIO ROMERO ROJAS

INFORME TECNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

2009

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CARRERA DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
SANTO DOMINGO

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE CEPAS DE “RHIZOBIUM”, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides (Roxb) Benth*), COMO CULTIVO COBERTURA DE LA PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis Jacq*).”

AUTOR:

GONZALO DARIO ROMERO ROJAS

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO

SANTO DOMINGO - ECUADOR

2009

TEMA:

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE CEPAS DE “RHIZOBIUM”, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), COMO CULTIVO COBERTURA DE LA PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq).”

AUTOR:

GONZALO DARIO ROMERO ROJAS

REVISADO Y APROBADO

MAYOR. ESP. RENE GONZÁLEZ.
COORDINADOR DE CARRERA
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ing. Agr. Msc. Gustavo Núñez
DIRECTOR

Ing. Agr. Patricio Vaca
CODIRECTOR

Ing. Vinicio Uday
BIOMETRISTA

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN ORIGINAL (EN MEDIO MAGNETICO) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES.

SECRETARIA ACADEMICA

TEMA

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO DE CEPAS DE “RHIZOBIUM”, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), COMO CULTIVO COBERTURA DE LA PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq).”

AUTOR

GONZALO DARIO ROMERO ROJAS

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACION DEL INFORME TECNICO.

	CALIFICACION	FECHA
Ing. Agr. Msc. Gustavo Núñez. DIRECTOR	-----	-----
Ing. Agr. Patricio Vaca. CODIRECTOR	-----	-----

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA SECRETARÍA.

SECRETARIA ACADEMICA

DEDICATORIA

Dedico a mis padres Vicente y Magdalena, por el apoyo incondicional que me brindaron todo el tiempo, por el amor, la sabiduría y la comprensión que me han dado. A mis hermanos Ximena, Karla, Cristina y Carlos, por su amor, apoyo y cariño. A mi abuela Olga. A mi ángel Adriana que se encuentra en el cielo, quien siempre será la fuente de inspiración en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A ANCUPA, al Ing. Rommel Vargas Camacho, por el apoyo, la confianza y por su amistad brindada; al Ing. Roberto Burgos, por su amistad y sus consejos; al Ing. Jefferson Casanova, por todo el apoyo y su amistad ofrecida; a todos quienes conforman el personal de la asociación.

Al INIAP, a la Estación Experimental Santa Catalina, especialmente al Departamento de Protección Vegetal (DNPV), a quienes me apoyaron Mónica, María Luisa, Saúl, Cristina.

Al Instituto Agropecuario Superior Andino IASA II, a todos los profesores que me guiaron para salir adelante. A los ingenieros Gustavo Núñez y Patricio Vaca.

A los ingenieros Cesar Loaiza y Francisco Chávez por la oportunidad, por los consejos, por la confianza, y por la amistad que me dieron durante todo este tiempo.

Al Doctor Gustavo Bernal y al Ing. Julio Sánchez, por guiarme, por aconsejarme, por el apoyo, y por su amistad brindada.

A mis amigos Miguel, William, Fabi, Lore, Luis, Galo, Víctor, Diego, Jorge Luis.

En especial a DIOS, por permitirme realizar este gran trabajo, junto a personas muy especiales.

AUTORIA

Las ideas expuestas en el presente trabajo de investigación, así como los resultados, discusión y conclusiones, son de exclusiva responsabilidad del autor.

CONTENIDO

	Pag
1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN DEL LITERATURA	5
2.1. Fijación Biológica de Nitrógeno	5
2.2. Importancia de las Leguminosas	6
2.2.1. Cobertura Vegetal en Palma Aceitera	7
2.2.2. Especies de Leguminosas	9
2.2.2.1. <i>Pueraria phaseoloides</i>	9
2.3. Bacterias Fijadoras de Nitrógeno Atmosférico	10
2.3.1. Taxonomía rizobiana	10
2.3.2. Rhizobium	12
2.4. Simbiosis Leguminosa Rhizobium	13
2.4.1. Infección de la planta	13
2.4.2. Bases Moleculares de la Interacción R-L	13
2.4.3. Flavonoides y Factores de Nodulación	14
2.4.4. Lectinas	14
2.4.5. Polisacáridos bacterianos que influyen en la simbiosis	14
2.4.6. Genes que participan en la simbiosis	15
2.4.7. Tipos de Nódulos	17
2.4.8. Fisiología de Nódulos	17
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. Fase de Laboratorio	21
3.2. Fase de Invernadero	25
3.3. Fase Campo	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Fase de Laboratorio	36
4.2. Fase de Invernadero	49
4.3. Fase Campo	58
5. CONCLUSIONES	81
6. RECOMENDACIONES	82
7. RESUMEN	83
8. SUMMARY	87
9. BIBLIOGRAFIA	91

I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el cultivo de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq), tiene gran importancia económica dentro de la producción agrícola del país, con una superficie sembrada de 207 285,35 hectáreas, de las cuales 176 194 se encuentran en producción. Existen 5 515 palmicultores, de los cuales alrededor del 87% son pequeños, lo cual refleja el enorme impacto social del cultivo. El cultivo de Palma Aceitera es fuente directa de empleo para 90 000 personas e indirecto para 50 000 más, y genera 75 000 millones USD en exportaciones anuales (CENSO PALMERO, 2005).

La palma aceitera es un cultivo que demanda importantes cantidades de nutrientes, especialmente de nitrógeno y tiene una extracción constante de elementos nutritivos del suelo, los que generalmente son incorporados al mismo solo dos veces por año y en un período limitado por la temporada lluviosa. El costo de la fertilización es una de las inversiones más altas del manejo del cultivo, exige seleccionar adecuadamente los fertilizantes a utilizar y las prácticas culturales que ayuden a mejorar la fertilidad de los suelos (CHÁVEZ Y RIVADENEIRA, 2003).

Para un buen desarrollo y producción del cultivo se recomienda entre otras técnicas, el uso de leguminosas de cobertura como la pueraria (*Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth), en el manejo del suelo cultivado con palma aceitera. El uso de cultivos de cobertura en sistemas perennes está más ampliamente distribuido y reconocido que su uso en cultivos anuales (POUND, 1997).

RANKINE Y HARDTED (1998), indican que los objetivos del uso de leguminosas de cobertura son: (1) Controlar la erosión, protegiendo el suelo de las lluvias fuertes y la luz directa del sol. (2) Mejorar la condición del suelo, proveyendo cobertura con materiales orgánicos. (3) Reducir la temperatura del suelo. (4) Permitir infiltración más rápida y reducir la escorrentía superficial. (5) Estimular la micro y macro flora y fauna del suelo. (6) Proveer de N por medio de la fijación simbiótica de N₂ atmosférico (menos de 300 N⁻¹ Ha⁻¹ año⁻¹). (7) Controlar plagas, previniendo la infestación de insectos en general que aparecen en los troncos de palma caídas. (8) Controlar malezas por competencia con otras plantas.

En un estudio realizado en Malasia en palma joven con una mezcla de *Centrocema pubescens* y *Pueraria phaseoloides*, se encontró que después de dos

y medio años los suelos contenían de 460 a 920 kg ha⁻¹ de nitrógeno, mas que los suelos bajo cobertura natural o con suelos desnudos (CARMONA, 2004).

La Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA), con la colaboración del Organismo Internacional de Energía Atómica, determinaron mediante la técnica isotópica de la abundancia natural del N-15, que la *Pueraria phaseoloides* (leguminosa de cobertura de mayor uso en Palma Aceitera) tiene la capacidad de fijar 207 kg N⁻¹ ha⁻¹ año⁻¹, en los lotes experimentales del CIPAL (Centro de Investigaciones en Palma Aceitera) ubicado en La Concordia (Ecuador). Este dato indica que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) de la *Pueraria* depende fundamentalmente de las cepas nativas de la bacteria fijadora de nitrógeno (comúnmente conocida como “rizobio” o “*Rhizobium*”) asociándose eficientemente con la leguminosa.

RODRÍGUEZ, *et al.* (1993), manifiestan que la asociación Leguminosa – *Rhizobium*, se presenta dentro de los nódulos que aparecen en las raíces de las plantas, esta asociación provoca que cerca del 40% de la fijación de nitrógeno se realice por medios biológicos

COYNE (2000), menciona que la fuente mejor estudiada y más significativa de la fijación biológica del nitrógeno en los ecosistemas agrícolas procede de la simbiosis de las bacterias conocidas como rizobios y las leguminosas. Al fijar nitrógeno contribuyen con cantidades significativas de este elemento, una vez que se descompone la gran cantidad de material vegetal (hojas), caídas en el suelo.

En las inspecciones de campo realizadas tanto en plantaciones de la costa como del oriente ecuatoriano donde se cultiva Palma Aceitera, se ha observado que la *Pueraria phaseoloides*, asociada como cultivo de cobertura en algunas plantaciones no presenta mayor nodulación con las bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que implicaría que el proceso de fijación del nitrógeno no es eficiente.

Dentro del manejo del cultivo de palma aceitera, los programas de fertilización no se cumplen adecuadamente y los altos requerimientos del cultivo hacen que los costos de producción se incrementen, reduciendo la productividad y calidad de frutos. El uso de biofertilizantes (inoculantes), que además de ser inofensivos al ambiente y ayudan a mejorar las características del suelo, están involucrados en la síntesis de varios elementos nutritivos, siendo el más importante

el nitrógeno, metabolizado a través de la asociación “*Rhizobium*” – leguminosa. Esta asociación simbiótica constituye por lo tanto una alternativa viable y beneficiosa para incrementar la fertilidad del suelo, el contenido de N y la contribución de este elemento a la palma.

Con base a estos antecedentes ANCUPA con la colaboración de la ESPE (IASA II), iniciaron una investigación para caracterizar cepas nativas de *Rhizobium* de suelos donde se cultiva la palma aceitera y posteriormente evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico. Parte de la caracterización incluye pruebas de resistencia a factores abióticos y que posean buena capacidad de tolerar las dosis de fertilizantes químicos aplicados en el cultivo de la palma aceitera.

En la zona productora de Palma Aceitera en el Ecuador, después de algunas inspecciones realizadas por los técnicos de ANCUPA a varias plantaciones de las cuatro zonas (bloques) productores de palma (San Lorenzo, Occidental, Guayas y Región Amazónica) (CENSO PALMERO, 2005). Se pudo evidenciar que la Pueraria en algunos sitios no está bien adaptada, con un crecimiento y desarrollo deficiente, o ausente a pesar de haber sido sembrada. Después de análisis biológicos de algunos suelos, se pudo constatar la ausencia de la bacteria nativa, y en otros casos, si bien es cierto se pudo observar la presencia de la bacteria, por los pocos nódulos formados en las raíces de la Pueraria, el proceso simbiótico probablemente es deficiente, es decir la cantidad de la fijación biológica de nitrógeno, es mínima.

A través de un breve diagnóstico realizado en plantaciones de los cuatro bloques productores, se pudo concluir que palmicultores no usan inoculantes a base de “*Rhizobium*” para inocular la semilla de la Pueraria y aprovechar la fijación natural del nitrógeno que ejercen las bacterias, pues al producirse mayor fijación de nitrógeno en la leguminosa, ésta producirá mayor material vegetativo (hojas y tallos), contribuyendo con el control de la erosión del suelo, y al descomponerse estimulará el mejoramiento de la fertilidad del suelo, especialmente el contenido de nitrógeno para beneficio del cultivo de palma.

Con este antecedente, ANCUPA conjuntamente con la ESPE (IASA II), acordaron llevar a cabo esta investigación que comprende tres fases: laboratorio, invernadero y campo. Sin duda, los resultados de los estudios, contribuirán a

mejorar el manejo de la leguminosa de cobertura y en general el manejo de la Palma Aceitera, en el Ecuador.

Para el desarrollo de la investigación se plantearon los siguientes objetivos:

1. Objetivo General

Obtener un banco germoplásmico de cepas de "*Rhizobium*" eficientes en la fijación de nitrógeno, en el cultivo de cobertura (*Pueraria phaseoloides*), asociadas a la Palma Aceitera, para mejorar las condiciones de la fertilidad del suelo y sus características físico-químicas.

2. Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas de suelos pertenecientes a los cuatro bloques productores de Palma Aceitera.
- Evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, bajo condiciones de campo.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

Si bien el nitrógeno molecular (N_2) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (79%), constituye junto al agua, el principal factor limitante de la producción agrícola mundial, ello se debe a que las plantas sólo son capaces de asimilar el nitrógeno combinado, siendo necesaria una conversión previa de N_2 gaseoso a amonio, a nitrito o nitrato (TAIZ y ZEIGER, 1991). Este proceso de conversión se denomina “fijación de nitrógeno” y puede realizarse mediante tres procesos fundamentales:

- Fijación espontánea de nitrógeno: ocurre a partir de la actividad natural de descargas eléctricas sobre el nitrógeno atmosférico. Se estima que este proceso puede fijar alrededor de 10 millones de toneladas métricas de N_2 por año (VINUESA, 1998).
- Fijación industrial: realizada para la producción de fertilizantes nitrogenados, que consiste en la transformación del N_2 atmosférico en amoníaco, bajo condiciones de temperatura y presión elevada; con lo cual se introducen en el suelo aproximadamente 70 millones de toneladas de N/año (MARTÍNEZ, 1992).
- Fijación biológica de nitrógeno (FBN): realizada por microorganismos procarióticos denominados diazótrofos que poseen la enzima nitrogenasa capaz de reducir a amonio el nitrógeno molecular de la atmósfera terrestre. El influjo anual de nitrógeno a la biosfera correspondiente a la FBN es de aproximadamente 175 millones de toneladas por año, lo cual representa más del doble del nitrógeno aportado por los fertilizantes nitrogenados (VINUESA, 1998).

Un mayor aprovechamiento de la FBN podría reducir la necesidad de utilizar fertilizantes químicos. Entre las varias razones para buscar alternativas al uso de estos últimos; están de que los fertilizantes nitrogenados afectan el balance global del ciclo del nitrógeno, contaminan las capas freáticas del suelo, aumentan el riesgo

de derrame químico y el contenido de óxido nítrico atmosférico (N₂O), un gas potente en el efecto invernadero (ROSKOSKI, 1985).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden dividirse en dos grupos: a) las de vida libre, como por ejemplo las pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Beijerinchia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, etc, y b) las que fijan nitrógeno a partir del establecimiento de una simbiosis con las plantas leguminosas, las cuales pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, que en comúnmente se denominan “rizobios”(TAURIÁN, *et al.* 2002).

Si se examina la historia del estudio de la FBN, se puede advertir que el interés generalmente se ha focalizado en el sistema simbiótico de las plantas leguminosas y los rizobios, debido a que esta asociación tiene el mayor impacto cuantitativo en el ciclo del nitrógeno. Menos de la mitad del nitrógeno fijado biológicamente corresponde a la actividad de los fijadores libres, debido a que los mismos no fijan cantidades importantes de nitrógeno y no lo transfieren directamente a la planta sino que lo liberan al suelo. En cambio, la simbiosis rizobiana contribuye con grandes cantidades de nitrógeno a la planta, teniendo una importancia significativa en el rendimiento y la mayor producción del cultivo (TAURIÁN, *et al.* 2002).

La inoculación de la semilla con rizobios constituye una práctica agronómica más económica y generalmente más efectiva que la aplicación de fertilizantes nitrogenados para asegurar un adecuado suministro de nitrógeno a las leguminosas y a las especies asociadas. (TAURIÁN, *et al.* 2002).

2.2 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas pertenecen a la Familia Fabáceas, poseen la capacidad distintiva de asociarse simbióticamente a los rizobios. Las leguminosas están distribuidas mundialmente, ocupando el segundo lugar en importancia económica después de las gramíneas, constituyen un grupo relativamente primitivo que en forma y estructura varían poco, es una de las familias más numerosas.

Existen 7000 géneros y 14000 especies de leguminosas y lo más probable es que se usen 100 leguminosas importantes para la agricultura, pero no se han analizado todas para establecer su capacidad de fijar nitrógeno. En general, las leguminosas de grano fijan menos nitrógeno que las usadas como forraje, puesto que son cultivadas durante períodos más breves y tienen menos raíces en las que pueden formarse los nódulos.

El papel de las leguminosas en la agricultura es vital no solo por la capacidad de proveer nitrógeno, elemento esencial de las proteínas, sino también como un componente de prácticas de manejo de suelos (GRAHAM, 2000) tendientes a mejorar las condiciones físicas, químicas y biológicas, previniendo la degradación. En el Ecuador, las leguminosas son cultivadas en forma asociada, intercalada, como monocultivo y en rotación con otros cultivos (BERNAL, 2006).

Las leguminosas son consideradas muy importantes en las prácticas de conservación de suelos ya que su sistema radicular y sus residuos (hojas y tallos) al descomponerse sobre el suelo por la acción microbiana, incrementan la agregación de las partículas, mejorando la estructura y en general las propiedades de los suelos para mantener su fertilidad y calidad.

El uso de las leguminosas como abonos verdes y su mantenimiento sobre la superficie del suelo, permite aumentar la infiltración de agua, reducir la temperatura del suelo, aumentar la humedad, producir sombra, y evitar la erosión. El rastrojo es inicialmente desmenuzado por la macro y mesofauna (insectos, lombrices, artrópodos, etc.) del suelo, para posteriormente ser descompuestos por bacterias, hongos y actinomicetes, contribuyendo con la formación de humus del suelo. (BERNAL, 2006).

2.2.1 Coberturas Vegetales en Cultivos Perennes

POUND (1997), define a los cultivos de cobertura como “una cobertura vegetal viva que cubre el suelo y que es temporal o permanente, el cual está asociado a otras plantas”. Aunque los cultivos de cobertura pueden pertenecer a cualquier familia de plantas, la mayoría son leguminosas. El uso de cultivos de coberturas en sistemas perennes está mucho más ampliamente distribuido y reconocido que su uso en los cultivos anuales. Las funciones de los cultivos de cobertura en sistemas perennes cambian durante el ciclo de desarrollo de los

cultivos perennes. Durante la fase inicial de establecimiento, los cultivos de cobertura pueden reducir la lixiviación de nutrientes en el suelo, absorbiendo los nutrientes disponibles, los mismos que no son aun accesibles al sistema radicular parcialmente desarrollado de los perennes.

La cobertura vegetal de leguminosas en plantaciones de palma aceitera es una práctica muy recomendada en la actualidad, debido a sus grandes beneficios, principalmente sobre el suelo y el control de malezas.

RANKINE Y HARDTER (1998), manifiestan que dentro de los objetivos del uso de leguminosas de cobertura están las siguientes:

- Controlan la erosión, protegiendo el suelo de las lluvias fuertes y de la luz directa del sol.
- Mejoran la condición del suelo, proveyendo cobertura con materiales orgánicos.
- Reducen la temperatura del suelo, permitiendo infiltración más rápida y reduciendo la escorrentía superficial.
- Estimulan la micro y macro flora y fauna del suelo.
- Proveen de N por medio de la fijación simbiótica de N_2 atmosférico (500 a 600 kg N^{-1} ha $^{-1}$ año $^{-1}$ como por ejemplo la leucaena.
- Controlan plagas, previniendo la infestación de algunos escarabajos que aparecen en los troncos de palma caídas.
- Controlan malezas por competencia con otras plantas.

CARMONA (2004), indica algunas ventajas del uso de coberturas leguminosas, enfatizando que:

- Se ha encontrado en las parcelas de palmas con cobertura de Pueraria y otras leguminosas contenidos mayores de niveles foliares de nitrógeno, fósforo, potasio y manganeso.
- Se ha obtenido una producción significativamente mayor en áreas con coberturas de leguminosas versus aéreas sin ellas. Parcelas de palmas con leguminosas produjeron significativamente más que aquellas con cobertura natural en los primeros 20 meses de cosecha.
- En general por la producción de materia orgánica que se incorpora al suelo, la cobertura de leguminosas incrementa la agregación de las partículas

finas, el tamaño de los agregados del suelo, mejoran la porosidad total y la permeabilidad del suelo.

El mismo autor señala que la incorporación de nitrógeno atmosférico al suelo, puede ser aprovechado por las palmas. En un estudio realizado en Malasia en palma joven con una mezcla de *Centrocema pubescens* y *Pueraria phaseoloides*, se encontró que después de dos años y medio, los suelos contenían de 460 a 920 kg Ha⁻¹, lo que significaba más nitrógeno que en los suelos bajo cobertura natural o en suelos desnudos.

2.2.2 Especies de Leguminosas

Las especies de leguminosas se dividen en dos clases:

- Leguminosas de enredaderas.- los hábitos de agresividad e invasión de estas plantas hace que la cobertura del área entre palmas sea total, formando un colchón sobre la superficie del suelo algunas especies utilizadas son:
 - *Pueraria* spp (*P. phaseoloides*, *P. javanica*)
 - *Calopogonium* spp (*C. mucunoides*, *C. caeruleum*)
 - *Centrocema* spp (*C. pubescens*, *C. macrocarpum*, *C. brasilianum*)
 - *Desmodium ovalifolium*.

- Leguminosas erectas.- se caracterizan por sus raíces profundas, que se pueden utilizar en suelos compactados, por sus raíces pueden absorber nutrientes lixiviados e incorporarlos a la superficie luego de cortar sus ramas. Ejemplo:
 - *Flemingia congesta*.
 - *Leucaena leucosephala*.
 - *Tephrosia candida*.

