



**República de Cuba**

**UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

Título: Determinación de especies nativas de rhizobium sp en leguminosas silvestres bajo condiciones semicontroladas y diferentes tipos de suelo.

Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo

**Autor: Jesús Bautista Silveira García.**

**Tutor: MsC Layda Toledo Vázquez.**

**AÑO 2012**

**AÑO 54 DE LA REVOLUCION**

## Resumen.

El estudio se realizó en la Estación Experimental de suelos Escambray, durante dos años en condiciones semicontroladas, utilizando bolsas de polietileno para frutales, con un diseño de bloque al azar y tres replicas. El trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de cepas nativas de rhizobium de leguminosas y su aislamiento y descripción en tres suelos para la confección de un cepario para investigaciones. Los suelos se colectaron de las localidades de la provincia de Villa Clara Guinia, Santa Clara (Laboratorio de Inseminación) y autopista nacional finca el cocal. Las especies de leguminosas seleccionadas con fines de alimentación animal fueron: T. labiales cv semilla clara (*Terannus labiales cv semilla clara*), Conchita azul (*Clitoria ternatea*), T. uncinatum (*Terannus uncinatus*), C. pubescens flor morada (*Centrosema pubescens sp*), Glycine, . C. pubescens flor blanca (*Centrosema pubescens sp*), Kudzú, (*Pueraria phaseoloide*)C. plumieri, Siratro (*Macroptilium atropurpureum cv siratro*), Canavalia (*Canavalia ensiforme*). Las etapas para el desarrollo del mismo fueron tres; 1. Colecta de los suelos, 2. Desarrollo y crecimiento de las especies en los tres suelos seleccionados y 3. Aislamiento y evaluación. Las mediciones efectuadas fueron el conteo de nódulos/plantas clasificados por tamaños, descripción de los mismos de acuerdo al color y forma. Determinación de la presencia de cepas de rhizobium en los diferentes suelos por especie, determinación de la velocidad de crecimiento, sensibilidad a los bacterografos y descripción de las cepas aisladas. El suelo donde el 90% de las especies nodularon indicando la presencia de rhizobium de vida libre en suelos fue guinia, todo lo contrario sucedió en el cocal donde solo tres respondieron de forma positiva, de forma general los nódulos son color crema o beige de tamaño variable, y forma redondeada, e irregular, destacándose la conchita azul. Las cepas se presentaron como bastones cortos y se tiñeron de color rosado. Las especies de mejor comportamiento y donde se identificaron cepas de rhizobium fueron conchita azul, terannus labiales y c. pubescens. Se recomienda continuar el estudio aislando las cepas también en suelo.

## Summary

The study was carried out in the Experimental Station of Soils Escambray, during two years under semi control conditions, using polyethylene bags for fruit-bearing, with a block design at random and three reply. The work had as objective to determine the presence of native stumps of rhizobium of leguminous and its isolation and description in three soils for the making of a stumps station for investigations. The soils were collected of the towns of the county of Villa Clara, Santa Clara (Laboratory of Insemination) and of property plantation El Cocal. The species of leguminous selected with goal of animal feeding were: T. labial cv clear seed (Terannus labial cv clear seed), blue Shell (Clitoria ternatea), T. uncinatum (Terannus uncinatus), C. pubencens lived flower (Centrosema pubencesn sp), Glycine. C. pubencens white flower (Centrosema pubencesn sp), Kudzú, (Pueraria phaseoloide)C. plumieri, Siratro (Macroptilium atropurpureum cv siratro), Canavalia (Canavalia ensiforme). The stages for the development of the same one were three; 1. Collect of the floors, 2. Development and growth of the species in the three selected soils and 3. Isolation and evaluation. The made mensuration were the node /plants count classified by sizes, description of the same ones according to the color and form. Determination of the presence of rhizobium stumps in the different floors for species, determination of the speed of growth, sensibility to the bacterium Graf and description of the isolated stumps. The soil where 90% of the species noded indicating the presence of rhizobium of free life in soils of Villa Clara, just the opposite it happened in the plantation El Cocal, where alone three responded in a positive way, in a general way the nodules are cream color or beige of variable size, and rounded, and irregular form, standing out the blue shell. The stumps were presented as short canes and they were tinted of rosy color. The species of better behavior and where rhizobium stumps were identified they were blue shell, labial terannus and c. pubencens. It is recommended to continue the study also isolating the stumps in soils.