2.2.1.1 Pueraria (*Pueraria phaseoloides*)

Es la más utilizada en el Ecuador especialmente asociada a la palma aceitera, debido a que es una leguminosa perenne, robusta trepadora, ligeramente leñosa, posee estolones de hasta 6 m longitud, que continúa emitiendo tallos aéreos, con

un sistema radicular profundo. Posee un follaje pubescente con vellos marrón rojizos.

Sus hojas son trifolioladas, los folíolos son oval romboides a veces lobulados, miden de 5 a 12 cm longitud por más de 11 cm de ancho. Las inflorescencias están constituidas por un racimo axilar, largamente pedunculado. Las flores son de color malva, púrpura o blanco. El estandarte es de color blanquecino con un manchón malva. La corola mide más de 2 cm. Tiene una vaina linear recta algo curvada en su extremo, comprimida, de más de 11 cm de longitud con 10 a 20 semillas. Sus semillas son de color marrón oscuro de 3,5 mm longitud, de forma oblonga o casi cilíndrica, el número de semillas por kilo es de 81 400 a 88 000. (www.mejorpasto.com; 2006)

GILLER and FAIRHURST (2003), manifiesta que la Pueraria tiene una moderada tolerancia a la sombra, que fija de 13 a 225 kg ha⁻¹ de nitrógeno acumulado, de 6 a 172 kg ha⁻¹ de nitrógeno total y que necesita de 2 a 8 kg ha⁻¹ de semilla, con un resultado final de una cama de 50 a 70 cm de alto, de cobertura total.

2.3 BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO ATMOSFERICO

2.3.1 Taxonomía Rizobiana

HELLRIEGEL y WILFARTH, citados por Taurián *et. al.* (2002), demostraron el origen bacteriano de la fijación de nitrógeno en nódulos de las raíces de leguminosas, los mismos que ya fueron descritos por Jerez (2004). Beijerinck en el año 1 888 obtuvo el primer cultivo bacteriano puro, que lo llamó *Bacillus radicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre de "*Rhizobium*" para estos aislados (TAURIÁN, *et al.* 2002).

Los primeros intentos en la clasificación rizobiana se basaron en la leguminosa de la cual los rizobios habían sido aislados. Posteriormente se descubrió que los rizobios no estaban restringidos a una sola planta, sino en muchos casos a más de un hospedero. Algunos están más especializados en nodular a la leguminosa de la cual fueron aislados, mientras que otras especies son promiscuas y establecen asociaciones fijadoras de nitrógeno efectivas con varios géneros de leguminosas

(PERRET, *et al.* 2000; BERNAL Y GHAMAM, 2001). Para su clasificación posteriormente se comenzó a aplicar criterios microbiológicos basados en las características morfológicas y en técnicas de cultivo para agrupar a los rizobios (TAURIÁN, *et al.* 2002). Más recientemente, el uso de técnicas basadas en la medición de la relación genética ha aportado un avance en el conocimiento de la filogenia de estos microorganismos (SPAINK, *et al.* 1998).

Los estudios filogenéticos moleculares han permitido establecer que los rizobios son un grupo polifilético, lo cual significa que no existiría una rama en el árbol evolutivo que los agrupe exclusivamente (YOUNG, 1996). Actualmente son seis los géneros en que se clasifican a los rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium* (SPAINK, *et al.* 1998) y todos ellos pertenecen al orden Rhizobiales dentro de la Clase de las "Alfaproteobacterias". Sin embargo, la capacidad de formar nódulos en las leguminosas no sólo se restringe a bacterias de esta clase de proteobacterias, ya que miembros de los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*, ubicados en la subdivisión β de las proteobacterias, establecen también simbiosis con leguminosas (MOULIN, *et al.* 2001).

La taxonomía de bacterias nodulantes de raíz y tallo en leguminosas se encuentra en un estado de actualización y transición. De acuerdo con la definición aceptada de especie en bacteriología, cada especie de rizobios consta de un grupo de cepas que comparten características que las distinguen como grupo de otros grupos de bacterias.

El uso de técnicas moleculares ha provisto de una descripción más precisa para las especies. El análisis de secuencias de los genes 16S rRNA se ha convertido en uno de los principales criterios para la descripción de las especies de rizobios. Se considera que las cepas cuyas secuencias del gen 16S rRNA son similares en un 97% o más, pertenecen a la misma especie. No obstante, cuando las secuencias de 16S rRNA son muy parecidas, no sirven para distinguir especies cercanamente relacionadas y esto ocurre debido a que este gen está muy conservado entre todos los organismos vivos; por lo que en la taxonomía de *Rhizobium* otros métodos considerando genes de nodulación y de fijación de nitrógeno han sido incluidos para definir especies dentro de cada género (PERRET, *et al.* 2000).

2.3.2 Rhizobium

Las bacterias “Rhizobium” comúnmente conocidas como “Rizobios” no solamente se encuentran en la rizósfera (zona de raíces de las leguminosas) sino también como habitantes naturales del suelo, representando del 0.1 al 8% del total de las bacterias en el mismo y hasta un 0.14% de su biomasa (SADOWSKY y GRAHAM, 1998).

Los rizobios son bacterias (bacilos) Gram negativo, de 0.5 a 0.9 μm de ancho y 1.2 a 3.0 μm de largo, que no forman endosporas, de vida libre, aerobias y anaerobias facultativas. Subsisten en el suelo como heterótrofos saprofitos cuando no están infectando a un huésped. Dependiendo de la estación, el historial de cultivos y las prácticas de tratamiento agrícola, puede haber entre 10 y 10^6 rizobios por gramo de suelo. Son bacterias móviles, con un flagelo polar único o bien de 2 a 6 flagelos peritricos, con presencia de gránulos de ácido poli-beta-hidroxibutírico (PHBA) y, en algunos casos, gránulos metacromáticos de polifosfatos. Generalmente *Rhizobium* vive saprofiticamente en el suelo, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio (FREIRE, 1996). En condiciones de laboratorio se obtiene un crecimiento óptimo de los mismos a temperaturas entre 25-30 $^{\circ}\text{C}$, con buena aireación, y con un pH del medio del cultivo entre seis y siete (SOMASEGARAN y HOBEN, 1994).

La característica más sobresaliente de los rizobios es su capacidad de establecer una asociación endosimbiótica (intracelular) con miembros de la gran familia de plantas de leguminosas cuyo resultado es la formación de nódulos, donde se realiza la fijación de nitrógeno. Graham (1998), indica que la información genética de la fijación de N está presente en los rizobios de vida libre y que la expresión de esta información es altamente afectada durante la simbiosis por la especificidad hospedante-cepa, además FREIRE (1996), manifiesta que algunas leguminosas tales como la soya, trébol y alfalfa son extremadamente exigentes o específicas respecto a su rizobio, mientras que otras son promiscuas, es decir, que pueden ser infectadas por un amplio rango de cepas de bacterias originalmente adaptadas a otras especies.

2.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSA – RHIZOBIUM

La fijación biológica de nitrógeno que ocurre en las leguminosas se lleva a cabo en órganos específicos, los nódulos radicales o en casos especiales, en nódulos de tallos. Los nódulos se producen como resultado de un complejo intercambio de señales entre los dos simbioses, el cual confiere especificidad a la simbiosis (HAUKKA, 1997).

RODRIGUEZ, *et al.* (1993). manifiestan que la asociación Leguminosa – Rhizobium, se presenta dentro de los nódulos que aparecen en las raíces de las plantas, esta asociación es responsable de que cerca del 40% de la fijación de nitrógeno se realice por medios biológicos.

2.4.1 Infección de la Planta

La interacción entre las bacterias y la planta comienza con una colonización de los rizobios en las raíces de la planta. La leguminosa permite que la bacteria invada sus raíces mediante la formación de hilos de infección u otras vías de acceso. Simultáneamente, las células corticales son activadas mitóticamente llevando a la formación del primordio nodular. Una vez que el rizobio llega al primordio, éste es liberado al citoplasma de sus células envuelto por una membrana peribacteroide de origen vegetal. El primordio nodular hasta la formación de un nódulo maduro y la bacteria se diferencia a bacteroide. Los bacteroides son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en amonio, el cual es luego utilizado por la planta (JEREZ, 2004).

2.4.2 Bases Moleculares de la Interacción *Rhizobium*-Leguminosa

La comunicación molecular entre el micro y macrosimbionte es necesaria para el reconocimiento mutuo de las partes simbióticas compatibles. La especificidad en tal identificación es obligatoria a los fines de evitar que el microorganismo no beneficioso o parasítico entren a la planta leguminosa. Las moléculas que están implicadas en la comunicación leguminosa-rizobio se agrupan en dos clases: a) las derivadas de las plantas que son flavonoides y glicoproteínas (lectinas) y b) las de origen bacteriano que incluyen lipoquitooligosacáridos (LCOs) conocidos como factores de nodulación (factores nod) y poli olisacáridos (exopolisacáridos, glucanos cíclicos y lipopolisacáridos) (VAN RHIJN y VENDERLEYDEN , 1995).

2.4.3 Flavonoides y Factores de Nodulación

Las leguminosas producen compuestos aromáticos capaces de inducir los genes bacterianos *nod* vía proteínas reguladoras NodD. La mayoría de estas sustancias son denominadas colectivamente flavonoides. Los flavonoides parecen tener múltiples roles durante varios estadios del desarrollo del nódulo y la planta. La capacidad de las leguminosas de atraer a los rizobios probablemente esta correlacionada con el espectro de compuestos fenólicos (flavonoides) que ellas secretan. Los rizobios responden a estas señales a través de la proteína NodD y proteínas relacionadas que actúan tanto como sensores del ambiente y como activadores de la transcripción de los genes *nod* (JEREZ, 2004).

2.4.4 Lectinas

Las lectinas son andesinas, de naturaleza proteica, que se unen a azúcares cuya función principal en la simbiosis probablemente es la de actuar como determinantes en diferentes maneras, lo cual sugiere que cada rizobio es capaz de producir diferentes tipos de factores *Nod*. (VAN RHIJN y VENDERLEYDEN, 1995).

2.4.5 Polisacáridos Bacterianos que Intervienen en la Simbiosis

La interacción física entre la bacteria y las células de la planta se hace progresivamente más íntima. Los polisacáridos de la superficie rizobiana adquieren relevancia. Son numerosos los ejemplos en los que rizobios mutantes que tienen alterada la composición de la superficie bacteriana resulten defectivos en la invasión intracelular de las células del casaca de la raíz, o en pleno desarrollo a la forma de bacteroide. Por tal motivo, los genes involucrados en la síntesis de las estructuras superficiales de los rizobios constituyen un grupo bien definido de genes esenciales para la simbiosis. Las moléculas más estudiadas en la interacción planta-microorganismo son los exopolisacáridos (EPS), los lipopolisacáridos (LPS) y los glucano cíclicos. (JEREZ, 2004).

2.4.6 Genes que Participan en la Simbiosis

El proceso de la nodulación comprende un complejo intercambio de señales que conducen a una expresión coordinada tanto de los genes de la bacteria como de la planta. En esta última, los productores de los genes, denominados nodulinas, pueden ser de dos tipos, dependiendo de su función y del momento de su expresión: las nodulinas tempranas se expresan durante el proceso de infección y en la morfogénesis nodular, mientras que las nodulinas tardías lo hacen durante la fijación de nitrógeno (FREIRE, 1996).

En la bacteria, los genes implicados en el proceso de nodulación se dividen en dos grupos cuya función se encuentra diferenciada: los genes tempranos comprenden los genes de nodulación y los que determinan las estructuras superficiales de los rizobios (MARTINEZ *et al.*, 1990).

Los genes responsables de la infección de la planta, formación del nódulo y síntesis de la molécula señal son los denominados genes de nodulación en los que se incluyen los genes *nod*, *nol* y *noe*. Los genes de nodulación se clasifican en comunes y específicos. Los primeros *nodABCDEFGHIJ* han sido encontrados en todos los rizobios estudiados hasta la fecha, mientras que los genes específicos de huésped (*hsn*) solo son necesarios para la nodulación de un huésped particular. La función principal de los genes de nodulación es la biosíntesis de los factores *Nod* o moléculas señal, que disparan en la planta el programa de morfogénesis nodular (curvatura del pelo radical, inducción de los focos meristemáticos, etc.) (STACEY, 1995).

Los genes de nodulación no se transcriben en ausencia de la planta hospedera, a excepción del gen regulador *nodD* que puede expresarse en vida libre. La activación de la transcripción de estos genes depende tanto de la presencia de flavonoides y derivados que se encuentran en los exudados radicales de la planta como de la proteína reguladora NodD (SPAINK, 1994). La proteína NodD activa los genes *nod* uniéndose a una región conservada de la caja *nod* ubicada corriente arriba del operón *nod* (STACEY 1995).

Entre los genes tempranos vinculados con la síntesis de las estructuras superficiales de los rizobios, están los genes *exo*, que codifican enzimas que participan en la síntesis del polisacárido extracelular (EPS). Estos parecen ser

indispensables para la formación de los canales de infección, fundamentalmente en aquellas plantas que forman nódulos indeterminados. También se les ha atribuido la función de evitar la activación del sistema de defensa de la planta contra la bacteria. (SPAINK, 1994). Los genes *lps* intervienen en la síntesis de los lipopolisacáridos (LPS) ubicados en la membrana externa bacteriana. A diferencia de los EPS, los LPS son necesarios tanto para la formación de nódulos determinados como indeterminados aunque son diferente nivel de requerimiento. Así mismo, es probable que el LPS actúe como señal para la planta, ya sea ayudando a la interacción simbiótica o suprimiendo las respuestas defensivas. Finalmente, los genes *ndv* son responsables de la síntesis de los B-glucanos cíclicos, componentes de la pared celular que se encuentra casi exclusivamente en los rizobios. Se cree que cumplen un papel importante en la osmorregulación, actuando como protector osmótico, y en la interacción planta-bacteria. A su vez, numerosas evidencias sugieren que estas moléculas podrían participar también, en la respuesta de defensa de la planta (BREEDVELD y MILLER, 1998).

Una vez desarrollado el nódulo, los rizobios se diferencian en el interior de las células vegetales como bacteroides y es allí donde se activa el proceso de fijación de nitrógeno. Este proceso está mediado por la inducción microaeróbica de los genes de fijación *nif* y *fix* (tardíos) vía la hemoproteína FISL. Las subunidades alfa y beta del componente I o MoFe-proteína de la nitrogenasa, están codificados por los genes *nifD* y *nifK* respectivamente, mientras que los polipéptidos del componente II o proteína Fe (dinitrogenasa reductasa) están codificadas por el gen *nifH*. El ensamblaje completo de la enzima nitrogenada requiere a su vez de los productos de otros genes *nif*, en particular los de los genes *nifB*, *nifE* y *nifN*, necesarios para la biosíntesis del cofactor FeMo (SPAINK, 1994).

Entre las diversas simbiosis fijadoras de nitrógeno que han evolucionado independiente en el tiempo, la asociación de las leguminosas con los rizobios parece estar bien adaptada para la fijación de nitrógeno. Esto se debe probablemente a la eficiencia de los nódulos en la regulación del ambiente físico-químico necesario para la expresión óptima de la actividad nitrogenasa del microsimbionte. Los componentes claves de esos circuitos reguladores son la barrera de difusión del oxígeno y la proteína leghemoglobina (Lb) que controlan estrictamente la concentración de oxígeno dentro de los tejidos manteniendo el nivel microaeróbico óptimo. Esta es una condición estrictamente necesaria ya que el complejo nitrogenasa es irreversiblemente inactivado por concentraciones

elevadas de oxígeno, aun cuando los bacteroides necesitan de él para la respiración. La barrera de difusión de oxígeno reduce en $10^4 - 10^5$ veces los niveles de oxígeno libre en los tejidos de fijación, mientras que la proteína Lb es requerida para la difusión de oxígeno a través del citoplasma de las células infectadas hacia la membrana del simbiosoma para la respiración activa del bacteroide. (VINUESA, 1998).

2.4.7 Tipos de Nódulos

El tipo de nódulos que se desarrolla está determinado por la planta hospedera. Según su estructura los nódulos se han clasificado en determinados e indeterminados. Los nódulos indeterminados son alargados y cilíndricos y se desarrollan mediante un crecimiento distal desde un meristema apical persistente, mientras que los nódulos determinados son esféricos y se desarrollan a partir de un meristema hemisférico no persistente (HAUKKA, 1997). Todos los estadios del desarrollo de los nódulos indeterminados están representados en uno mismo, desde el meristema distal al punto proximal de unión a la raíz, ya que todas las etapas ocurren simultáneamente. Algunos ejemplos de leguminosas que forman nódulos indeterminados son el trébol, alfalfa, arveja y guisante. Por otro lado, los nódulos determinados son esféricos y la división celular cesa en el inicio de su desarrollo por lo que forma final del mismo resulta del agrandamiento y no de la división de las células. Entre las plantas que forman nódulos determinados se encuentra la soya, el fréjol y el maní.

2.4.8 Fisiología de los Nódulos

La planta huésped suministra carbono y regula el oxígeno. La fijación del nitrógeno absorbe gran cantidad de energía y suele estar limitada por el aporte de carbono, en teoría, son necesarios hasta 22 moles de glucosa por un mol de nitrógeno fijado, de la manera que una parte sustancial de la producción fotosintética de la planta (7 al 12%) está destinada en gran medida a los nódulos (PAUL Y KUCEY, 1981).

En la fijación del nitrógeno atmosférico se convierte en nitrógeno orgánico gracias a la acción del complejo enzimático denominado nitrogenasa. La abnegación con agua resulta perjudicial para la fijación del nitrógeno en las leguminosas. Si bien la nitrogenasa requiere condiciones anaerobias o con escaso

oxígeno, las plantas y los rizobios los necesitan para respirar. La leghemoglobina se acumula entre los bacteroides y la membrana peribacteroide, proporcionando un color rojizo cuando son cortados los nódulos, está presente una elevada afinidad con el oxígeno, disminuyendo su concentración en los nódulos lo suficiente como para permitir que la respiración y la fijación del nitrógeno se realicen simultáneamente.

Los rizobios obtienen el carbono y a su vez, cuidan y suministran nitrógeno a las plantas. Los bacteroides excretan amonio (NH_3), el cual es fijado rápidamente por el glutamato dihidrogenasa (GDH). Los productos abandonan el nódulo a través del xilema. El NH_3 que los rizobios producen se transforma en alantoína y ácido alantoico, en leguminosas tropicales (COYNE, 2000)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales de Laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Medios de cultivo (Anexo 4)
- Autoclave
- Microscopio compuesto (100 x)
- Estufa
- Potenciómetro
- Micro pipeta
- Incubador.
- Cristalería
- Reactivos
- Fundas de plástico y de crecimiento (16,5 cm x 17,5 cm)
- Tijeras, pinzas, hojas de bisturí
- Solución nutritiva de Summerfield-N (Anexo 3)
- Macetas (Jarras Magenta)
- Sustrato (turba)
- Semillas de pueraria
- Balanza
- Agitador

3.1.2 Materiales de Campo

- Barreno
- Palas de desfonde
- Fundas de polietileno
- Etiquetas para identificación
- Refrigerante
- Guantes de contacto
- Agua destilada

3.1.3 Materiales de Análisis y Trabajo

- Computadora
- Cámara Digital
- Libro de Campo
- Papelería

3.2 MÉTODO

3.2.1 Definición de las áreas de muestreo.

La distribución de las zonas de muestreo de las cepas de la bacteria “*Rhizobium*” se realizó en una forma aleatoria de acuerdo a la superficie sembrada en las zonas productoras de palma aceitera. (Bloques) (San Lorenzo, Occidental y Región Amazónica)(Censo Palmero, 2005) La cantidad total fue de 60 muestras. En el Cuadro 1, podemos observar la distribución de las muestras.

Cuadro 1. Distribución de toma de muestras por zona de superficie sembrada de Palma Aceitera.

Zona	Codificación	Palmicultores	Superficie	%	Muestras
Quinindé	A, B, C, D, E	4091	119 414,61	58%	35
Quevedo	F, G, H, I	1464	54 416,5	26%	16
San Lorenzo	K	71	15 187,31	7%	4
Oriental	J	350	18 266,89	9%	5
TOTAL		5976	207 285,31	100%	60

Fuente: Censo Palmero, 2005. (Anexo 2).

La información de los palmicultores por cada zona se tomó del Censo Palmero, de acuerdo al número de muestras por zona, se realizó una distribución aleatoria para determinar los sitios de muestreo, donde se codificó la boleta del palmicultor y la provincia donde se encuentra ubicado.

La distribución de los lugares donde se tomó las muestras se encuentran indicadas en el Anexo 2.

3.2.2 Recolección de muestras de raíces de pueraria.

Para la toma de muestras de las cepas de la bacteria "*Rhizobium*", se realizó una calicata para observar las raíces de las plantas de pueraria, determinando la ubicación de los nódulos. Posteriormente las muestras se almacenaron en fundas a una temperatura de 4° C hasta el momento que se las utilizó en el laboratorio. La identificación se realizó colocando letras iniciales de los lugares de donde provienen y con una numeración progresiva.

La presente investigación se dividió en tres fases:

3.3 FASE DE LABORATORIO.- Aislamiento y caracterización fenotípica de la bacteria.

3.3.1 Métodos específicos de manejo del experimento

3.3.1.1 Aislamiento de "*Rhizobium*"

Para el aislamiento de los rizobios a partir de los nódulos, estos se desinfectaron superficialmente según el siguiente protocolo CIAT (1998):

- Sumergimiento de los nódulos en etanol (95%) durante 3 minutos.
- Sumergimiento de los nódulos en una solución de hipoclorito de sodio al (5%) durante 3 minutos.
- Lavado de los nódulos por 5 veces en agua destilada estéril.
- Posteriormente, cada uno de los nódulos se resuspendieron en 200µl de agua destilada estéril para luego ser macerado individualmente, bajo condiciones totalmente asépticas.
- Una alícuota de 25µl del macerado se sembró en placas Petri conteniendo levadura, manitol, agar, más el indicador de contaminantes Rojo Congo (LMA+RC) (VINCENT, 1975). Las placas se incubaron a 26 °C hasta la obtención de colonias.

3.3.1.2 Pruebas de Autenticación

Cultivos en medio LMA+Rojo Congo

Los rizobios de los nódulos provenientes de las plantas de pueraria se sembraron en placas Petri conteniendo LMA con el indicador rojo congo (RC) (10ml/L) (CIAT, 1988), e incubadas a 26° C durante 7 a 14 días.

Cultivo en medio GPA

Los aislamientos se sembraron en medio glucosa-peptona-agar (GPA) conteniendo púrpura de bromocresol (10 ml/L) (CIAT, 1988). Las placas se incubaron a 26° C durante 7 a 14 días.

3.3.1.3 Conservación de la Bacterias

La conservación de las cepas bacterianas se realizó en tubos liofilizados, para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

Se preparó una solución de peptona al 20% y otra de sucrosa al 10%. Estas soluciones se esterilizaron por separado durante 15 minutos a 121° C. Se mezclaron, y la mezcla se dispersó en cajas Petri conteniendo la bacteria, frotando la superficie del medio con un asa de platino, hasta formar una suspensión bacteriana homogénea. A continuación, se colocó alícuotas de 200 µl de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf (1.5 ml de capacidad) previamente esterilizados y sellados con algodón estéril.

Los tubos fueron llevados a un liofilizador Labconco. Los tubos permanecieron 24 horas a – 54 °C, luego de lo cual, se cerraron y se almacenaron en refrigeración (4° C).

3.3.1.4 Caracterización de la bacteria

Crecimiento

Para el crecimiento en los distintos medios de cultivo se utilizó suspensiones fisiológicas frescas de cada uno de los aislamientos. Para lo cual, una colonia

aislada se transfirió al medio levadura manitol que fue incubado a 26 °C. Una vez que todos los cultivos bacterianos alcanzaron un contenido aproximado de 10^9 cel/ml, determinado por la metodología de Mac Farland (SOMASEGARAN y HOBEN, 1994), aproximadamente después de 12-14 días; por dilución en agua estéril se llevo a una concentración final de 10^5 cel/ml.

A partir de las suspensiones bacterianas (10^5 cel/ml), se tomó alícuotas de 50 μ l depositadas cada una de ellas dentro de los orificios de un plato de ELISA (BERNAL y GRAHAM, 2001). Con la ayuda de un inoculador multipunto de 48 descargas, se transfirió sobre la superficie de los distintos medios de cultivo.

3.3.1.5 Variables

3.3.1.5.1 Tiempo de Crecimiento

Los aislamientos se sembraron en el medio levadura manitol agar (LMA), determinándose dos rangos de crecimiento: 3 a 5 días para rizobios de crecimiento rápido y 7 a 12 días para rizobios de crecimiento lento (Somasegaran y Hoben, 1994). Los aislamiento se incubaron a 26 °C y las lecturas se ejecutaron a los 5 y 12 días.

3.3.1.5.2 Morfología de Colonias

Los aislamientos se sembraron en medio LMA e incubados a 26 °C hasta la aparición de las colonias. Estas se clasificaron en tres categorías: acuosas translúcidas, acuosas blancas opacas y cremosas opacas.

3.3.1.5.3 Producción de acidez y alcalinidad del medio LMA

Los microsimbiontes de Pueraria se sembraron en medio LMA conteniendo azul de bromotimol (0.25 g/100ml) (CIAT, 1988). Las placas se incubaron a 26°C por 7 días determinándose la acidificación (color amarillo) o alcalinización (color azul) producido por las bacterias.

3.3.1.5.4 Crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno

Se siguió el método descrito por Bernal y Graham. (2001). Se utilizaron diferentes soluciones de fuentes de carbono y nitrógeno, entre las que se menciona: sorbosa, tartrato, D-glucoronic, eritritol, dulcitol, citrato, lactatosa, glicina, triptófano, tirosina, respectivamente. Cada una usada en una concentración final de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en un medio basal. Además se incluyeron glucosa, galactosa, xylosa, fructosa, maltosa, sacarosa. El crecimiento de las bacterias se determinó a los 7 días de incubación. (JEREZ, 2004).

3.3.1.5.5 Resistencia a antibióticos

Los aislamientos se probaron de acuerdo a su capacidad de resistencia a los antibióticos: estreptomina, espectinomicina, kanamicina, ácido nalidíxico, contenidos en medio triptona-levadura-agar (TLA) (BERNAL y GRAHAM, 2001).

3.3.1.5.6 Tolerancia a metales pesados

Se siguió el método descrito por BERNAL y GRAHAM (2001), probando la tolerancia a: Al, Pb, Cu, Zn, contenidos en medio TLA. La presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos, se determinó luego de ser incubados a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

3.3.1.5.7 Tolerancia a pH ácido y alcalino

Los aislamientos se evaluaron en su capacidad de crecer en medio triptona-levadura-agar (TLA) a pH 4.5; 5.0; y 8.5 (BERNAL y GRAHAM, 2001). El crecimiento se determinó luego de incubar los cultivos a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

3.3.1.5.8 Tolerancia a concentraciones de NaCl

Se siguió el método descrito por BERNAL y GRAHAM (2001), determinando la tolerancia a 0.5%; 1.0%; 2.0% de NaCl. Los medio TLA (triptona-levadura-agar) conteniendo dichas concentraciones de sal se incubaron a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

Las fuentes de carbono y nitrógeno, así como los antibióticos, metales pesados y cloruro de sodio se esterilizaron por filtración utilizando filtros Acrodisc, de 0.2 μm , para ser añadidos a los distintos medios estériles a 55 $^{\circ}\text{C}$.

3.3.1.5.9 Tolerancia al Nitrógeno

Se siguió el método descrito por Bernal y Graham (2001), probando la tolerancia a concentraciones de 20, 50, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de N en una dilución de 1g/L, contenidos en medio LMA. La presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos se determinó luego de ser incubados a 26 $^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

3.3.1.6 Identificación a nivel de genero

3.3.1.6.1 Análisis estadístico

Para determinar el grado de relación de los aislamientos de "*Rhizobium*", los resultados de la caracterización se sometieron a un análisis de Clóster o agrupamiento. Para esto se elaboró una matriz de datos binarios. El crecimiento positivo de las cepas en cada prueba fue considerada como valor uno (1) y la ausencia de crecimiento como cero (0).

Una vez codificados los datos se sometieron al análisis de Cluster, utilizando el método de UPGMA (Media Aritmética No Ponderada; Sneath & Sokal, 1973). También se utilizaron los programas SPSS ver. 8.0 y el SAS (Statistical Analysis System). El análisis de Clóster permitió generar un dendograma mostrando la relación (parentesco) entre las diferentes cepas aisladas.

3.4 FASE DE INVERNADERO.- Evaluación de la Eficiencia Simbiótica en Sustrato

3.4.1 Factores en estudio

Para este estudio, las cepas purificadas fueron los factores en estudio. Se tomaron representantes de cada grupo formado en el dendograma, correspondiente a la caracterización de las cepas.

3.4.2 Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron:

Cuadro 2. Esquema del Análisis de Varianza para la determinación de la Eficiencia de Fijación de Nitrógeno.

No.	Tratamientos	Designación	No.	Tratamientos	Designación
1	TT	Tratamiento Absoluto	22	C26	Cepa 26
2	TN	Tratamiento Nitrogenado	23	C29	Cepa 29
3	C1	Cepa 1	24	C30	Cepa 30
4	C2	Cepa 2	25	C34	Cepa 34
5	C5	Cepa 5	26	C36	Cepa 36
6	C6	Cepa 6	27	C37	Cepa 37
7	C7	Cepa 7	28	C38	Cepa 38
8	C8	Cepa 8	29	C43	Cepa 43
9	C9	Cepa 9	30	C44	Cepa 44
10	C10	Cepa 10	31	C45	Cepa 45
11	C12	Cepa 12	32	C46	Cepa 46
12	C13	Cepa 13	33	C47	Cepa 47
13	C14	Cepa 14	34	C51	Cepa 51
14	C15	Cepa 15	35	C52	Cepa 52
15	C16	Cepa 16	36	C53	Cepa 53
16	C17	Cepa 17	37	C55	Cepa 55
17	C18	Cepa 18	38	C56	Cepa 56
18	C19	Cepa 19	39	C58	Cepa 58
19	C20	Cepa 20	40	C59	Cepa 59
20	C21	Cepa 21	41	C60	Cepa 60
21	C24	Cepa 24	42	C Col	Cepa Colombiana

3.4.3 Procedimientos

3.4.3.1 Diseño experimental

- Tipo de Diseño

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA).

- Número de Repeticiones

Tres.

3.4.4 Características de las unidades experimentales

Estuvo conformada por una maceta conteniendo, sustrato (turba y pomina, 3:1), en la cual se colocó dos semillas de *Pueraria phaseoloides* previamente desinfectadas y pregerminadas. Posteriormente, se las inoculó (directamente al sustrato) con las cepas de "*Rhizobium*", específicas de acuerdo al tratamiento, en una cantidad de 10ml conteniendo 10^8 cel/ml.

3.4.4.1 Análisis estadístico

3.4.4.1.1 Análisis Funcional

Se calculó el Coeficiente de Variación expresado en porcentaje (CV%), la prueba de Tukey al 5%, para los tratamientos, y comparaciones ortogonales se utilizó DMS 5%.

3.4.4.1.2 Datos a tomar y métodos de evaluación

3.4.4.1.2.1 Peso fresco de la parte aérea

A los 60 días de crecimiento, las plantas fueron cortadas a la altura del cuello de la raíz. El follaje fresco fue pesado y se anotó el resultado en gramos.

3.4.4.1.2.2 Peso seco de la parte aérea

El follaje fue secado en estufa a 70° C durante 48 h y luego pesado y se registró el resultado en gramos.

3.4.4.1.2.3 Número de nódulos

Al mismo tiempo del corte del follaje, se evaluó la nodulación en cada una de las raíces, determinando el número de nódulos.

3.4.4.1.2.4 Peso de nódulos frescos

Los nódulos fueron pesados y el resultado se anotó en gramos.

3.4.4.1.2.5 Peso de nódulos secos

Los nódulos fueron colocados en tubos de plástico y secados en una estufa a 70° C durante 48 h, luego pesados y el resultado se lo expreso en gramos.

3.4.4.1.2.6 Porcentaje de nitrógeno en la parte aérea

Se realizó el análisis foliar en el laboratorio para determinar el porcentaje de N en la parte aérea de las plantas.

3.4.4.1.2.7 Determinación de Nitrógeno Total

Se multiplicó el peso de la materia seca de las plantas por la cantidad de nitrógeno presente en las mismas.

3.4.5 Métodos específicos de manejo del experimento

3.4.5.1 Activación de las cepas en medio LMA

Se tomaron los tubos eppendorf conteniendo las cepas conservadas por liofilización. Se preparó una solución estéril de sucrosa y sacarosa. Se coloco 200 uml, de la solución en cada tubo y se procedió a activar la bacteria en medio LMA, durante 15 días (JEREZ, 2004).

3.4.5.2 Desinfección superficial y germinación de las semillas

Las semillas de pueraria limpias, sanas y de tamaño uniforme, se esterilizaron superficialmente siguiendo el método de VINCENT (1975). Las semillas fueron tratadas con etanol 96 % durante 3 minutos, hipoclorito de sodio al 5 % durante 3 minutos, y lavados (7 veces) con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en placas de Petri conteniendo agar al 1.5 % e incubadas a 27° C durante 4 días.

3.4.5.3 Adecuación del sustrato

Se realizó un análisis físico-químico del sustrato para en base a los resultados, prever la fertilización con P, K y micro nutrientes.

3.4.5.4 Preparación de Inoculante

Se preparo medio líquido de levadura manitol, se coloco 10 ml de este medio en tubos, los cuales fueron esterilizados. En condiciones de asepsia, se coloco con un asa de platino una alícuota de las cepas activadas. Los tubos permanecieron por 72 horas en agitación constante, a una velocidad de 90 rpm. Se determino la concentración de las cepas, uniformizando la concentración a 10^8 cel/ml.

3.4.5.5 Siembra e inoculación

Las macetas fueron desinfectadas con alcohol antiséptico, antes de colocar el sustrato. Al momento de colocar el sustrato, se tuvo la precaución de no tocarlo directamente con las manos para evitar contaminación. Las macetas fueron colocadas en un invernadero a 28° C, y 80% de humedad.

Dos semillas pre-germinadas fueron transferidas asépticamente a las macetas que contenían el sustrato que previamente fue sometido a esterilización por una hora.

Los cultivos crecidos con una concentración de 10^8 cel/ml se tomaron 10 ml y se depositaron sobre la semilla pre-germinada.

Se observo el crecimiento de las plantas durante 60 días.

3.4.5.6 Labores Culturales

De acuerdo a la evapotranspiración del sustrato y a observaciones visuales de humedad del mismo, se procedió a regar con agua destilada estéril en cantidades de 50 ml en los primeros 20 días y 100 ml en los días restantes. A los 15, 30 y 45 días se incorporó elementos nutritivos en las macetas con medio

Summerfield Nutritivo (JEREZ, 2004). A los 60 días, las plantas fueron cosechadas y colocadas en fundas de papel.

4 Características del campo de experimentación

La fase de invernadero se realizó en las Instalaciones del Centro de Investigaciones de Palma Aceitera CIPAL.

Localización

Provincia:	Esmeraldas
Cantón:	La Concordia
Parroquia:	La Concordia
Lugar:	CIPAL

Características geográficas y climáticas¹

Altitud:	260 msnm
Latitud:	00°02'54"S
Longitud:	79°24'54"W
Precipitación anual promedio:	3071 mm
Luminosidad promedio:	626 horas
Temperatura promedio:	24°C
Temperatura máxima:	30°C
Temperatura mínima:	20°C
Topografía:	plana en un 40% y ondulada un 60%
Tipo de suelo:	Franco Arcilloso Franco Limoso
Orden:	Inseptisoles.
Origen:	Ceniza Volcánica
Humedad promedio anual:	88%.

¹ Estación Meteorológica Santo Domingo, Promedios de Años (1970-2000).

3.5 FASE DE CAMPO.- Evaluación de la Eficiencia Simbiótica en Campo.

3.5.1 Factores en estudio

Cepas seleccionadas por localidad (C) análisis combinado Cepas por Localidades (C) x (L).

Cepas (C)

SIGNO	CEPAS SELECCIONADAS
c1	QP12
c2	QuZN47
c3	QE26
c4	QuLR51
c5	QE43
c6	C C

3.5.2 Tratamientos

Los tratamientos por localidades fueron:

Cuadro 3. Esquema de Análisis de Varianza para localidades

No.	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
T1	QE12	Pueraria + QE12
T2	QuZN47	Pueraria + QuZN47
T3	QE26	Pueraria + QE26
T4	QuLR51	Pueraria + QuLR51
T5	QE43	Pueraria + QE43
T6	CC	Pueraria + CC
T7	TN	Pueraria + Fertilización N
T8	TT	Pueraria
T9	M	Maíz
T10	S	Sorgo

Las Localidades fueron:

LOCALIDADES	CÓDIGO	ZONA
PALPAILON	P	SAN LORENZO
ALESPALMA	A	SAN LORENZO
ESPE	E	QUEVEDO
CIPAL	C	QUININDE

3.5.3 Procedimientos

3.5.3.1 Diseño experimental

- Tipo de Diseño

Se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), para cada localidad y un combinado entre localidades.

- Número de Repeticiones

Cuatro.

3.5.3.2 Características de las unidades experimentales

3.5.3.2.1 Unidad experimental

La unidad experimental constó de siete surcos y sus dimensiones fueron de 5,20 m largo x 0,5 m de ancho (18,20 m²), separadas una de otra por 1 metro de distancia. Los bloques mantuvieron una distancia de 2 metros.

3.5.3.2.2 Parcela neta

La parcela neta estuvo constituida de 3 surcos centrales, siendo sus dimensiones de 4.20 de largo x 0.5 m de ancho, correspondiendo el área total a 6,3 m²

3.5.3.2.3 Análisis funcional.

Se calculó el Coeficiente de Variación (expresado en porcentaje CV%), la prueba de Tukey al 5%, para los tratamientos, sitios, cepas. Adicionalmente se realizaron comparaciones ortogonales utilizando DMS 5%.

3.5.3.3 Datos a tomar y métodos de evaluación

3.5.3.3.1 Peso fresco de la parte aérea

Se realizó observaciones de nodulación, a los 60 días de sembrado. Se tomaron nueve plantas al azar de los tres surcos centrales. Se determinó el peso de la parte aérea y se registró el peso en gramos/planta.

3.5.3.3.2 Peso seco de la parte aérea

El mismo material vegetal fresco se secó en una estufa a 70° C durante 48 horas, posteriormente se registró el peso seco en gramos/planta.

3.5.3.3.3 Peso de nódulos

De las raíces de las mismas nueve plantas se separaron los nódulos. Se registró su peso después de mantenerlos en estufa a 70° C por 48 horas.

3.5.3.3.4 Porcentaje de nitrógeno total

De una muestra tomada de la parcela neta, se realizó un análisis foliar para determinar el contenido de NT (%). Este parámetro se determinó por el método de Kjeldalh, en los laboratorios del Departamento de Manejo de Suelos y Agua (DMSA) de la EESC del INIAP.

3.5.3.3.5 Determinación de Nitrógeno Total

Para determinar el peso de la materia seca por hectárea, se aplicó el método del cuadrante. En la parcela neta, se colocó al azar un cuadrante de madera de 0,25 m, se cortó las plantas que estaban dentro y se determinó la materia seca. Luego, este valor se multiplicó por el porcentaje de nitrógeno obtenido en el laboratorio.

3.5.4 Métodos específicos de manejo del experimento

Se preparó el suelo mediante la limpieza y remoción superficial del suelo; para posteriormente trazar los surcos a 0,50 m de distancia. Se efectuó el trazado de los bloques, cada uno con 4 parcelas que serían las unidades experimentales.

Antes de la siembra se procedió a fertilizar todas las parcelas con fósforo, potasio y micro nutrientes, de acuerdo al análisis del suelo realizado en la EESC, y a los requerimientos del cultivo. Se aplicó urea (46% N, 80 kg/ha) únicamente en las unidades experimentales del tratamiento nitrogenado.

Para la preparación del inoculante, se procedió a reactivar las cepas liofilizadas en medio LMA, después se las colocó en medio líquido LM, agitándolas hasta que alcanzaron una concentración de 10^8 cel/ml, paralelamente se seleccionó una turba con un alto contenido de materia orgánica (70 a 60% de MO), se lo esterilizó por una hora. Luego en medio aséptico, se colocó la turba en fundas de plásticas estériles. Por último se colocó una cantidad de 10 ml de suspensión de bacterias a una concentración de 10^8 cel/ml y se las incubó durante 7 días.

Las semillas se inocularon al momento de la siembra, incorporando las cepas contenidas en turba. La dosis fue de 10 g de inoculante por kilogramo de semilla, más una solución de azúcar al 25%. Para esto, se siguió la metodología sugerida por Bernal et al. (2002).

La siembra de la semilla se efectuó en forma manual con el sistema de golpes cada 40 cm. de distancia entre plantas. En cada sitio se depositaron tres semillas. Antes de la siembra, se realizó un riego para garantizar un mejor establecimiento de la bacteria y la germinación de la semilla.

Se realizaron controles para las hormigas, con el uso de una bomba endosulfadora. Los riegos se realizaron dependiendo de las condiciones medio ambientales.

La toma de datos se realizó manualmente a los 60 días de edad del cultivo. Las plantas fueron cortadas en la base del tallo y colocadas en fundas de papel. Estas fueron previamente identificadas de acuerdo al tratamiento. Se las sometió al peso fresco y seco.

3.5.5 Características de los sitios experimentales.

Localización 1. La Concordia.

Provincia: Esmeraldas
Cantón: La Concordia
Parroquia: La Concordia
Lugar: CIPAL

Localización 2. San Lorenzo.

Provincia: Esmeraldas
Cantón: San Lorenzo
Parroquia: Km 5
Lugar: Palmeras de Palpailón

Localización 3. San Lorenzo.

Provincia: Esmeraldas
Cantón: San Lorenzo
Parroquia: Waiza
Lugar: Alespalma

Localización 4. Quevedo.

Provincia: Pichincha – Los Ríos.
Cantón: Santo Domingo
Parroquia: Luz de América
Lugar: Hda. Zoila Luz

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FASE DE LABORATORIO

4.1.1 BANCO GERMOPLÁSMICO.

4.1.1.1 Localidades de Recolección

Las muestras de aislamientos nativos de las bacterias fueron 60 provenientes de las cuatro zonas productoras de Palma Aceitera 35 de la zona de Quinindé, 5 de la zona de San Lorenzo, 5 de la zona del Oriente y 15 de la zona de Quevedo.