Key words *Rhizobium*, leguminous, soil.

## Agradecimientos.

Un agradecimiento muy especial para mi tutora Layda Toledo Vázquez por su sabiduría, sus consejos y porque sin ella no hubiera sido posible este trabajo.

A todos los profesores y aquellas personas que de una forma u otra han contribuido con mi formación.

A la revolución y en especial al comandante en Jefe por haber creado el programa de universalización por el cual hoy hemos podido formarnos y superarnos.

Dedicatoria.

A mi esposa, sin quien no hubiese sido posible llegar hasta aquí.

A mis hijos.

A mi familia.

## Índice.

<b>Introducción.</b> .....	6
<b>CAPITULO I.</b> .....	12
<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.</b> .....	12
1.1. Leguminosas en los sistemas agropecuarios.....	12
La simbiosis Rhizobium-leguminosas. ....	14
1.3. Fijación de nitrógeno atmosférico a través de los nódulos. ....	18
<b>FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS.</b> .....	20
<b>NODULACIÓN:</b> .....	21
<b>CAPITULO II.</b> .....	24
Metodología de investigación.....	24
La investigación se realizo por etapas.....	26
Aislamiento.....	26
<b>Colecta de muestras de suelo:</b> .....	27
<b>Mediciones:</b> .....	28
<b>CAPITULO III.</b> .....	30
Resultados y discusión.....	30
3.1. Determinar la presencia de Rhizobium sp en las leguminosas silvestres bajo condiciones de estudio.....	30
3.2. Aislar y describir los nódulos presentes en las diferentes especies de leguminosas silvestres. ....	31
3.3. Caracterizar las cepas de Rhizobium predeterminadas. ....	33
Conclusiones. ....	35
Recomendaciones .....	36
➤ Continuar los estudios con las muestras de suelos. ....	36
Bibliografía. ....	37

## Introducción.

Para promover una agricultura sustentable, se requiere implementar acciones más dependientes de procesos biológicos que conduzcan a la sustentabilidad de la agricultura en un sentido amplio, mediante uso óptimo de los recursos, incrementos en la potencialidad de los recursos naturales y por ende en la productividad, evitando al máximo daños irreversibles en alguno de los componentes del sistema de producción (Altieri, M.A. 1997).

Entre las prácticas de manejo integral de la fertilidad del suelo se encuentra el uso combinado de abonos orgánicos, inorgánicos y biológicos (simbióticos y asociativos) en busca de mejorar las limitaciones físicas, químicas y biológicas, donde los biofertilizantes representan un pilar fundamental de la sustentabilidad.

Reduciendo significativamente la contaminación ambiental, al disminuir las altas aplicaciones de fertilizantes inorgánicos nitrogenados y fosfatados, al estimular procesos naturales como la fijación biológica de nitrógeno por simbiosis con *Rhizobium* y por microorganismos asociativos de vida libre (Funes Monzote, F. 2000).

Las fuentes de nitrógeno de importancia para el suelo son: el almacenado por acumulación de la materia orgánica: el producto de la fijación biológica atmosférico: el proveniente de la síntesis industrial, restos de vegetales, excreta y fertilizante: en menor cantidad por las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y proveniente de las lluvias.

La actividad del edafón y el papel de la materia orgánica como fuentes de nutrientes son ya bastante reconocidos. En el ciclo suelo-planta-suelo hay un complejo de interacciones que influyen en desarrollo y calidad de las plantas. Cada una de las especies de plantas favorecen el desarrollo de un tipo de especies de vida y las raíces de las plantas también tiene una población particular de microorganismos que interactúan (Funes Monzote, 2000).