Cuadro 4. Localidades de las Zonas de Quinindé, San Lorenzo, Oriente y Quevedo, donde se recolectaron los aislamientos nativos de “rizobios” asociados a la Pueraria (*Pueraria phaseoloides*).

ZONA	Nº.	LOCALIDAD	PROVINCIA
Quinindé	1	Quinindé	Esmeraldas
	2	Quinindé	Esmeraldas
	3	Quinindé	Esmeraldas
	4	Quinindé	Esmeraldas
	5	Quinindé	Esmeraldas
	6	Quinindé	Esmeraldas
	7	Unión Manabita	Esmeraldas
	8	Vía Vélez-Mataje	Esmeraldas
	9	Quinindé	Esmeraldas
	10	Quinindé	Esmeraldas
	11	Santo Domingo	Pichincha
	12	Zona no Delimitada	Pichincha
	13	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
	14	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
	15	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
	16	El Silencio	Zona no Delimitada
	17	Almorzadero	Esmeraldas
	18	Quinindé	Esmeraldas
	19	Puerto Quito	Pichincha
	20	Puerto Quito	Pichincha
	21	Quinindé	Esmeraldas
	22	Quinindé	Esmeraldas
	23	Puerto Quito	Esmeraldas

	24	Siempre Unidos	Zona no Delimitada
	25	Quinindé	Esmeraldas
	26	Quinindé	Esmeraldas
	27	Quinindé	Esmeraldas
	28	Quinindé	Esmeraldas
	29	Santo Domingo	Pichincha
	30	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
	31	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
	32	Quinindé	Esmeraldas
	33	Rosa Zárate	Esmeraldas
	34	Rosa Zárate	Esmeraldas
	35	Zona no Delimitada	Zona no Delimitada
San Lorenzo	1	San Lorenzo	Esmeraldas
	2	San Lorenzo	Esmeraldas
	3	San Lorenzo	Esmeraldas
	4	San Lorenzo	Esmeraldas
	5	San Lorenzo	Esmeraldas
Oriente	1	Orellana	Orellana
	2	Orellana	Orellana
	3	Shushufindi	Sucumbíos
	4	Shushufindi	Sucumbíos
	5	Shushufindi	Sucumbíos
Quevedo	1	Recinto La 25	Los Ríos
	2	Paraíso la 14	Zona no Delimitada
	3	El Palme	Guayas
	4	Paraíso la amazonas	Zona no Delimitada
	5	Paraíso Santa Martha	Zona no Delimitada
	6	Buena Fe	Los Ríos
	7	Santo Domingo	Pichincha
	8	Valencia	Los Ríos
	9	Valencia	Los Ríos
	10	Valencia	Los Ríos
	11	Ventanas	Los Ríos
	12	Valencia	Los Ríos
	13	Valencia	Los Ríos
	14	Quevedo	Los Ríos
	15	Buena Fe	Los Ríos

Adicionalmente se utilizó como testigo, una cepa proveniente del Laboratorio MICROAGRO de Colombia.

Se clasificó a cada cepa nativa, asignándole la primera letra de la zona de procedencia, seguido de la primera letra de cada provincia proveniente y el número correspondiente al orden de toma muestras. De esta manera se obtuvo 35 cepas de la zona de Quinindé, 5 de la zona de San Lorenzo, 5 de la zona de Oriente y 15 de la zona de Quevedo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Codificación de las cepas nativas en Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), recolectadas en las cuatro zonas productoras de Palma Aceitera y los nombres de los palmicultores donde se realizó la recolección.

Nº.	Codificación	PROPIETARIO
1	QE1	Argotti Luís
2	QE2	Mayor Alfonso Hernández
3	QE3	Furukawa
4	QE4	Soto Walter
5	QE5	Muñoz Jorge
6	QE6	Bechach
7	QE7	Mendieta Winter
8	QE8	Álvarez Miguel
9	QE9	Farias Roque
10	QE10	Córdova Cevallos Ed
11	QP11	Hitti Pierre
12	QP12	Alzamora Mario
13	QZN13	Hasegawa
14	QZN14	Cooperativa Orellana
15	QZN15	Palacios Máximo
16	QZN16	Mariño Antonieta
17	QE17	Dr. Córdova
18	QE18	Egas Patricio
19	QP19	González Ramiro
20	QP20	Meneces Ramiro
21	QE26	Cedeño Maura
22	QE27	Tipán Maria
23	QE28	Gangotena Enrique
24	QZN29	Sánchez Dionisio
25	QE30	Salazar Juan
26	QE31	Choez Ángel
27	QE32	Cevallos Rodrigo
28	QE33	Inexpal
29	QP39	Barreiro Lidia
30	QZN40	Dávalos Juan Carlos
31	QZN41	Pazmiño Armando
32	QE42	Palmeras de los Andes
33	QE43	García Víctor
34	QE44	Egas Patricio
35	QZN45	Salinas Antonio

1	SLE21	Palesema
2	SLE22	Palmeras de los Andes
3	SLE23	Palpailon
4	SLE24	Alespalma
5	SLE25	Aiquisa
1	OO34	Martínez Ernesto
2	OO35	España Alberto
3	OS36	Valdivieso Beatriz
4	OS37	Palmeras del Ecuador
5	OS38	Chamba Amay Ramiro
1	QuLR46	Pacurucu Milton
2	QuZN47	Agroparaiso
3	QuG48	Dávila Gustavo
4	QuZN49	Herrera Laura
5	QuZN50	Haro Carlos
6	QuLR51	Sandoval Cesar
7	QuP52	San Antonio
8	QuLR53	Etesa
9	QuLR54	Chang
10	QuLR55	Alvarez Harry
11	QuLR56	Wong Washington
12	QuLR57	Dilon Samuel
13	QuLR58	Chong
14	QuLR59	Manobanda
15	QuLR60	Ortega Fernando

4.1.1.2 Conservación de las Cepas

Cada una de las cepas nativas y la testigo, fueron crecidas en medio LMA, y liofilizadas. Las cepas se mantienen almacenadas en el laboratorio de ANCUPA-CIPAL a 4°C.

4.1.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

4.1.2.1 Crecimiento de la Bacteria

Siete cepas (QE8, QE10, QE17, QE18, QP20, QE26, QZN29) (cuadro 7), presentaron un crecimiento rápido en medio LMA, con un tiempo de crecimiento de colonias de 3 días versus 9 días de las 33 restantes, las cuales fueron consideradas de crecimiento lento en el mismo medio de cultivo. Las cepas de crecimiento rápido

resultaron ser de la Provincia de Esmeraldas (Quinindé y San Lorenzo) y una de la Provincia de Pichincha (zona límite con Esmeraldas).

Cuadro 6. Crecimiento, morfología y acidificación del medio de cultivo.

Cepas	Tipo de Crecimiento	Morfología	Acidificación del Medio
QE1	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QE2	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QE3	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QE4	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QE6	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QE7	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QE8	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Acidifican
QE10	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Alcalinizan
QP12	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QZN13	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QZN15	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QE17	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Alcalinizan
QE18	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Alcalinizan
QP19	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QP20	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Acidifican
QE26	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Acidifican
QZN29	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	Acidifican
QZN41	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QE43	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QE44	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QZN45	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
SLE21	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
SLE23	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
SLE24	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
OO34	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
OS36	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
OS38	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR46	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QuZN47	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuG48	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuZN49	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuZN50	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR51	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR53	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR54	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR55	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Acidifican
QuLR57	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR58	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR59	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan
QuLR60	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	Alcalinizan

4.1.2.2 Morfología de las Colonias

Las cepas de crecimiento rápido, formaron colonias circulares de apariencia acuosa de color blanco opaco, mientras que las cepas de crecimiento lento, tomaron una coloración cremosa opaca (cuadro 7).

4.1.2.3 Variación del pH del Medio de LMA + Azul de Bromotimol

Los resultados mostraron que las cepas de crecimiento rápido (QE8, QE10, QE17, QE18, QP20, QE26, QZN29), acidificaron el medio de cultivo LMA usando azul de bromotimol, y convirtiéndolo a una coloración amarillenta, con excepción de los aislamientos QE10, QE17, QE18 y SLE23, que alcalinizaron el medio de cultivo (color azul). Las cepas de crecimiento lento, alcalinizaron el medio de cultivo, pero así mismo se observó ciertas excepciones, como las cepas QP12, QZN15, QP19, SLE24, QE26, QZN29, QuLR46 y QuLR55 que no lo hicieron.

4.1.2.4 Crecimiento en Diferentes Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Un aspecto importante de señalar en relación a las fuentes de carbono, es que todas las cepas de la zona de San Lorenzo, fueron capaces de metabolizar los disacáridos: sacarosa, maltosa y lactosa, mientras que solamente cinco de la zona de Quinindé, (QE1, QE6, QE10, QE17 y QP19), una cepa proveniente del Oriente (OO34), y dos de la zona de Quevedo (QuLR46 y QuLR58) tuvieron la capacidad de metabolizar los tres disacáridos descritos. Con respecto a las fuentes de nitrógeno: glycine, triptofano y tirosina, los resultados demostraron que solo las cepas QE18 y QP19 de la zona de Quinindé, y las QuLR53 y QuLR58, de la zona de Quevedo, metabolizan las fuentes de N. Las cepas de las dos zonas restantes no mostraron crecimiento notable en estas fuentes (Cuadro 8). Este comportamiento de las cepas puede ser debido probablemente a algún mecanismo de adaptación.

Cuadro 7. Comportamiento las cepas nativas de rizobios nodulantes en Pueraria (*Pueraria phaseoloides*) frente a diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno.

Cepas	Fuentes de Carbono												F Nitrógeno			
	Lactosa	Eritrol	Dulcitol	D-glucoronic	Galactosa	Citrato	Xylosa	Maltosa	Fructosa	Sorbosa	Sacarosa	Glucosa	Tartrato	Triftofano	Glicina	Tirosina
QE1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
QE2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
QE4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE6	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
QE7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE10	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
QP12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN13	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE17	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
QE18	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
QP19	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
QP20	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
QE26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN29	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
QZN41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE44	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN45	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLE21	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
SLE23	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
SLE24	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
OO34	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
OS36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OS38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR46	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
QuZN47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuG48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuZN49	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
QuZN50	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
QuLR51	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
QuLR53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
QuLR54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR58	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
QuLR59	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = Ausencia de Crecimiento

1 = Presencia de Crecimiento

4.1.2.5 Tolerancia a Diferentes Condiciones de Estrés.

4.1.2.5.1 Antibióticos.

Se observa en el cuadro 9, que la kanamicina fue el antibiótico, al cual las cepas en estudio presentaron mayor tolerancia, con cinco cepas de Quinindé, una de San Lorenzo, una del oriente, y una de la zona de Quevedo. En el medio de cultivo conteniendo ácido nalidíxico, sólo siete cepas mostraron crecimiento, de las cuales, cuatro correspondieron a Quevedo, una a Quinindé, una a San Lorenzo y una a la región amazónica. En estreptomycinina, a la concentración arriba indicada, crecieron siete, con tres pertenecientes Quinindé, tres a Quevedo y una al oriente. En espectinomycinina, ninguna de las cepas evidenció crecimiento a la concentración experimentada (Cuadro 9).

4.1.2.5.2 Metales Pesados.

Los datos obtenidos en el análisis de metales pesados mostraron que cinco cepas de Quinindé (QE7, QE8, QZN15, QP19, QE26) crecieron en el medio de cultivo conteniendo los metales Zinc y Plomo, y solo una de San Lorenzo (SLE21) y una del oriente (OO34), crecieron en medio con este metal. Las cepas de Quevedo no toleraron ningún metal pesado (cuadro 9).

4.1.2.5.3 Acidez.

En cuanto a pH del medio, los resultados mostraron que tres cepas de Quinindé (QE1, QE2, QE3), toleraron los tres diferentes niveles de pH estudiados (4.5, 5 y 8.5). Se encontró que tres cepas de la misma zona (QE18, QP19, QP20) fueron capaces de crecer a pH 4.5, y una (QZN45) a pH 8.5. Todas las cepas de San Lorenzo toleraron los pH 5 y 8.5, con excepción del pH 4.5. Las del oriente, únicamente la cepa OO34 toleró el pH 4.5. De la zona de Quevedo, las cepas QuZN47, QuG48 toleraron el pH 4.5, y dos cepas (QuLR46 y QuLR59) mostraron crecimiento en pH 8.5.

4.1.2.5.4 Salinidad.

En relación a la salinidad, ninguna de las cepas estudiadas creció a las concentraciones de 0.5; 1 y 2%.

Cuadro 8. Tolerancia a diferentes niveles de estrés de las cepas noduladoras de Pueraria (*Pueraria phaseoloides*).

Cepas	Antibióticos				Metales				pH			NaCl %		Úrea						Muriato de Potasio						
	Kanamicina	Ácido Nalidixico	Estreptomina	Espectinomina	Aluminio	Zinc	Plomo	Cobre	4,5	5	8,5	0,5	1	2	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
QE1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE7	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE8	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QP12	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN15	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE18	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
QP19	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QP20	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE26	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
QZN29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QZN41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE43	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QE44	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
QZN45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLE21	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLE23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SLE24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OO34	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
OS36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OS38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuZN47	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuG48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuZN49	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
QuZN50	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
QuLR51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR53	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
QuLR54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
QuLR57	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
QuLR58	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QuLR60	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = Ausencia de Crecimiento

1 = Presencia de Crecimiento

4.1.2.5.5 *Úrea.*

Dos cepas de Quinindé (QE10 y QE18), y cuatro de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) crecieron a concentraciones análogas a las cantidades de úrea aplicadas en el campo (de 530 y 460 gr por planta año⁻¹).

4.1.2.5.6 *Muriato de Potasio.*

En cuanto al muriato de potasio, el aspecto mas relevante es que, las cepas de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) toleraron concentraciones análogas a las del campo (460, 370 y 180 gr por planta año⁻¹), mientras que las de Quinindé (QE18, QP19, QE26 y QE44) toleraron concentraciones solo de 370 y 180 gr por planta año⁻¹.

Las cepas de Quinindé son las que más toleraron las concentraciones de antibióticos, y de metales pesados. Estos resultados, pueden estar relacionados con el hecho de que la zona mencionada es tradicionalmente agrícola, sometida desde hace años a un manejo intensivo de la palma, con el uso de agroquímicos y altos insumos, a los cuales las cepas y microorganismos del suelo en general pudieron haberse adaptado a las condiciones adversas, generando tolerancia o resistencia a determinados productos químicos. Este hecho también se evidencia en la zona de Quevedo principalmente con antibióticos. Estudios microbiológicos de laboratorio, realizados por la Universidad Técnica Equinoccial (Bernal, 2008) evidenciaron una población alta de actinomicetos en las dos zonas, y se conoce que este grupo tiene la capacidad de producir una gama de antibióticos como mecanismo de sobre vivencia. Posiblemente, el rizobio en estas zonas convive sinérgicamente con este grupo importante del suelo, generando mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Las cepas provenientes de San Lorenzo y Oriente, que son zonas relativamente nuevas en la agricultura (en relación al cultivo de la palma) en su mayoría, la situación fue diferente, es decir no toleraron las concentraciones de antibióticos y metales pesados. Esto puede constituir un indicador que explica que el uso excesivo de productos químicos, afecta el desarrollo normal de microorganismos presentes en el suelo, y por lo tanto su biodiversidad.

Por los resultados obtenidos en la caracterización, la Pueraria al parecer es nodulada por dos géneros de rizobium, *Rhizobium* con un crecimiento rápido, con colonias de coloración blanco lechosa y *Bradyrhizobium* con colonias de crecimiento lento, y de coloración cremosa opaca.

4.1.2.6 Análisis Estadístico (Fase de Laboratorio)

De los resultados obtenidos del agrupamiento (Figura 1) a partir de la matriz de datos binarios, se obtuvo el dendograma de la figura 2, originado después del análisis estadístico, que logró identificar claramente dos grupos principales, mostrando la relación fenotípica de los aislamientos de rizobios asociados a la Pueraria. El primer grupo está conformado principalmente por aislamientos de las zonas de Quinindé y San Lorenzo (QE1, SLE23, SLE24, QE6, QE3, QP19, QP20, SLE21, QE10 y QE17), dos de Quevedo (QuLR46 y QuLR58 y una (OO34) del oriente. Estas cepas se diferenciaron del otro grupo con un coeficiente de agrupamiento de 0.21.

El segundo grupo incluye también cepas de Quinindé (QE2, QE4, QE7, QE8, QP12, QZN13, QZN15, QE18, QE26, QZN29, QZN41, QE43, QE44, QZN45), once de Quevedo (QuZN47, QuG48, QuLR49, QuLR50, QuLR55, QuLR51, QuLR53, QuLR54, QuLR57, QuLR59 y QuLR60), y dos del oriente (OS36, OS38). En este grupo se puede observar una mayor variabilidad entre los aislamientos.

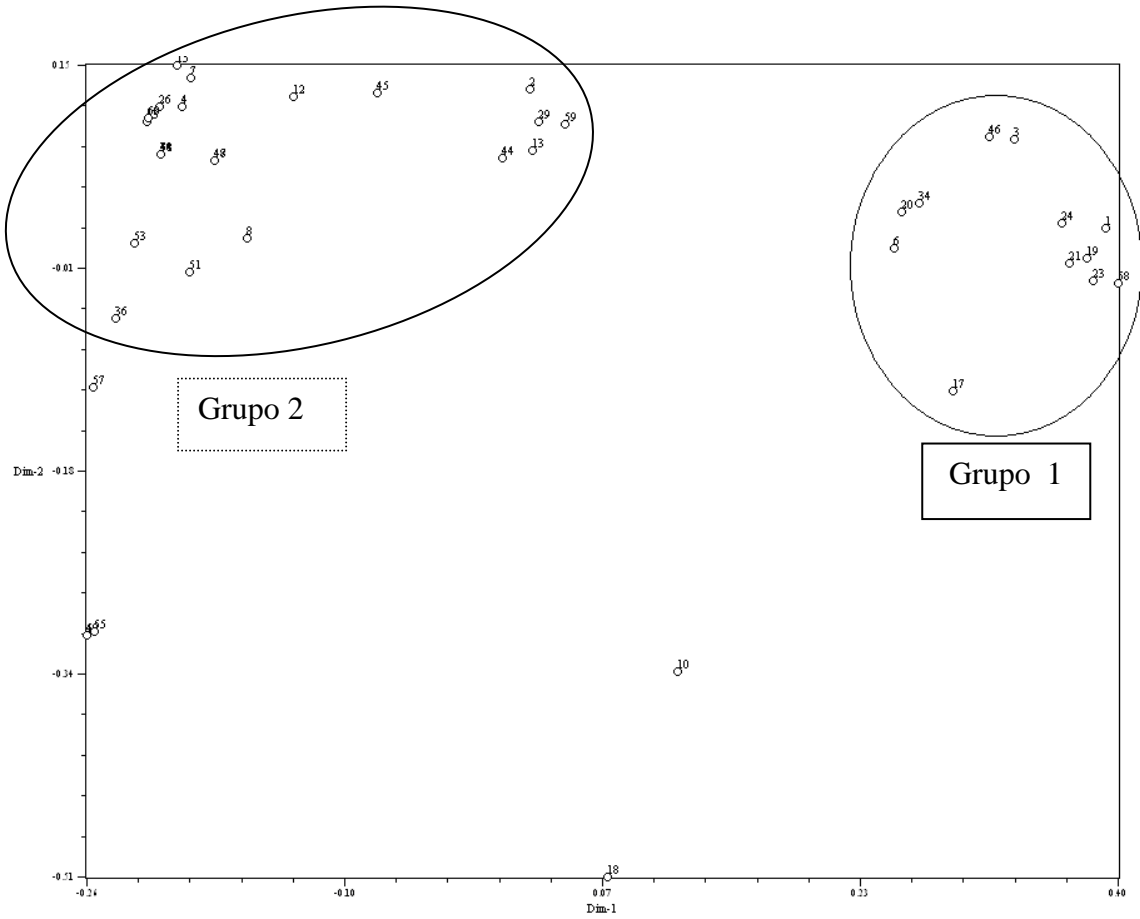


Figura 1. Análisis de agrupamientos de una colección de aislamientos de “*Rhizobium*” asociados a la Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), en el cultivo de Palma Aceitera. Ecuador.

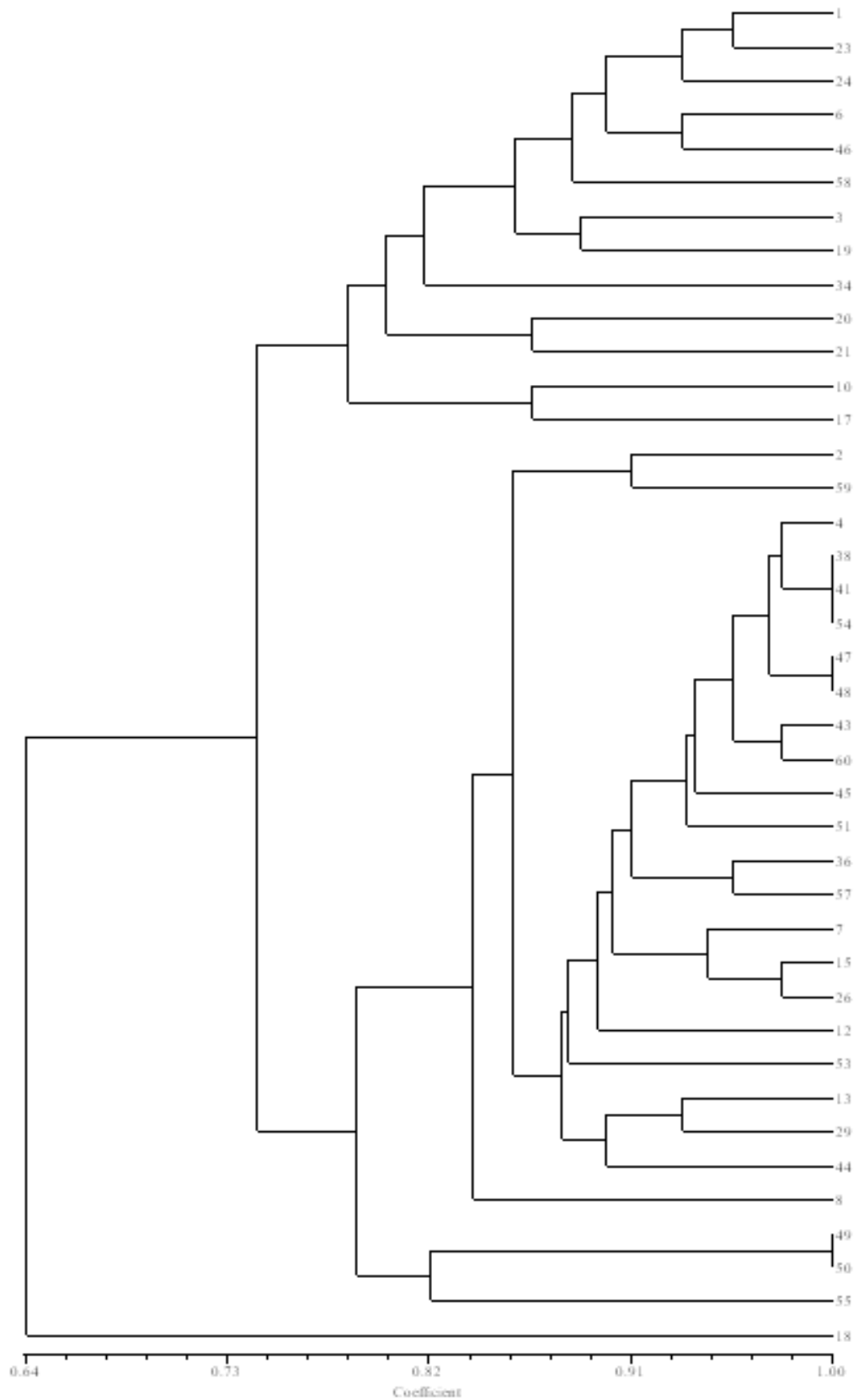


Figura 2. Dendrograma mostrando los dos principales grupos de los aislamientos de “rizobios” asociados a la *Pueraria phaseoloides*, en el cultivo de Palma Aceitera, en el Ecuador.

4.2 INVERNADERO

Antes de probar en el campo, las cepas fueron evaluadas en el invernadero, para seleccionar a las mejores cepas, en cuanto a la capacidad de Fijación Biológica de Nitrógeno. En invernadero se evaluaron 40 cepas, mas un control cepa de Cenipalma y sus respectivos testigos. Se analizó el comportamiento de las cepas en condiciones controladas por un tiempo de 60 días.

Para la determinación de la eficiencia simbiótica bajo condiciones controladas se analizaron los parámetros como: el peso fresco de la parte aérea, peso seco de la parte aérea, número de nódulos, peso fresco de nódulos, peso seco de nódulos y % de nitrógeno.

Cuadro 9. Análisis de varianza para seis variables en la evaluación de la eficiencia simbiótica de 40 aislamientos de “rizobios” nondulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Fuentes de Variación	GL	Nitrógeno (%)	Peso Seco de la Planta	Peso Seco de Nódulos	Número de Nódulos	Peso Fresco de Nódulos	Peso Fresco de la Planta
Total	124						
Cepas	41	0,215**	5,893**	28,342**	2772,272**	30,502**	29,174**
Error Exp.	83						
Promedio		2,19 gr/pl	8,64 gr/pl	13,57 gr/pl	80,26 nod/pl	14,03 gr/pl	19,28 gr/pl
%CV		15	20,9	0,9	40,2	2,4	20,1

** Altamente Significativo.

4.2.1 Porcentaje de Nitrógeno en planta

El análisis de varianza (Cuadro 9), para el porcentaje de nitrógeno, mostró diferencias altamente significativas para tratamientos. El coeficiente de variación fue de 15% y el promedio de nitrógeno fue de 2,19 gramos por planta. Lo que quiere decir que cada cepa se comporta de diferente manera debido probablemente a las características medio ambientales y características de los suelos.

Realizada la comparación de los promedios de los tratamientos, usando Waller-Duncan (Cuadro 10), se observó 8 rangos de significación. Las mejores cepas fueron la QP20 Y QP12, demostrando una mayor capacidad de fijación de nitrógeno, registrando el mejor promedio 2,7067 gramos por planta. En el último rango se encontró con el menor rango la cepa QuLr53, con un promedio de 1,7033 gramos de nitrógeno.

En el cuadro 10, se puede evidenciar claramente que las cepas QP12 seleccionada finalmente para la zona de San Lorenzo presentan ya una mayor fijación de nitrógeno desde el invernadero que el control nitrogenado y QuLR51 seleccionada para los bloques de Quinde y Quevedo, presentan un buen nivel de fijación de nitrógeno desde el invernadero mayor que el control nitrogenado.

Cuadro 10. Promedio y prueba de Waller-Duncan para porcentaje de nitrógeno en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de “rizobios” nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QP20	2,7067	A
2	QP12	2,7067	A
3	QE5	2,5667	Ab
4	QE7	2,5667	Abc
5	QE8	2,4767	Abcd
6	QE1	2,4967	Abcd
7	QE26	2,4733	Abcde
8	QE6	2,45	Abcdef
9	SLE24	2,4267	Abcdefg
10	QE9	2,4033	Abcdefgh
11	TT	2,4033	Abcdefgh
12	QuLR51	2,38	Abcdefgh
13	QE30	2,38	Abcdefgh
14	TN	2,34	Abcdefgh
15	QE2	2,31	Abcdefgh
16	QE44	2,2867	Abcdefgh
17	OS36	2,2867	Abcdefgh
18	QuP52	2,2633	Abcdefgh
19	QP19	2,2633	Abcdefgh
20	QE18	2,2633	Abcdefgh
21	QE17	2,24	Abcdefgh
22	QuLR46	2,1933	Abcdefgh
23	OO34	2,17	Abcdefgh
24	QE10	2,1233	Abcdefgh
25	QZN13	2,1233	Abcdefgh

26	SLE21	2,1	Abcdefgh
27	QZN15	2,1	Abcdefgh
28	QuZN47	2,0767	Abcdefgh
29	QZN16	2,0767	Abcdefgh
30	CC	2,0533	Abcdefgh
31	OS38	2,0533	Abcdefgh
32	OS37	2,0067	Abcdefgh
33	QuLR56	1,96	Bcdefgh
34	QE43	1,9133	Bcdefgh
35	QZN14	1,89	Cdefgh
36	QuLR58	1,8433	Defgh
37	QZN45	1,8433	Defgh
38	QuLR59	1,8433	Defgh
39	QuLR55	1,7733	Efgh
40	QZN29	1,75	Fgh
41	QuLR60	1,7267	Gh
42	QuLR53	1,7033	H

4.2.2 Peso Seco de Plantas

El cuadro 9, muestra el análisis de varianza, para el peso seco de plantas. Se observa diferencias altamente significativas entre tratamientos. El coeficiente de variación fue de 20,9% y el promedio de peso seco fue de 8,64 gramos por planta.

Realizada la prueba de Waller-Duncan (Cuadro 11), se diferenció 5 rangos de significación. La mejor cepa QP12 compartió el mismo rango con cinco cepas mas, y registrando el mejor promedio con 12,86 gramos por planta. En el último rango, se encontró la cepa QP20, con un promedio de 6,87 gramos por planta.

Podemos observar en el cuadro 11, las cepas seleccionadas QP12 y QuLR51, mostraron una mayor producción de volumen en el peso seco, lo cual hace que el nitrógeno total aumento con el porcentaje

Cuadro 11. Promedio y prueba de Waller-Duncan para peso seco de las plantas en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de "rizobios" nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QP12	12,8667	A
2	QE43	12,25	Ab
3	QuZN47	12,1167	Abc
4	TN	11,35	Abad
5	QuLR51	10,65	Abcde
6	QuP52	10,4667	Abcde
7	QE9	8,7	Bcde
8	QE6	8,6833	Bcde
9	QE26	8,6667	Bcde
10	SLE24	8,5167	Bcde
11	CCOL	8,4667	Bcde
12	OS38	8,3333	Cde
13	QE8	8,3	Cde
14	QuLR60	8,2333	De
15	QE1	8,2333	De
16	QE7	8,2	De
17	QuLR55	8,1833	De
18	QZN16	8,1167	De
19	QuLR59	8,1	De
20	QE5	8,1	De
21	TT	8,0667	De
22	QE17	8,0167	De
23	OS36	7,9833	De
24	QuLR56	7,9167	De
25	QuLR53	7,9167	De
26	QE2	7,8833	De
27	QE18	7,8667	De
28	QuLR58	7,8	De
29	QE44	7,7833	De
30	QE10	7,7667	De
31	QuLR46	7,75	De
32	SLE21	7,7167	De
33	QZN29	7,7	De
34	QZN13	7,6333	De
35	OS37	7,5333	De
36	OO34	7,5333	De
37	QZN14	7,5333	De
38	QZN45	7,5	De
39	QE30	7,45	E

40	QZN15	7,4167	E
41	QP19	7,1667	E
42	QP20	6,8	E

4.2.3 Peso Seco de Nódulos

El análisis de varianza (Cuadro 9), para el peso seco de nódulos, arrojó diferencias altamente significativas para tratamientos. El coeficiente de variación fue de 0,9% y el promedio de peso seco de los nódulos fue de 13,57 gramos por planta.

En el cuadro 12, se observa 8 rangos de significación. La mejor cepa fue la QE26, registrando el mejor promedio con 14,4 gramos por planta. En el último rango se ubicó la cepa QuLr53, con un promedio de 14 gramos por planta.

Dentro de estas variables de importancia para la selección de las cepas, se puede evidenciar en el cuadro 14, que las cepas QP12 y QuLR51, seleccionadas finalmente en esta tesis, obtuvieron mayor peso seco de nódulos que la cepa control traída desde Colombia, la cual es utilizada en Colombia como inoculante en Pueraria en cultivos de palma africana, demostrando que la adaptación de cepas importadas, varía de acuerdo a las condiciones edafoclimáticas.

Cuadro 12. Promedio y prueba de Waller-Duncan para peso seco de nódulos en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de "rizobios" nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QE26	14,4333	A
2	QE10	14,4	Ab
3	QE30	14,3667	Abc
4	QZN14	14,3667	Abc
5	QuLR59	14,3667	Abc
6	QuLR51	14,3333	Abad
7	QuZN47	14,3333	Abad
8	QuLR46	14,3333	Abad
9	QE43	14,3333	Abad
10	QP19	14,3333	abad
11	QE18	14,3333	abad
12	QZN13	14,3333	abad
13	QP12	14,3333	abad

14	QuLR55	14,3	abcde
15	OS36	14,3	abcde
16	OO34	14,3	abcde
17	QE8	14,3	abcde
18	QE5	14,3	abcde
19	QP20	14,2667	abcdef
20	QE6	14,2667	abcdef
21	QuLR60	14,2333	bcdef
22	QuLR58	14,2333	bcdef
23	QZN45	14,2333	bcdef
24	OS37	14,2333	bcdef
25	QE9	14,2333	bcdef
26	QE7	14,2333	bcdef
27	QE1	14,2333	bcdef
28	CC	14,2	chef
29	QZN29	14,2	chef
30	QuP52	14,2	chef
31	OS38	14,2	chef
32	QZN16	14,2	chef
33	QE44	14,1667	defg
34	QE17	14,1667	defg
35	QZN15	14,1667	defg
36	QuLR56	14,1333	efg
37	SLE24	14,1333	efg
38	QE2	14,1333	efg
39	SLE21	14,1	fg
40	QuLR53	14	g
41	TN	0	h
42	TT	0	h

4.2.4 Número de Nódulos

El análisis de varianza (Cuadro 9), para el parámetro número de nódulos, identificó diferencias altamente significativas para tratamientos. El coeficiente de variación fue de 40,2% y el promedio de nódulos fue de 80,96 nódulos por planta.

La prueba de Waller-Duncan (Cuadro 13), registró 10 rangos de significación. La mejor cepa fue la QE9 con un promedio de 143 nódulos por planta. En el último rango se encontró con el menor valor la cepa QE18, con un promedio de 41 nódulos.

Cuadro 13. Promedio y prueba de Waller-Duncan para número de nódulos en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de “rizobios” nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QE9	143,6667	a
2	QE43	134,3333	ab
3	QuLR59	130,6667	abc
4	OS37	124	abcc
5	QuZN47	120,3333	abcde
6	QuLR46	109,6667	abcdef
7	QuP52	108,6667	abcdefg
8	QZN14	108,6667	abcdefg
9	QE7	105	abcdefgh
10	QP20	99,3333	abcdefghi
11	QuLR51	98,3333	abcdefghi
12	QE6	95,3333	abcdefghi
13	SLE21	94,6667	abcdefghi
14	QuLR55	93	abcdefghi
15	QuLR53	91	abcdefghi
16	QE17	91	abcdefghi
17	QuLR56	86,3333	abcdefghi
18	QE8	84	abcdefghi
19	OS36	83,6667	bcdefghi
20	QE44	83	bcdefghi
21	QE1	82,6667	bcdefghi
22	QZN15	79,6667	bcdefghi
23	QE2	76	bcdefghi
24	OS38	72	cdefghi
25	QuLR60	70,6667	defghi
26	QE30	68	Defghi
27	SLE24	67,6667	Defghi
28	QZN16	67	Defghi
29	OO34	66,6667	Defghi
30	CC	65,3333	Defghi
31	QuLR58	65,3333	Defghi
32	QE5	64,6667	Defghi
33	QZN29	64	Efghi
34	QE26	61,6667	Efghi
35	QZN45	61,3333	Efghi
36	QP19	54,6667	Fghij
37	QZN13	52	Fghij
38	QE10	49,6667	Ghij
39	QP12	48,3333	Hij
40	QE18	41,6667	Ij
41	TN	0	J
42	TT	0	J

4.2.5 Peso Fresco de Nódulos

El análisis de varianza (Cuadro 9), para el peso fresco de nódulos, se determinó diferencias altamente significativas para tratamientos. El coeficiente de variación fue de 2,4% y el promedio de peso fresco de los nódulos fue de 14,03 gramos por planta.

La prueba de Waller-Duncan (Cuadro 14), permitió diferenciar 12 rangos de significación. La mejor cepa fue la QE10 que compartió el mismo rango con siete cepas más. Su promedio fue de 15,5 gramos por planta. En el último rango se encontró con el menor rango la cepa QuLr53, con un promedio de 14,13 gramos por planta.

Cuadro 14. Promedio y prueba de Waller-Duncan para peso fresco de nódulos en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de “rizobios” nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QE10	15,5	A
2	QZN14	15,2667	Ab
3	QuLR59	15,1333	Abc
4	QuLR51	15,0667	Abcd
5	QP19	15,0667	Abcd
6	QuLR60	15,0333	Abcde
7	QP20	15,0333	abcde
8	QE5	15,0333	abcde
9	QuZN47	14,9333	bcdef
10	QE18	14,9333	bcdef
11	QuLR46	14,9	bcdefg
12	QE43	14,9	bcdefg
13	OS37	14,9	bcdefg
14	QZN29	14,9	bcdefg
15	QuP52	14,8333	bcdefgh
16	QE26	14,8333	bcdefgh
17	QE6	14,8	bcdefghi
18	OS36	14,7667	cdefghi
19	QZN45	14,7667	cdefghi
20	QE30	14,7667	cdefghi
21	QE17	14,7333	cdefghij
22	OS38	14,7	cdefghij
23	CC	14,6667	cdefghij
24	QZN15	14,6667	cdefghij
25	SLE21	14,6333	defghij

26	QuLR58	14,6	defghijk
27	QuLR56	14,6	defghijk
28	OO34	14,5667	efghijk
29	QZN16	14,5667	efghijk
30	QZN13	14,5667	efghijk
31	QE8	14,5667	efghijk
32	QuLR55	14,5333	fghijk
33	QE44	14,5	fghijk
34	SLE24	14,4667	fghijk
35	QE9	14,4333	ghijk
36	QE7	14,4333	ghijk
37	QP12	14,3667	hijk
38	QE2	14,3333	ijk
39	QE1	14,2667	jk
40	QuLR53	14,1333	k
41	TN	0	l
42	TT	0	l

4.2.6 Peso Fresco de Plantas

El análisis de varianza (Cuadro 9), para el peso fresco, dio diferencias altamente significativas para tratamientos. El coeficiente de variación fue de 20,1% y el promedio de peso fresco de las plantas fue de 19,28 gramos por planta.

En el cuadro 15, se observa que la mejor cepa fue la QuZn47, compartiendo el mismo rango con siete cepas más, incluido el testigo nitrogenado, y registrando el mejor promedio con 28,48 gramos por planta. En el último rango se ubicó la cepa QP20, con un promedio de 14,35 gramos por planta.

Cuadro 15. Promedio y prueba de Waller-Duncan para peso fresco de las plantas en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cuarenta aislamientos de “rizobios” nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en Invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

Nº	Cepas	Promedio	Rango de Significación
1	QuZn47	28,4833	a
2	TN	28,2667	ab
3	QE43	25,6333	abc
4	QP12	24,9667	abad
5	QuLR51	24,1667	abcde
6	QuP52	23,1167	abcdef
7	QE6	21,5167	abcdefg
8	QE8	20,2667	abcdefg
9	QE26	20,0667	bcdefg

10	SLE24	20,05	bcdefg
11	QuLR60	19,8833	cdefg
12	CC	19,767	cdefg
13	QE9	19,5833	cdefg
14	QE7	19,56667	cdefg
15	QE5	19,4333	cdefg
16	TT	19,2833	cdefg
17	QE44	19,1333	cdefg
18	OS38	19,1333	cdefg
19	QuLR59	19,0667	cdefg
20	QZN15	19,0333	cdefg
21	QZN16	18,7333	cdefg
22	QE1	18,3167	cdefg
23	QE2	18,2167	cdefg
24	QZN13	18,1667	cdefg
25	QuLR55	18,033	cdefg
26	QP19	17,9833	cdefg
27	QuLR53	17,8833	cdefg
28	OS36	17,8667	cdefg
29	QE18	17,8667	cdefg
30	QE17	17,45	cdefg
31	QuLR58	17,3833	cdefg
32	SLE21	17,3333	cdefg
33	QuLR46	17,2	defg
34	QE10	17,2	defg
35	QuLR56	16,9167	defg
36	QZN14	16,6	efg
37	QZN29	16,575	efg
38	OO34	16,3833	efg
39	QE30	16,2668	efg
40	OS37	16,1	efg
41	QZN45	15,8	fg
42	QP20	14,35	g

4.3 FASE DE CAMPO

4.3.1 Selección de Cepas para el Ensayo de Campo

Realizado los análisis de las variables en estudio de la fase de invernadero, se realizó una selección de las 10 mejores cepas de cada una de las variables (Cuadro 17), donde se les dio una valoración de acuerdo a la importancia de las variables para la selección de cepas, siendo el porcentaje de nitrógeno en la planta, peso seco de nódulos y peso seco de plantas las variables de mayor jerarquía para

la selección, y el resto de las variables peso fresco de nódulos y peso fresco de plantas, dándoles una valoración de tres a uno respectivamente. (BERNAL, 2008).

Luego de realizar la suma de la valoración de cada cepa se obtuvo que las cepas QP12 (65), QuZN47 (54), QE26 (54), QE43 (51), y QuLR51 (50), fueron las que alcanzaron mayor puntuación, por lo que se las consideró para la fase de campo.

Cuadro 16. Valoración de las variables de acuerdo a la importancia en la evaluación de la eficiencia simbiótica de 40 aislamientos de “rizobios” nondulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en invernadero. ANCUPA-CIPAL. La Concordia 2007.

	N	P S PI	P S Nod	Valor	Num Nod	P F Nod	P F PI	Valor
1	QP20	QP12	QE26	30	QE9	QE10	QuZN47	10
2	QP12	QE43	QE10	27	QE43	QZN14	QE43	9
3	QE5	QuZN47	QE30	24	QuLR59	QuLR59	QP12	8
4	QE7	QuLR51	QZN14	21	OS37	QuLR51	QuLR51	7
5	QE8	QuP52	QuLR59	18	QuZN47	QP19	QuP52	6
6	QE1	QE9	QuLR51	15	QuLR46	QuLR60	QE6	5
7	QE26	QE6	QuZN47	12	QuP52	QP20	QE8	4
8	QE6	QE26	QuLR46	9	QZN14	QE5	QE26	3
9	SLE24	SLE24	QE43	6	QE7	QuZN47	SLE24	2
10	QE9	OS38	QP19	3	QP20	QE18	QuLR60	1

N = Nitrógeno

P S PI = Peso seco de plantas

P S Nod = Peso seco de nódulos

Num Nod = Número de nódulos

P F Nod = Peso fresco de nódulos

P F PI = Peso fresco de plantas

Los datos obtenidos en cada una de los cuatro sitios experimentales, fueron analizados independientemente, debido a que las condiciones medio ambientales (clima y suelo principalmente) son diferentes.

4.3.2 ALESPALMA

Cuadro 17. Análisis de varianza para cinco variables en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nondulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en ALESPALMA. San Lorenzo. 2007.

Fuentes de Variación	GL	Nitrógeno	Peso Fresco de la Planta	Peso Seco de la Planta	Peso Fresco de Nódulos	Peso Seco de Nódulos
Total	39					
Cepas	9	0,708**	35862,9	1144,1	7,4**	3,7**
Error Exp.	30					
Promedio		3,607 gr/pl	1347,4 gr/pl	53,4 gr/pl	52,27 gr/pl	16,65 gr/pl
%CV		13,89	54,03	50,13	42,12	15,75

4.3.2.1 Nitrógeno en plantas

El análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno en planta, presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 13,88% y un promedio de 3,607 gramos/ planta (cuadro 17).

La prueba de Tukey al 5% (cuadro 18), identificó dos rangos de significación. En el primer rango, se ubicó el testigo TN, con una media de 4,162 gramos por planta, seguido de la cepa CC y C47 con una media de 3,865 gramos por planta.

Cuadro 18. Promedio y prueba de Waller-Duncan para porcentaje de nitrógeno en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Nitrógeno	Rangos de Significación
1	TN	4,162	a
2	CC	3,865	ab
3	QuZN47	3,865	ab

4	QuLR51	3,847	ab
5	S	3,805	ab
6	QE43	3,777	ab
7	QE26	3,587	ab
8	TT	3,31	ab
9	M	2,98	ab
10	QP12	2,87	b

4.3.2.2 Peso fresco de las plantas

El análisis de varianza para el peso fresco de las plantas, generó diferencias no significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 54,03% y un promedio de 1347,4 gramos/ planta (cuadro 17).

Realizada la prueba de Tukey al 5% (cuadro 19), se identificó a la cepa 12, como la mejor, con una media de 547,5 gramos por palma.

Cuadro 19. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de "rizobios" nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso fresco Planta (g)	Rangos de Significación
1	QP12	547,5	a
2	TT	423,75	a
3	TN	368	a
4	QE26	362	a
5	QuLR51	352	a
6	QuZN47	341,25	a
7	M	309,25	a
8	QE43	303,75	a
9	CC	281,75	a
10	S	184,75	a

4.3.2.3 Peso seco de las plantas

El análisis de varianza para el peso seco de las plantas, presentó diferencias significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 50,13% y un promedio de 53,4 gramos/ planta (cuadro 17).

El cuadro 20, muestra un solo rango de significancia. La cepa 12, fue la que se ubicó en el primer lugar, con un valor de 84,25 gramos por palma.

Cuadro 20. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de "rizobios" nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Planta (g)	Rangos de Significación
1	QP12	84,25	a
2	TT	67,375	a
3	TN	59,9	a
4	QuLR51	59,675	a
5	QE26	55,525	a
6	QuZN47	52,6	a
7	QE43	52,45	a
8	CC	44,975	a
9	M	33,15	a
10	S	24,1	a

4.3.2.4 Peso fresco de nódulos

El análisis de varianza para el peso fresco de nódulos arrojó diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 42,12%, y un promedio de 52,27 gramos/ planta (cuadro 17).

A través de la prueba de Tukey al 5% (cuadro 21), se pudo identificar a las cepas 12, 43 y CC, como las mejores, con un valor similar de 2,75 gramos por planta respectivamente.

Cuadro 21. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Fresco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	CC	2,75	a
2	QE43	2,75	a
3	QP12	2,75	a
4	QuZN47	2,725	a
5	QE26	2,475	a
6	QuLR51	2,225	a

4.3.2.5 Peso seco de nódulos

El análisis de varianza para el peso seco de nódulos en las plantas, encontró diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 15,75%, y con un promedio de 16,65 gramos/ planta (cuadro 17).

La prueba de Tukey al 5% (cuadro 22), identificó a las cepas CC y cepa 12, como las de mejor valor, con un promedio de 1,95 gramos por palma.

Cuadro 22. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	CC	1,95	a
2	QP12	1,95	a
3	QE43	1,85	a
4	QE26	1,825	a
5	QuZN47	1,8	a
6	QuLR51	1,8	a

4.3.2.6 Selección de Cepa

Luego de realizar la suma de la valoración de cada cepa se obtuvo que las cepas QP12 (38) alcanzó el mayor puntaje de las cepas evaluadas, considerándola como el inoculante para esta localidad ALESPALMA.

Cuadro 23. Valoración de las variables de acuerdo a la importancia en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en ALESPALMA. San Lorenzo 2007.

No.	N	P S P	P S N	VALOR	P F P	P F N	VALOR
1	CC	QP12	CC	15	QP12	CC	6
2	QuZN47	QuLR51	QP12	12	QE26	QE43	5
3	QuLR51	QE26	QE43	9	QuLR51	QP12	4
4	QE43	QuZN47	QE26	6	QuZN47	QuZN47	3
5	QE26	QE43	QuZN47	3	QE43	QE26	2
6	QP12	CC	QuLR51	1	CC	QuLR51	1

4.3.3 PALPAILON

Cuadro 24. Análisis de varianza para cinco variables en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en PALPAILON. San Lorenzo. 2007.

Fuentes de Variación	GL	Nitrógeno	Peso Fresco de la Planta	Peso Seco de la Planta	Peso Fresco de Nódulos	Peso Seco de Nódulos
Total	39					
Cepas	9	1,5**	2535,4	121,7*	22,8**	7,1**
Error Exp.	30					
Promedio		3,3998 gr/pl	70,55 gr/pl	22,02 gr/pl	2,625 gr/pl	16,65 gr/pl
%CV		27,11	49,26	30,06	32,81	19,53

4.3.3.1 Nitrógeno en plantas

El análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno, presento diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 27,11% y un promedio de 3,39 gramos/ planta (cuadro 24).

A través de la prueba de Tukey al 5% (cuadro 25), identificó tres rangos de significación. En el primer rango se ubico el testigo TN, con una media de 4,032 gramos por palma, seguido de la cepa 43 con una media de 3,785 gramos por planta.

Cuadro 25. Promedio y prueba de Waller-Duncan para porcentaje de nitrógeno en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Nitrógeno	Rangos de Significación
1	TN	4,302	a
2	QE43	3,785	ab
3	QE26	3,62	ab
4	QP12	3,602	ab
5	QuZN47	3,532	b
6	CC	3,517	b
7	TT	3,485	b
8	QuLR51	3,465	b
9	M	2,372	c
10	S	2,315	c

4.3.3.2 Peso fresco de las plantas

El análisis de varianza para el peso fresco de las plantas, no presento diferencias significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 49,26% y un promedio de 70,55 gramos/ planta (cuadro 24).

Sin embargo fue la cepa 12 la que ocupó el primer lugar con un promedio de 104,25 gramos por palma.

Cuadro 26. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso fresco Planta (g)	Rangos de Significación
1	QP12	104,25	a
2	QuLR51	97,5	ab
3	CC	90,25	ab
4	QE43	82	ab
5	TN	71,25	ab
6	QE26	69	ab
7	M	64,75	ab
8	QuZN47	58,75	ab
9	TT	49	ab
10	S	18,75	b

4.3.3.3 Peso seco de las plantas

El análisis de varianza para el peso seco de las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 30,06% y un promedio de 22,02 gramos/ planta (cuadro 24).

Se identificaron a través de Tukey al 5% (cuadro 27), dos rangos de significación. En el primer lugar se ubico la cepa 12, con una media de 29,45 gramos por palma.

Cuadro 27. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria phaseoloides* en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Planta (g)	Rangos de Significación
1	QP12	29,45	a
2	QuLR51	27,975	a
3	CC	26	ab
4	QE43	24,325	ab
5	TN	23,6	ab
6	QE26	22,475	ab
7	QuZN47	20,325	ab
8	TT	18,15	ab
9	M	16,47	ab
10	S	11,5	b

4.3.3.4 Peso fresco de nódulos

El análisis de varianza para el peso fresco de nódulos en las plantas, presentó diferencias altamente significativas para los tratamientos, presentó un coeficiente de variación de 32,81% y un promedio de 2,62 gramos/ planta (cuadro 24).

El cuadro 28, muestra dos rangos de significación, ubicándose la cepa 12, en la mejor posición, con un valor promedio de 6,25 gramos por palma.

Cuadro 28. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria phaseoloides* en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Fresco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	QP12	6,25	a
2	QuLR51	4,5	ab
3	QE43	4,5	ab
4	CC	4	b
5	QE26	3,75	b
6	QuZN47	3,25	b

4.3.3.5 Peso seco de nódulos

El análisis de varianza para el peso seco de nódulos en las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 19,53%, y un promedio de 16,65 gramos/ planta (cuadro 24).

La prueba de Tukey al 5% (cuadro 29), identificó dos rangos de significación. En el primer lugar se ubicó la cepa 12, con una media de 3,07 gramos por palma.

Cuadro 29. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de "rizobios" nodulantes de Pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	QP12	3,075	a
2	QuLR51	2,65	ab
3	QE43	2,475	ab
4	QE26	2,425	ab
5	CC	2,4	ab
6	QuZN47	2,25	b

4.3.3.6 Selección de Cepa

Luego de realizar la suma de la valoración de cada cepa se obtuvo que las cepa QP12 (51) alcanzó el mayor puntaje de las cepas evaluadas. Por lo que se las considera como el inoculante, para esta localidad.

Cuadro 30. Valoración de las variables de acuerdo a la importancia en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en PALPAILON. San Lorenzo 2007.

No.	N	P S P	P S N	VALOR	P F P	P F N	VALOR
1	QE43	QP12	QP12	15	QP12	QP12	6
2	QE26	QuLR51	QuLR51	12	QuLR51	QuLR51	5
3	QP12	CC	QE43	9	CC	QE43	4
4	QuZN47	QE43	QE26	6	QE43	CC	3
5	CC	QE26	CC	3	QE26	QE26	2
6	QuLR51	QuZN47	QuZN47	1	QuZN47	QuZN47	1

4.3.4 CIPAL

Cuadro 31. Análisis de varianza para cinco variables en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en el CIPAL. La Concordia. 2007.

Fuentes de Variación	GL	Nitrógeno	Peso Fresco de la Planta	Peso Seco de la Planta	Peso Fresco de Nódulos	Peso Seco de Nódulos
Total	39					
Cepas	9	0,919**	85964,3**	3325,3**	35,7**	8,7**
Error Exp.	30					
Promedio		3,3995 gr/pl	306,225 gr/pl	62,1875 gr/pl	3,415 gr/pl	1,7 gr/pl
%CV		8	38,26	34,91	44,7	29,41

** Altamente Significativo

4.3.4.1 Nitrógeno en plantas

El análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno, presentó diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 8% y un promedio de 3,39 gramos/ planta (cuadro 31).

La prueba de Tukey al 5% (cuadro 32), identificó cuatro rangos de significación. En el primer rango se ubicó el testigo TN, con una media de 4,49 gramos por palma, seguido de la cepa C 51 con una media de 3,585 gramos por planta.

Cuadro 32. Promedio y prueba de Waller-Duncan para porcentaje de nitrógeno en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria phaseoloides* en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	Cepa	Nitrógeno	Rangos de Significación
1	TN	4,495	a
2	CC	3,585	b
3	QuLR51	3,55	b
4	TT	3,537	b
5	QE26	3,43	bc
6	QuZN47	3,325	bcd
7	QP12	3,257	bcd
8	QE43	3,22	bcd
9	S	2,857	cd
10	M	2,737	d

4.3.4.2 Peso fresco de las plantas

El análisis de varianza para el peso fresco de las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 38,26%, y un promedio de 306,22 gramos/ planta (cuadro 31).

El cuadro 33, muestra dos rangos de significación. En el primer lugar se ubico el testigo TN con una media de 522,25 gramos por planta, seguido de la cepa 26, con una media de 441,25 gramos por palma.

Cuadro 33. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	Cepa	Peso fresco Planta (g)	Rangos de Significación
1	TN	522,25	a
2	QE26	441,25	a
3	QuZN47	369,25	a
4	QuLR51	359,75	a
5	CC	331,75	ab
6	QE43	329,75	ab
7	TT	328,75	ab
8	QP12	250,5	ab
9	S	66	b
10	M	63	b

4.3.4.3 Peso seco de las plantas

El análisis de varianza para el peso seco de las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 34,91% y un promedio de 62,18 gramos/ planta (cuadro 31).

Fueron identificados tres rangos de significación, de acuerdo a la prueba de Tukey al 5% (cuadro 34). El mejor tratamiento fue el TN con un valor promedio de 112,6 gramos por planta, y seguido de la cepa 26, con una media de 83,17 gramos por palma.

Cuadro 34. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Planta (g)	Rangos de Significación
1	TN	112,6	a
2	QE26	83,175	ab
3	QuZN47	73,7	ab
4	QuLR51	71,5	ab
5	QE43	65,225	abc
6	TT	65,15	abc
7	CC	64,825	abc
8	QP12	52,575	bc
9	S	16,825	c
10	M	16,3	c

4.3.4.4 Peso Fresco de Nódulos

El análisis de varianza para el peso fresco de nódulos en las plantas, encontró diferencias altamente significativas para los tratamientos, presentó un coeficiente de variación de 44,7% y un promedio de 3,41 gramos/ planta (cuadro 31).

Tukey al 5% para esta variable (cuadro 35), identifico un rango de significancia, en el primer lugar se ubico la cepa 12, con una media de 6,85 gramos por palma.

Cuadro 35. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	Cepa	Peso Fresco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	QP12	6,85	a
2	CC	5,85	a
3	QuLR51	5,8	a
4	QE43	5,75	a
5	QuZN47	5,1	a
6	QE26	4,8	a

4.3.4.5 Peso Seco de Nódulos

El análisis de varianza para el peso seco de nódulos en las plantas, encontró diferencias altamente significativas para los tratamientos, presentó un coeficiente de variación de 29,41% y un promedio de 1,7 gramos/ planta (cuadro 31).

Tukey al 5% para esta variable (cuadro 36), identifico un rango de significancia, en el primer lugar se ubico la cepa 12, con una media de 3,22 gramos por palma.

Cuadro 36. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de Pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	QP12	3,225	a
2	QuLR51	2,9	a
3	CC	2,85	a
4	QE43	2,825	a
5	QE26	2,6	a
6	QuZN47	2,6	a

4.3.4.6 Selección de Cepa

Luego de realizar la suma de la valoración de cada cepa se obtuvo que la cepa 51 (41) alcanzó el mayor puntaje de las cepas evaluadas. Por lo que se la considera como el inoculante, para esta localidad.

Cuadro 37. Valoración de las variables de acuerdo a la importancia en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de "rizobios" nondulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en el CIPAL. La Concordia 2007.

No.	N	P S P	P S N	VALOR	P F P	P F N	VALOR
1	CC	QE26	QP12	15	QE26	QP12	6
2	QuLR51	QuZN47	QuLR51	12	QuZN47	CC	5
3	QE26	QuLR51	CC	9	QuLR51	QuLR51	4
4	QuZN47	QE43	QE43	6	CC	QE43	3
5	QP12	CC	QE26	3	QE43	QuZN47	2
6	QE43	QP12	QuZN47	1	QP12	QE26	1

4.3.5 ESPE

Cuadro 38. Análisis de varianza para cinco variables en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de "rizobios" nondulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en la ESPE. Luz de América 2007.

Fuentes de Variación	GL	Nitrógeno	Peso Fresco de la Planta	Peso Seco de la Planta	Peso Fresco de Nódulos	Peso Seco de Nódulos
Total	39					
Cepas	9	0,312**	35496,6**	856,9**	36,1**	7,87**
Error Exp.	30					
Promedio		3,4345 gr/pl	250,95 gr/pl	44,30 gr/pl	3,44 gr/pl	1,6225 gr/pl
%CV		7,92	46,69	49	44,37	30,81

** Altamente significativo

4.3.5.1 Nitrógeno en plantas

El análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno, presento diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 7,92% y un promedio de 3,43 gramos/ planta (cuadro 38).

El mejor tratamiento fue la cepa 51, con el valor de 3,812 gramos por planta.

Cuadro 39.- Promedio y prueba de Waller-Duncan para porcentaje de nitrógeno en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria phaseoloides* en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	Cepa	Nitrógeno	Rangos de Significación
1	QuLR51	3,812	a
2	QE43	3,657	a
3	QP12	3,552	a
4	QuZN47	3,515	a
5	QE26	3,467	ab
6	CC	3,465	ab
7	TT	3,447	ab
8	TN	3,38	ab
9	S	3,295	ab
10	M	2,752	b

4.3.5.2 Peso fresco de las plantas

El análisis de varianza para el peso fresco de las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 46,69% y un promedio de 250,95 gramos/ planta (cuadro 38).

Se identificaron a través de Tukey al 5% dos rangos de significación. (Cuadro 40), En el primer lugar se ubicó el testigo TN con una media de 379 gramos por planta, seguido de la cepa 51, con una media de 327 gramos por planta.

Cuadro 40. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria (Pueraria phaseoloides)* en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	Cepa	Peso fresco Planta (g)	Rangos de Significación
1	TN	379	A
2	QuLR51	327	Ab
3	TT	309,5	Ab
4	CC	307,5	Ab
5	QE43	261	Ab
6	QP12	253,25	Ab
7	QuZN47	251,25	Ab
8	QE26	237,75	Ab
9	S	94	B
10	M	89	B

4.3.5.3 Peso seco de las plantas

El análisis de varianza para el peso seco de las plantas, presento diferencias altamente significativas para los tratamientos, con un coeficiente de variación de 49% y un promedio de 44,30 gramos/ planta (cuadro 38).

La prueba de Tukey al 5% (cuadro 41), identificó tres rangos de significación, siendo el testigo TN el mejor tratamiento, con una media de 61,85 gramos por planta, y seguido de la cepa 51, con un promedio de 56,125 gramos por planta.

Cuadro 41. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de la parte aérea de la planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de Pueraria (*Pueraria phaseoloides*) en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Planta (g)	Rangos de Significación
1	TN	61,85	a
2	QuLR51	56,125	a
3	CC	53,525	ab
4	TT	51,75	abc
5	QE43	47,75	abc
6	QP12	46,775	abc
7	QuZN47	44,95	abc
8	QE26	43,125	abc
9	S	18,9	bc
10	M	18,325	c

4.3.5.4 Peso fresco de nódulos

El análisis de varianza para el peso fresco de nódulos en las plantas, encontró diferencias altamente significativas para los tratamientos, presentó un coeficiente de variación de 44,37% y un promedio de 3,44 gramos/ planta (cuadro 38).

Tukey al 5% para esta variable (cuadro 42), identifico un rango de significancia, en el primer lugar se ubico la cepa colombiana con una media de 6,8 gramos por planta, seguido de la cepa 26, con una media de 6,17 gramos por palma.

Cuadro 42. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso fresco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	Cepa	Peso Fresco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	CC	6,8	a
2	QE26	6,175	a
3	QP12	5,782	a
4	QuLR51	5,35	a
5	QuZN47	5,35	a
6	QE43	4,95	a

4.3.5.5 Peso seco de Nódulos

El análisis de varianza para el peso seco de nódulos en las plantas, encontró diferencias altamente significativas para los tratamientos, presentó un coeficiente de variación de 30,81% y un promedio de 1,62 gramos/ planta (cuadro 39).

Tukey al 5% para esta variable (cuadro 43), identifico un rango de significancia, en el primer lugar se ubico la cepa colombiana con una media de 2,95 gramos por planta, seguido de la cepa 26, con un media de 2,87 gramos por palma.

Cuadro 43. Promedio y prueba de Waller-Duncan para el peso seco de nódulos por planta, en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nodulantes de *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*) en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	Cepa	Peso Seco Nódulos (g)	Rangos de Significación
1	CC	2,95	a
2	QE26	2,875	a
3	QP12	2,725	a
4	QuZN47	2,6	a
5	QuLR51	2,575	a
6	QE43	2,5	a

4.3.5.6 Selección de Cepa

Luego de realizar la suma de la valoración de cada cepa se obtuvo que la cepa 51 (42) alcanzó el mayor puntaje de las cepas evaluadas. Por lo que se la considera como el inoculante, para esta localidad.

Cuadro 44. Valoración de las variables de acuerdo a la importancia en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cinco aislamientos de “rizobios” nondulantes de Pueraria (Pueraria phaseoloides) en la ESPE. Luz de América 2007.

No.	N	P S P	P S N	VALOR	P F P	P F N	VALOR
1	QuLR51	QuLR51	CC	15	QuLR51	CC	6
2	QE43	CC	QE26	12	CC	QE26	5
3	QP12	QE43	QP12	9	QE43	QP12	4
4	QuZN47	QP12	QuZN47	6	QP12	QuLR51	3
5	QE26	QuZN47	QuLR51	3	QuZN47	QuZN47	2
6	CC	QE26	QE43	1	QE26	QE43	1

El comportamiento de las cepas evaluadas en campo, podemos observar que la cepa seleccionada en las localidades de Alespalma y Palpailon, cepa QP12 se adapta mejor en los suelos arcillosos con poca cantidad de materia orgánica, con altos contenidos de Mg, Ca, S, K y P, dominando las cepas seleccionadas sobre la cepa colombiana que es utilizada en ese país como inoculante para pueraria en cultivos de palma aceitera. En las localidades del Cital y la Espe, la cepa seleccionada, cepa QuLR51, el comportamiento es diferente debido a la textura de los suelos, franco arenosos, donde esta cepa pudo obtener mayor peso seco en la planta, debido a las grandes cantidades de nitrógeno presentes en estos suelos, por lo que incidió en la selección de esta cepa en las dos localidades mencionadas.

La acidez y la temperatura de los suelos de las localidades, no afectaron directamente en la expresión de las cepas.

Las precipitaciones permitieron un trabajo eficiente de las cepas, ya que estas fueron escasas, y no obstaculizaron la cantidad de oxígeno en los nódulos para un adecuado trabajo, expresando su potencial.

Cuadro 45. Comportamiento diferencial de las cepas probablemente debido a las condiciones edafoclimáticas de las diferentes zonas.

LOCALIDAD	ALESPALMA	PALPAILON	CIPAL	ESPE
CEPAS	QP12	QP12	QuLR51	QuLR51
	CC	QE43	CC	CC
	QuZN47	QuLR51	QE26	QP12
	QuLR51	QE26	QuZN47	QE43
	QE43	CC	QP12	QE26
	QE26	QuZN47	QE43	QuZN47
pH	5,3	5,2	5	5,9
NH₄	22	31	45	34
P	9	19	6,8	12
S	14	11	7,7	3,6
K	0,26	0,22	0,2	0,18
Ca	3,9	3,6	1,7	3,1
Mg	1,1	1,1	0,5	0,7
Zn	3,9	3,3	2,5	3,8
T°	30	30	26	25
M.O.	3,3	1,7	4,8	5
Textura	Arcilloso	Arcilloso	Franco Arenoso	Franco Arenoso

V. CONCLUSIONES

Este estudio concluyo lo siguiente:

- *Pueraria phaseoloides* es nodulada por rizobios tanto de crecimiento lento como de crecimiento rápido. Esto permite aseverar que las bacterias que nodulan *Pueraria* pertenecen a los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*.
- Las pruebas de caracterización permiten concluir que las cepas no se comportan de igual manera. Mientras unas toleran o resisten determinadas concentraciones de químicos, antibióticos, salinidad, acidez, etc., otras se comportan lo contrario. Estos resultados demuestran que las cepas se han adaptado a condiciones ambientales específicas, de cada zona.
- En el estudio de invernadero, la eficiencia de fijación de nitrógeno de las cepas, fue también variable, sobresaliendo las siguientes cepas: CP12, QuZN47, QE26, QE43, y QuLR51. Superando la cepa control proveniente de Colombia, la cual a sido probada en cuatro zonas productoras de palma aceitera de este país y a nivel experimental en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- En campo tomando en consideración de los parámetros que permiten estimar la fijación biológica de nitrógeno de las cepas, se logró identificar de acuerdo al sitio experimental, las mejores cepas fijadoras de nitrógeno, las cuales pueden ser comercializadas como potenciales inoculantes. Las mejores cepas por localidad fueron:
 - ALESPALMA CP12.
 - PALPAILON CP12.
 - ESPE QuLR51.
 - CIPAL QuLR51.

VI. RECOMENDACIONES

Esta investigación a través de los resultados obtenidos, permite recomendar lo siguiente:

- Caracterizar molecularmente las cepas, para complementar con las pruebas fenotípicas, lo cual permita identificar a nivel de especie a los “Rizobios” nativos del Ecuador, que hacen simbiosis con la Pueraria.
- Llevar a cabo un estudio que permita identificar al mejor sustrato como portador de la bacteria, para fines prácticos, en el sentido de producir inoculantes de Pueraria.
- Se recomienda utilizar a las siguientes cepas como inoculantes CP12 y QuLR51. El uso de inoculantes permitirá la mayor fijación de nitrógeno atmosférico por la Pueraria, lo cual sin duda, contribuirá con la mineralización del nitrógeno para beneficio del cultivo de la Palma Aceitera.
- Seguir evaluando la capacidad de adaptación como cobertura, de otras leguminosas, que bajo determinadas condiciones podrían formar parte del agro ecosistema de la Palma Aceitera.

VII. RESUMEN

En el Ecuador el cultivo de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq), tiene gran importancia dentro de la producción agrícola del país, con una superficie sembrada de 207 285.35 hectáreas en los bloques de San Lorenzo, Occidental, Guayas, y Oriente. El bloque Occidental (Quinindé, La Concordia, Santo Domingo, y Quevedo) es el mayor de todos con una área aproximada de 150 000 hectáreas. En el país, existen 5 515 palmicultores, de los cuales el 87% son considerados como pequeños (5-50 hectáreas). El cultivo por lo tanto, tiene un enorme impacto social, además de ser fuente directa de empleo para 90 000 personas e indirecta para 50.000, generando US\$ 75 000 millones en exportaciones anuales (CENSO PALMERO, 2005).

Como parte del buen manejo de la palma aceitera, está su asociación con la leguminosa *Pueraria* (*Pueraria phaseoloides*), que desempeña el importante rol de cultivo de cobertura. Las leguminosas de cobertura presentan varias ventajas como por ejemplo: controlar la erosión del suelo, mejorar las condiciones del suelo, incorporar materia orgánica, reducir la temperatura del suelo, permitir mayor infiltración de agua, evitar la escorrentía de agua, incrementar la micro y macro flora del suelo, controlar las malezas del cultivo, controlar plagas, y una esencial (de todas las leguminosas) que es la fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la misma que se consigue gracias a la asociación simbiótica de la planta con las bacterias benéficas del suelo, comúnmente conocidas como “rizobios”, cuya característica es formar nódulos en la raíz.

En colaboración con el Organismo Internacional de Energía Atómica, se determinó mediante la técnica ^{15}N , que la *Pueraria phaseoloides* tiene la capacidad de fijar 207 Kg. N. ha^{-1} año^{-1} , en los lotes experimentales del CIPAL (Centro de Investigaciones en Palma Aceitera) ubicado en La Concordia (Ecuador), lo cual significa que las cepas nativas de la bacteria de la zona mencionada, son eficientes en fijar el nitrógeno atmosférico para beneficio de la leguminosa, y consecuentemente de la palma.

Lamentablemente, esta situación no es la misma en otras zonas palmeras del país, donde se evidencia la baja nodulación de los rizobios nativos en la *Pueraria*, con un proceso deficiente de fijación de nitrógeno. Con este antecedente, se llevó a cabo el presente estudio, cuyos objetivos fueron: a) Caracterizar fenotípicamente las cepas

aisladas de suelos pertenecientes a los cuatro bloques productores de palma aceitera, y b) Evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno, bajo condiciones de invernadero y de campo.

El estudio se inició con la recolección de 60 muestras de nódulos de raíces de la Pueraria, en las cuatro zonas productoras de palma. Las cepas bacterianas fueron aisladas a partir de los nódulos, para luego ser purificadas, y conservadas mediante la técnica de la liofilización.

La caracterización fenotípica se realizó en los laboratorios del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina (INIAP). Se procedió primeramente a la activación de las cepas en medio levadura manitol agar (LMA) más los indicadores: rojo congo (10 ml/L), LMA-azul de bromotimol (10 ml/L), y glucosa peptona agar (GPA) con púrpura de bromocresol (10 ml/L), para luego someterlas a las siguientes pruebas: tiempo de crecimiento, morfología de las colonias, acidificación o alcalinización del medio del cultivo. Adicionalmente, se evaluó la resistencia y/o tolerancia de las cepas a los antibióticos: ácido nalidíxico, estreptomina, espectinomicina, kanamicina; a metales pesados: Al, Cu, Zn, Pb; pH del medio (4,5; 5,0; y 8,5); y concentraciones de NaCl (0,5%; 1,0%; 2,0%). Para las pruebas de crecimiento, se utilizó como fuentes de carbono y nitrógeno: sorbosa, tartrato, D-glucoronic, eritritol, dulcitol, citrato, lactatosa, glucosa, galactosa, xylosa, fructosa, maltosa, sacarosa, glicina, triptófano, tirosina, utilizando un medio basal, con una concentración final de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las metodologías utilizadas fueron aquellas recomendadas por el CIAT (1988), y Bernal y Graham (2001).

Con los resultados del crecimiento de las cepas en los diferentes medios, se elaboró una matriz de datos binarios. El crecimiento positivo de las cepas en cada prueba fue considerada como valor uno (1) y la ausencia de crecimiento como cero (0). Los datos de la matriz binaria, se sometieron al análisis de Cluster, utilizando el método de UPGMA (Media Aritmética No Ponderada; Sneath & Sokal, 1973), y también utilizando los programas SPSS ver. 8.0 y el SAS (Stadistic Analisis System). El análisis de Cluster, permitió generar un dendograma mostrando la relación (parentesco) entre las diferentes cepas aisladas.

La eficiencia de fijación biológica de nitrógeno de las cepas, se determinó a nivel de invernadero (CIPAL), y campo. En invernadero, utilizando macetas, se evaluaron bajo un diseño completamente al azar, 39 cepas nativas, más una cepa control

proveniente de Colombia. Se incluyeron los controles nitrogenado y absoluto (cero). La preparación del sustrato, siembra de la semilla, preparación del inoculante, determinación de la concentración bacteriana, inoculación de las cepas, fertilización, y manejo del experimento se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del CIAT (año), y las metodologías de Bernal y Graham (2001). A los sesenta días después de la inoculación, los parámetros considerados fueron: el porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco de nódulos, peso fresco y seco de la planta, y número de nódulos. Los análisis estadísticos permitieron identificar a las cinco mejores cepas (QP12, QE26, QE43, QuZN47 y QuLR51) para ser estudiadas a nivel de campo.

En el campo, las cepas arriba mencionadas, fueron evaluadas bajo un diseño de bloques completos al azar, y en cuatro localidades: Alespalma y Palpailon (zona de San Lorenzo), CIPAL (La Concordia), y ESPE (Quevedo). Adicionalmente, se consideró también la cepa colombiana y los respectivos testigos: nitrogenado y absoluto. Los suelos primeramente fueron analizados física y químicamente (Laboratorio de Suelos, EESC-INIAP). Para la preparación del terreno, la fertilización (P, K, Ca, Mg, S, y otros nutrientes), preparación del inoculante, determinación de la concentración bacteriana, inoculación de la semilla utilizando turba, las frecuencias de riego, y demás prácticas de manejo del experimento, se siguieron también las metodologías del CIAT (1988), INIAP (2005), y Bernal y Graham (2001). Las variables evaluadas fueron: porcentaje de nitrógeno, peso fresco y seco de nódulos, peso fresco y seco de la planta.

Como resultados, la caracterización fenotípica de las cepas, realizada en el laboratorio, permitió identificarlas como bacterias pertenecientes a dos géneros: *Rhizobium* con un crecimiento rápido, y *Bradyrhizobium* con un crecimiento lento. Los resultados demuestran que la Pueraria, se asocia naturalmente por lo menos con dos géneros diferentes, siendo el género *Bradyrhizobium*, el más común. Las cepas de las zonas de Quinindé y Quevedo mostraron ser las más tolerantes a condiciones de estrés (ej. acidez, metales pesados, antibióticos, etc.). Las condiciones de una agricultura más intensiva en ambas regiones, probablemente son causa para que estos microorganismos desarrollen mecanismos de adaptación y persistencia.

En los estudios de invernadero y campo, el porcentaje de nitrógeno en la planta, el peso seco de nódulos, y el peso seco de plantas, fueron las variables de mayor

jerarquía para la selección de las cepas más eficientes en fijación biológica de nitrógeno. Las cepas QuLR51 (CIPAL), CP12 (Alespalma), CP12 (Palpailon), y la Qu LR 51 (ESPE) fueron las mejores de acuerdo a los análisis estadísticos de los parámetros considerados tanto en invernadero como en condiciones de campo. Estas cepas constituyen potenciales inoculantes de la Pueraria. La recomendación principal de este estudio de eficiencia de fijación de nitrógeno, es por lo tanto, probar a nivel de laboratorio algunos sustratos para seleccionar aquel que presente la mejor viabilidad de la bacteria en términos de concentración de células bacterianas por ml de sustrato, en el tiempo (2-3-6 meses). El mejor portador, permitirá la elaboración de inoculantes a nivel comercial, para ser entregados al palmicultor Ecuatoriano.

VIII. SUMMARY

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is a very important crop in Ecuador as part of the national agricultural production with a total planted area of 207 285.35 has, distributed in San Lorenzo, Occidental, Guayas and East (Amazon region) blocks. The Occidental block which includes: Quinindé, La Concordia, Santo Domingo, and Quevedo, is the biggest block with approximately 150 000 has. In Ecuador, there are 5 515 oil palm growers, from which the 87% are small producers (5-50 has). Therefore, the crop has an enormous social impact as direct source of jobs for 90000 people, and indirectly for 50 000 people, generating US \$ 75 000 millions due to the annual exportations (Oil Palm Production Census, 2005).

As part of the efficient oil palm management in the field, is its association with the Pueraria legume (*Pueraria phaseoloides*), which plays an important role as cover crop. Cover legumes have many advantages, such as: soil erosion control, soil conditions improvement, organic matter increase, soil temperature regulation, soil water infiltration, soil water retention, soil micro and macro biota increase, weed control, pest control, etc. An essential characteristic of legumes is the atmospheric nitrogen fixation capacity, which is due to the symbiotic association with the beneficial soil bacteria, commonly called "rizobio", whose main niche is the root nodule.

In collaboration with the International Organism of Energy Atomic (IOEA), the Research Center of Oil Palm (CIPAL, La Concordia) belonging to ANCUPA (National Association of Oil Palm Growers, in Ecuador), determined that Pueraria has the capacity to fix 207 kg N.ha⁻¹.year⁻¹, by using the ¹⁵N isotopic technique. This finding means that beneficial bacteria native strains are efficient for atmospheric nitrogen fixation to benefit the legume, and therefore indirectly the oil palm crop nitrogen nutrition.

Unfortunately, this situation is not the same in some Ecuadorian oil palm zones, where the low nodulation by "native rizobios" of Pueraria is common characteristic, which means a deficient biological nitrogen fixation process. On base of these antecedents, a research was conducted with the following main objectives: a) a phenotypical characterization of "rizobio" strains isolated from soils belonging to the four oil palm production blocks, and b) strains nitrogen biological fixation evaluation,

under greenhouse and field conditions, in order to select the best nitrogen fixing strain.

This study was initiated with a sixty *Pueraria* root nodules samples collection in the four oil palm production blocks, under low (close to the native forest), and intensive input systems. "Rizobio" bacteria were isolated from nodules, and then isolates were purified and stored through the lyophilization technique.

The phenotypical characterization was carried out in the Plant Protection Department Laboratory of INIAP (Santa Catalina Experimental Station). First, isolates were activated in yeast mannitol agar medium (LMA) containing separately the following contaminate indicators: Congo red (10ml/L) and bromothymol blue (10ml/L), and a third, bromocresol purple (10 ml/L) in glucose-peptone medium. Then, isolates were subject to the following tests: colonies growth time, colony morphology, acidification and alkaline reactions of the culture medium. Additionally, it was evaluated the resistance and/or tolerance of isolates to antibiotics (nalidixic acid, streptomycin, spectinomycin, kanamycin), heavy metals (Al, Cu, Zn, Pb), growth in pH 4.5; 5.0; and 8.5, NaCl concentration (0.5; 1.0 and 2.0%). For the growth test, the following carbon and nitrogen sources were used: sorbose, tartrate, D-glucuronic, eritritol, dulcitol, citrate, lactatose, glucose, galactose, xylose, fructose, maltose, sucrose, glicine, tryptophan, tirosine, by using basal medium, in a final concentration of $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. For this, the methodologies recommended by CIAT (1988), and Bernal and Graham (2001), were followed.

With the isolates growth results in the different media, a binary matrix was elaborated. The growth of isolates was considered as value 1, and the negative growth was considered as value 0. The data were subject to a "cluster" analysis by using the UPGMA (Media Arithmetic No Pondered; Sneath & Sokal, 1973) method, and the SPSS ver. 8.0 and SAS (Statistic Analysis System) programs. The cluster analysis allowed generating a "dendogram" showing the different isolate relationships.

The biological nitrogen fixation capacity of isolates was determined in greenhouse (CIPAL) and field conditions. In the greenhouse, by using pots, a completely random design was used with 39 isolates (treatments), plus a control stains used in Colombia. Nitrogen and absolute (without nitrogen, and without bacteria isolate) controls were added. The substrate preparation, seed disinfection, seed planting,

inoculants preparation, bacteria concentration, isolate inoculation, fertilization, and experiment management was carried out by following the methods recommended by CIAT (1988), and Bernal and Graham (2001). Sixty days after the seed inoculation, the parameters measured were: nitrogen percentage, fresh and dry weight of nodules, fresh and dry weight of plant, and nodule number per treatment. The statistical analysis allowed to identify the best five strains on base of the parameters above indicated. The strains were: QP12, QE26, QE43, QuZN47, and QuLR51. These strains were then considered for the next research step, the field experiment.

Under field conditions, the strains were evaluated by using a random completely blocks design, with four reps, and four sites: Alespalma and Palpailon (San Lorenzo zone), CIPAL (La Concordia zone), and ESPE (Quevedo zone). Additionally, a strain used in Colombia, and the nitrogen (+N: 80 kg N/ha) and absolute (-N, -strain) controls were included. First, soils samples in each experimental site were collected for physical and chemical analysis (EESC-INIAP, Soils Laboratory). For the soil preparation, fertilization (P, K, Ca, Mg, S, and other nutrients), peat inoculants preparation, bacteria concentration, seed inoculation, irrigation frequency, and other experiment management practices, the methodology recommended by CIAT (1988), INIAP (2005), and Bernal and Graham (2001), were used. The variables considered to evaluate the strains nitrogen fixation capacity were: nitrogen percentage, fresh and dry weight of nodules, fresh and dry weight of plants.

As results, the isolate phenotypical characterization carried out in laboratory, allowed to identify two main bacteria groups. One group was of slow growth, and the other group was of fast growth. These results show that *Pueraria* is associated at least with two "rizobio" genus: *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* (the most common in this study). The isolates coming from Quinindé and Quevedo zones were the most tolerant to "stress" conditions (i.e.: acidity, heavy metals, antibiotics, etc.). Probably, the intensive agriculture practices in both zones generated specific conditions, and the "rizobio" bacteria created mechanisms for adaptation and persistence under these disturbed soil conditions.

In the greenhouse and field experiments; nitrogen percentage of plant, nodules dry weight, and plant dry weight, were the most important parameters used in order to select the most efficient nitrogen fixation "rizobio" isolates. The strains: QuLR51 (CIPAL), CP12 (Alespalma), CP12 (Palpailon), and Qu LR 51 (ESPE) were the best

according to the statistical analysis of data obtained and compared with control treatments, in both greenhouse and field trials.

These strains become potential inoculants of Pueraria. Therefore, one of the main recommendations of this study is to test under laboratory conditions, some substrates in order to select one "carrier" that allow the bacteria viability in terms of bacteria cells concentration/g or ml of substrate, during the time (2-3-6 months). The best carrier will allow to ANCUPA, the elaboration of commercial Pueraria seed inoculants, to be provided to the Ecuadorian palmicultor.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- BERNAL, G. 2008. Comunicación personal. Microbiólogo de suelos. Director de Investigaciones de ANCUPA.
- BERNARL, G., SUAREZ, A., JEREZ, M., y CAMPAÑA, D. 2002. Inoculación de la semilla de leguminosa con la bacteria "*Rhizobium*". Proyecto PROMSA. Triptico N° INIAP.
- BERNAL, G. y Colaboradores. 2006. LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. Componente clave en la fertilidad de los suelos y el rendimiento de cultivos en Ecuador. INAP-GAIA. GAYA Editores.
- BERNAL, G. and GRAHAM, P. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with Mexican bean rhizobia. Can. J. Microbiol. Vol. 47. Number 6. pp:526-534.
- BREEDVELD, M. W.; MILLER, K. J. 1998. The Rhizobiaaceae: molecular biology of model plant-associates bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Neverlands. Capitulo 5: 91 – 93.
- CARMONA, A. 2004. Cobertura Vegetal en Palma Aceitera. Costa Rica. XXVI Curso Internacional de Palma Aceitera. Agosto 23 – Septiembre 11.
- CENSO PALMERO. 2005. Asociación Nacional de Palma Aceitera (ANCUPA), Fundación de Fomento de Exportaciones de Aceite de Palma y sus Derivados de Origen Nacional (FEDEPAL), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria (SIGAGRO).
- CHAVEZ, F. y RIVADENEIRA, J. 2003. Manual del Cultivo de Palma Aceitera. Quito: Editorial Pasquel. 47p
- CIAT. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Editores: Proyecto CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)-UNDP de Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-Rizobio para aumentar la Fijación Biológica del Nitrógeno. Cali, Colombia.
- COYNE, M. 2000. Microbiología del Suelo un Enfoque Exploratorio. México.
- FREIRE, J. 1996. For the Rhizobium-legume symbiosis. In Alexander, M (ed) 1984. Biological nitrogen fixation; ecology, technology and physiology. New York, Plenum Press. P. 51-72.
- GRAHAM, P. 1998. Biological dinitrogen fixation Symbiotic. P. 322-345. In Principles and Aplications of Soil Microbiology. Sylvia, et al., eds. Prentice-Hall, Upper Saddle River,NJ.

- GRAHAM, P. H. 2000. Nodule formation in Legumes. *Encyclopedia of Microbiology*. 3:407-417.
- GILLER and FAIRHUSTA. 2003.
- JEREZ, M. 2004. Evaluación de Biotipos de *Bradyrhizobium* spp. en el cultivo del Maní (*Arachis hypogaea* L.) en las provincias de Manabí y Loja. Tesis Ing. Agr. Quito. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 127 p.
- HAUKKA, F. 1997. Genetic diversity and Phylogeny of Rhizobia Isolated from Tropical Tree legumes. *Dissertationes Biocentr Viikki Universttatis Helsingiensis*. Tesis doctoral.
- MARTÍNEZ, M. 1992. Biología del Nitrógeno. En interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno.eds. González López, J.G y Lluch PlaC. España. P 25-36.
- MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D. y PALACIOS, R. 1990. The Rhizobium genome. *Plant. Science*. 9: 59 – 93.
- MEJOR PASTO. *Pueraria phaseoloides*.(en linea). Mejor Pasto. Argentina. Consultado 5 de abril. 2006. Disponible en www.mejorpasto.com.ar/.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B. y BOIVIN-MASSON, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Protoeobacteria. *Nature*. 411: 948-950.
- PAUL, E.A. Y R.M.N. KUCEY. 1981. Carbon flow in plant microbial associations. *Science*. 213:473-74.
- PERRET, X.; STAHELIN, C. y BROUGHTON, W. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 64: 180-201.
- POUND, B. 1997. Cultivos de Cobertura para la Agricultura Sostenible en América. Taller Regional Latinoamericano, realizado por la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida, México. Consultado 13 Marzo 2006. Disponible en: <http://www.lead.virtualcenter.org/es/ele/conferencia1/Agrofor1.htm>
- RANKINE, TH. y HARDTER, R. 1998. Guía de Campo. Serie en Palma Aceitera. Fase Inmadura. Volumen II. INPOFOS Y CANPOTEX. p 75-84.
- RODRIGUEZ, M.; GONZALEZ, M. y FERRERA, R. 1993. Manual de Agromicrobiología. México. Editorial Trillas. 11p.
- ROSKOSKI, P. 1985. Ensayo de selección de cepas y respuesta a la inoculación. Primer Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. *Ceiba (Hond)* 27(1): 147-150.

- SADOWSKY, M. and GRAHAM, P. 1998. Soil Biology of the Rhizobiaceae. The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Cap. 8: 155-172.
- SNEATH, H. F. and SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Eds. D. Kennedy. 573 p.
- SOMASEGARAN, P. and HOBEN, H. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer Laboratory. New York, U.S.A.
- SPAINK, H.; KONDOROSI, A. and HOOYKAAS, P.; 1998. The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academia Publishers.
- SPAINK, HP. 1994. The molecular basis of the host specificity of Rhizobium bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 65: 81 – 98.
- SPAINK, H. P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of sympathogenesis. Annual Review of Phytopathology. 33: 345 – 368.
- STACEY. G. 1995. Bradyrhizobium japonicum nodulation genetics. FEMS Microbiology Letters. 127: 1 – 9.
- TAIZ, Z. and ZEIGER, E. 1991. Plant Physiology. The Benjamín/Cumming Publishing Company, Inc. 559p.
- TAIRUAN, T.; AGUILAR, O. and FABRA, A. 2002. Characterization of nodulation peanut rhizobia isolated from a native soil population in Cordoba, Argentina. Balaban, Philadelphia. Simbiosis. 33: 59-72.
- URQUIAGA, S. BERNAL, G. MORALES, R. y ROMERO, G. 2008. Cuantificación de la Fijación Biológica de Nitrógeno en el cultivo de Pueraria phaseoloides, como cobertura de la Palma Aceitera en el Ecuador. Revista ANCUPA. Por Publicarse.
- VAN RHIJN, P. and VENDERLEYDEN, J. 1995. The Rhizobium plant symbiosis. Microbiology reviews. 59: 124 – 142.
- VINCENT, J. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Centro Regional de Ayuda Técnica. Buenos Aires (Arg.). Editorial Hemisferio Sur. 200p.
- VINUESA, P. 1998. Genetic and phenotypic analysis of Rhizobium etli and R. tropici mutants defective in typing methods. Tesis Doctoral. Marburg. Alemania. 132p.
- YOUNG, J. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil. 186: 45- 52.

Anexo 2. Distribución Aleatoria para Toma de Muestras en la Zona Productora de Palma Aceitera. Propietarios y Provincias.

Para la distribución de los lugares donde se tomó las muestras de suelo a través del siguiente proceso:

1. Se tomó del Censo Palmero (2005), la información de todos los palmicultores, distribuidos por zonas de producción, donde se obtuvo la siguiente información:

Bloques	Letras	Palmicultores	Superficie	%	Muestras
Quinindé	A, B, C, D, E	4 091	119 414,61	58%	35
Quevedo	F, G, H, I	1 464	54 416,5	26%	16
San Lorenzo	K	71	15 187,31	7%	4
Oriental	J	350	18 266,89	9%	5
TOTAL		5 976	207 285,31	100%	60

2. Se sumó la superficie sembrada de cada una de las zonas. De acuerdo a la superficie se relacionó con el número de muestras que se tomarán en cada zona productora de palma aceitera.
3. Se separaron los diferentes bloques para establecer el número de palmicultores.
4. Para cada zona con el número de palmicultores, se procedió a realizar una distribución aleatoria, con el número de muestras determinado, y luego se realizó la identificación del propietario, la codificación de la boleta y la provincia donde se encuentra ubicada.

BOLETA	PROPIETARIO	SUPERFICIE (ha)	PROVINCIA	Nº Randomizado	Nº de Muestras
A0094	ANGULO QUIÑONEZ FLAVIO	6,0	ESMERALDAS	94	1
A0103	SOLORZANO PAZMIÑO JACINTO ALADINO	11,0	ESMERALDAS	103	2
A0398	ARGOTY MATILDE	32,0	ESMERALDAS	398	3
A0408	BRAVO MOLINA RAMON VICENTE	18,7	ESMERALDAS	408	4
A0490	VARELA MUÑOZ GALO AVIGAIL	11,0	ESMERALDAS	490	5
B0004	CHOEZ PILAY ANGEL WALTER	13,0	ESMERALDAS	502	6
B0046	SANCHEZ CONTRERAS DIONICIO	25,0	ZONA NO DELIMITADA	544	7
B0101	ABAD PIGUAVE RAYMUNDO ZACARIAS	91,8	ESMERALDAS	598	8
B0184	FUENTES PEÑAFIEL JULIO	25,0	PICHINCHA	679	9
B0239	ZAMBRANO ROMERO FRANKLIN MAURICIO	43,0	ESMERALDAS	734	10
B0276	MUÑOZ PAZMIÑO JORGE	107,0	PICHINCHA	771	11
B0613	CEVALLOS GUEVARA RODRIGO	30,0	ESMERALDAS	1 107	12
B0643	GUISADO PAREDES LUIS GENARO	10,5	ESMERALDAS	1 137	13
B0980	JIMENEZ AMAIQUEMA PRIMITIVO	11,0	ESMERALDAS	1 473	14
B1002	BUÑAY JIMENEZ CRUZ MAR=A	20,0	ESMERALDAS	1 495	15
C0043	CORDOVA CEVALLOS EDUARDO	54,0	ESMERALDAS	1 755	16
C0110	OCAÑA GAVILANEZ HUGO SERGIO	60,0	ESMERALDAS	1 823	17
C0415	TORRES JACOME BENITO PRADO	3,0	ESMERALDAS	2 119	18
C0497	CHIMBO LUIS LIZARDO	21,0	ESMERALDAS	2 201	19

C0547	MARIÑO CASTILLO JOSE FLORIANO	20,0	ESMERALDAS	2 250	20
C0689	CORDOVA CORDOVA DAYSI MARIELA	5,0	ESMERALDAS	2 392	21
C0884	SALTOS NUÑEZ WENCESLAO	12,0	ESMERALDAS	2 586	22
D0352	RIVERA GUERRERO ANGLE	5,0	PICHINCHA	2 960	23
D0354	SANCHEZ VIVANCO WILSON	45,0	PICHINCHA	2 962	24
D0399	CASTRO GAVIDIA JORGE BOLIVAR	4,0	PICHINCHA	3 007	25
E0023	VEAS TARIRA SICTO ALEJANDRO	12,0	ZONA NO DELIMITADA	3 182	26
E0171	HASEGAWA KOMIYAMA IZUMI	30,0	ZONA NO DELIMITADA	3 322	27
E0282	BECDACH CARLOS	52,6	PICHINCHA	3 426	28
E0286	ANDRADE SEGUNDO	14,0	ZONA NO DELIMITADA	3 430	29
E0390	CEDEÑO SALTOS MAURA	47,0	ZONA NO DELIMITADA	3 531	30
E0431	AYALA HERRERA ANGEL ISAC	47,0	ZONA NO DELIMITADA	3 572	31
E0493	CANALES MERCHAN EPIFANIO GERMA	9,0	ZONA NO DELIMITADA	3 632	32
E0567	PAZMIÑO ARMANDO	9,0	ZONA NO DELIMITADA	3 705	33
E0683	FERRIN ZAMBRANO CAYETANO	40,0	PICHINCHA	3 821	34
E0909	BARREIRO FLORI LIDIA ROSARIO	65,0	ZONA NO DELIMITADA	4 044	35
G0054	GONZALEZ VELIZ JULIO RAMON	8,0	ZONA NO DELIMITADA	84	36
G0108	FAULA FELIX	10,0	ZONA NO DELIMITADA	138	37
G0166	GONZABAY RUIZ PIEDAD MARGARITA	25,0	LOS RIOS	193	38
G0355	TORRES JAVIER ISAAC	20,0	ZONA NO DELIMITADA	373	39
G0358	ARREAGA ALFREDO	4,0	ZONA NO DELIMITADA	376	40
G0411	PONCE ZAMBRANO MARIA GEOCONDA	30,0	PICHINCHA	428	41
G0711	YEPEZ BOLIVAR	6,0	ZONA NO DELIMITADA	728	42

G0754	PARRAGA CEDEÑO SEGUNDO	10,0	ZONA NO DELIMITADA	768	43
G0823	SANCHEZ RAMOS JORGE	32,0	LOS RIOS	835	44
H0043	ZURITA CAMPOS SIXTO	123,0	LOS RIOS	898	45
H0076	CAJAMARCA ZAPATA MARIA ASUNCIO	23,5	LOS RIOS	931	46
H0120	HOLGUIN GUTIERREZ PABLO VICENTE	40,0	LOS RIOS	975	47
H0495	CARCAMO PARRALES JOSE	35,3	LOS RIOS	1 347	48
H0498	CHI KUAN JUAN CHUTAI	57,0	LOS RIOS	1 350	49
H0508	SOLIS MARTINEZ CARLOS FELIPE	17,0	LOS RIOS	1 360	50
H0601	CHONG QUI LAN LON ALEJANDRO	200,0	GUAYAS	1 453	51
K0003	AIQUISA	234,2	ESMERALDAS	3	52
K0016	PALPAILON HIDALGO HIDALGO	1600,0	ESMERALDAS	16	53
K0030	FERNADEZ HIDALGO JUAN MANUEL	30,0	ESMERALDAS	30	54
K0041	CORDOVEZ NORMA	68,0	ESMERALDAS	41	55
J0055	ESPAÑA MEDINA CARLOS ALBERTO	115,0	ORELLANA	59	56
J0088	AREVALO BRAVO JUAN BAUTISTA	24,0	SUCUMBIOS	93	57
J0125	VALDIVIESO BURNEO BEATRIZ LUCRECIA	42,0	SUCUMBIOS	130	58
J0199	ALVARADO MELO OLIVAR	10,0	SUCUMBIOS	204	59
J0282	ACOSTA FRANCISCO	25,0	ORELLANA	287	60

Anexo 3. Solución Nutritiva Summerfield –N (McDemott and Graham. 1990)

Stock 1	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	27.50 g
KNO ₃	6.87 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.45 g
Agua destilada:	2500.00 ml

Stock 2	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	68.75 g
NaFe EDTA	10.20 g
H ₂ O	2500.00 ml

Stock 3	
K ₂ HPO ₄	43.85 g
K ₂ SO ₄	31.35 g
H ₂ O	2500.00 ml

Stock 4	
CaSO ₄	87.50 g
H ₂ O	2500.00 ml

Stock 5 (micro)	
KCl	33.50g
H ₃ BO ₃	9.375 g
MnSO ₄ · H ₂ O	21.25 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.37 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	3.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	3.375 g
H ₂ SO ₄ (conc.)	13.50 ml
H ₂ O	2500.00 ml

Stocks 1-2-3-4: Usar 100 ml por 10 l

Stock 5: Usar 2 ml por 10 l

Anexo 4. Medios de Cultivo

Medio TL (tryptone-yeast)

Tryptona (caseina)	10.00 g
Extracto de levadura	1.00 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.294 g
Agua destilada	1.00 L
pH	7.0

Para medio sólido se agrega por cada 1000 ml de medio líquido 20 g de agar.

Medio basal para fuentes de carbono y nitrógeno.

K ₂ HPO ₄	1.00 g
KH ₂ PO ₄	1.00 g
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0.10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.20 g
CaCl ₂	0.10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.00 g
Agar	20.00 g
Fuente de Carbono	1.00 g (esterilizar por filtración).
Agua destilada	1.00 L

Para fuentes de N. usar el mismo medio. pero reemplazar el (NH₄)₂SO₄ por manitol (1 g/l).
Colocar la fuente de nitrógeno: 0.50 g/l (filtrado).

Antibióticos en medio TLA (Jerez, 2004).

Acido nalidixico	40 mg
Estreptomina	3 mg
Espectinomicina	5 mg
Kanamicina	10 mg

Metales pesados en Medio TLA (Jerez, 2004).

CuCl ₂ · 2H ₂ O	100 ug /ml
Al Cl ₃ · 6 H ₂ O	500 ug/ ml
Zn Cl ₂	100 ug/ ml
Pb (CH ₃ COO) ₂	500 ug / ml

Medio LMA (Levadura-Manitol-Agar) (Somasegaran and Hoben, 1994)

Manitol	10.00 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.50 g
Extracto de levadura	0.40 g
CINa	0.10 g
Agar	20.00 g
Agua destilada	1 L
Ph	6.8

*Solución de RC	10 ml (stock)
Solución de BTB	5 ml (stock)

*soluciones stock:

Rojo Congo (RC). 0.25 g/100 ml de agua destilada

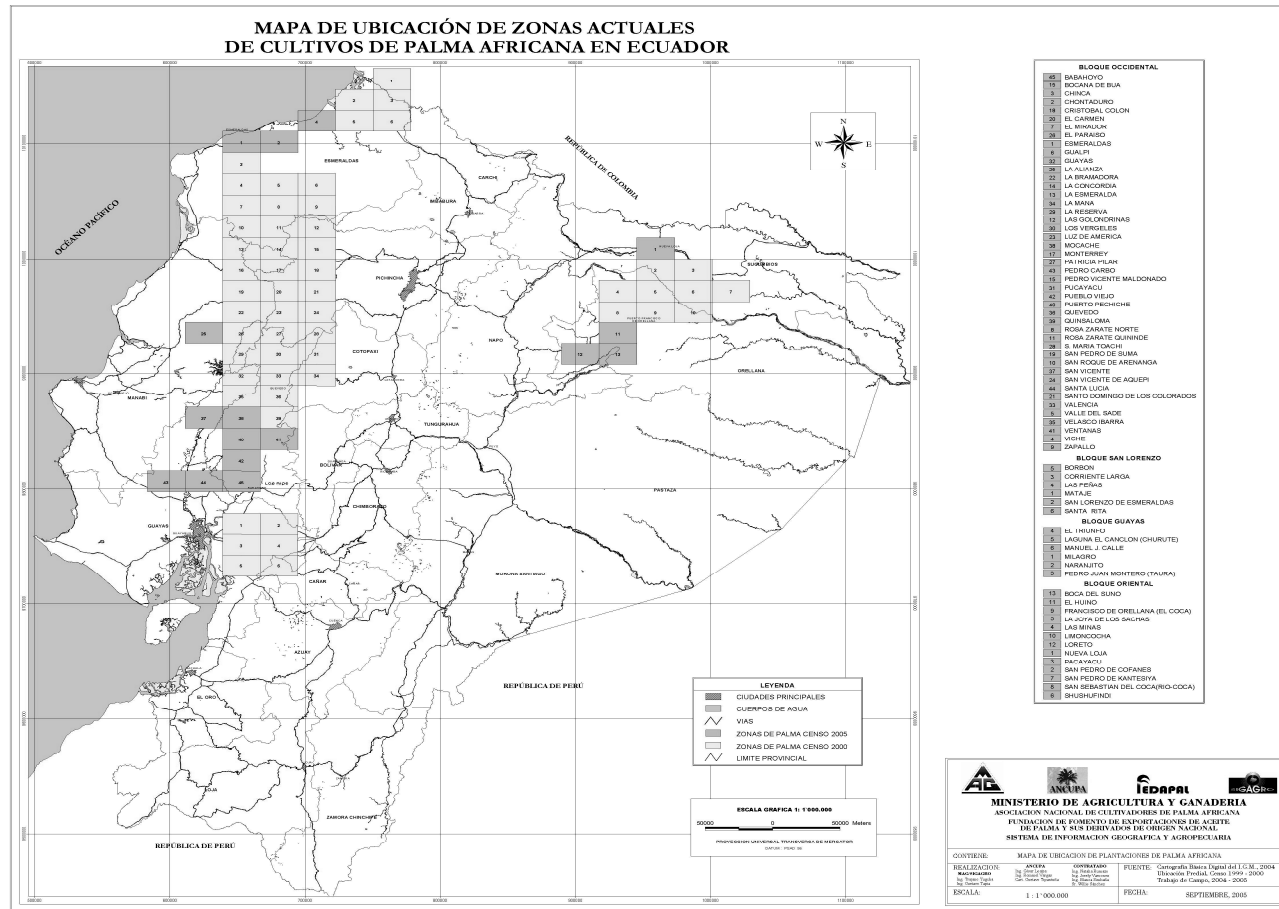
Azul de Bromotimol (BTB). 0.5 g/100 ml de etanol

Medio GPA (Glucosa-Peptona-Agar) (CIAT 1988)

Glucosa	5 g
Petona	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L
* Solución de BCP	10 ml (stock)

* Solución stock: Púrpura de Bromocresol (BCP). 1g/100ml de etanol

Anexo 5. Mapa de Ubicación de Zonas Actuales de Cultivos de Palma Africana en Ecuador.





MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

 ASOCIACION NACIONAL DE CULTIVADORES DE PALMA AFRICANA

 FUNDACION DE FOMENTO DE EXPORTACIONES DE ACEITE

 DE PALMA Y SUS DERIVADOS DE ORIGEN NACIONAL

 SISTEMA DE INFORMACION GEOGRAFICA Y AGRICOLA

CONVENCION: MAPA DE UBICACION DE PLANTACIONES DE PALMA AFRICANA

 REELABORACION: ANE, ANSURA, IDAPAL, IAGRO

 ELABORACION: ANE, ANSURA, IDAPAL, IAGRO

 ESCALA: 1: 1'000.000

 FECHA: SEPTIEMBRE, 2005

Anexo 6. Formulario de Recolección de Muestras en Palma Aceitera.

Numero de Recolección:			
Fecha de Recolección:			
Recolector:		Gonzalo Romero Rojas	
Nombre del Propietario:			
Procedencia de la Cepa		Historial del Lote	
Zona:		Uso Actual:	Uso anterior:
Provincia:		Bosque	
Cantón:		Pastizales	
Hacienda:		Cultivo	
N Lote:			
N Hilas:			
N Plantas:			
Datos del Cultivo			
Edad del Cultivo:			
Superficie Sembrada:			
Variedad:			
Presencia de Cultivo de Cobertura:			
Riego:	Si	No	
		Tipo de Riego:	Frecuencia:
		Dosis:	
		Tipo de Fertilizante	Frecuencia:
		1.-	1.-
		2	2
		3.-	3.-
		4.-	4.-
Utilización de Abonos Químicos:			
		Tipo de Fertilizante	Frecuencia:
		1.-	1.-
		2-	2-
		3-	3-
		4-	4-
Utilización de Abonos Orgánicos:			
		Tipo de Fertilizante	Frecuencia:
		1.-	1.-
		2-	2-
		3-	3-
		4-	4-
Como se incorporan al suelo:			
Estado de la Parcela			
Cobertura de la Leguminosa (%):			
Estado de la Leguminosa:		Edad:	Condición:
Presencia de Nódulos:		Si:	No:
		% Infección:	
Pendiente:			
		Color:	Forma:
			Textura:
Hay zonas compactadas:			
Se inunda fácilmente:			