Las relaciones interespecíficas son aquellas que tienen lugar entre individuos de diferentes especies y donde el resultado de tales relaciones o interacciones puede ser positivo, negativo o neutro para uno o todas las especies involucradas. Viviendo en estrecha asociación las especies pueden interactuar. Ellas pueden competir por un recurso compartido, tal como, alimento, luz, espacio, humedad. Uno puede depender del otro como recurso de alimento. Ellos pueden proveer ayuda mutua o no tener efecto directo el uno sobre el otro.

Dentro de estas relaciones se puede destacar un grupo de ellas conocidas por simbiosis o relaciones simbióticas.

Las interacciones mutualistas están también relacionadas con la asimilación de nutrientes en las plantas. El nitrógeno es un constituyente esencial de proteínas, en todo ser vivo.

Aunque el nitrógeno es el mayor constituyente de la atmósfera (aproximadamente el 79% en su estado gaseoso), este no está disponible para la vida. Este debe ser convertido primero a una forma químicamente utilizable. Un grupo de organismos que puede utilizar el nitrógeno gaseoso (N<sub>2</sub>) son las bacterias nitro fijadoras del género *Rhizobium*.

Las bacterias *Rhizobium* están ampliamente distribuidas en el suelo, donde pueden crecer y multiplicarse, pero en su forma de vida libre no fijan nitrógeno. Las legumbres atraen a estas bacterias a través de la secreción de exudados y enzimas desde las raíces. La bacteria *Rhizobium* entra en los pelos de las raíces donde se multiplican e incrementan en tamaño. La bacteria recibe carbón y otros recursos de la planta hospedera, mientras la bacteria contribuye a la fijación del nitrógeno a la planta, permitiéndole funcionar y crecer de manera independiente a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

Las especies endémicas desaparecen debido a la actividad humana que provoca cambios notables en su habitat. En Cuba este hecho de identificar como un gran problema ambiental ya que el 50% de las 6700 especies existentes son endémicas y constituyen un patrimonio biológico de gran valor nacional e internacional. Preservar esta diversidad de plantas representa un reto de gran importancia a desarrollar por los programas estatales identificando las pérdidas y ejecutando acciones concretas para mitigarlas e implementando técnicas de restitución para restaurar poblaciones silvestres con peligro de extinción.

Se considera que dos terceras partes del total de especies de plantas del planeta (300 000) desaparezcan dentro de un período no mayor de 40 años. Las causas fundamentales del fenómeno están condicionadas por los cambios climáticos, tala indiscriminada, guerras, uso de productos químicos, mecanización, quema y desconocimiento del problema por los funcionarios y productores que administran fincas y empresas.

Resulta importante plantear que existe en estos momentos ecosistemas otras afectaciones que pasan inadvertidos como son el deterioro del suelo como elemento vivo y la disminución de los microorganismos que aunque no se tienen en cuenta afecta la calidad del suelo.

La familia de las leguminosas agrupa unas 16 000 especies de muy variados portes, son de interés en un elevado número de género y especies por obtenerse de ellas grandes proporciones de principios nutritivos para la alimentación del hombre y de los animales.

En sistemas de producción con bajos insumos aportan nitrógeno al medio a través de la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* con reportes de 100 – 250 y hasta 5000 kg/ha/año. También aportan al suelo reciclando la fracción muerta materia orgánica es importante en los suelos en general y muy en particular donde se desarrollara este trabajo, muchas leguminosas conservan el suelo al formar parte de una cubierta evitando la acción directa de agentes degradantes o erosivos.

Un cultivo de leguminosa puede fijar entre 200 – 300 kg ha año<sup>-1</sup> de nitrógeno esto ocurre cuando el cultivo es floreciente y el suelo pobre en nitrógeno. Puede ocurrir que cuando una leguminosa agota el N del suelo, si esta no fija N atmosférico y vive a expensas del existente en el suelo-

El nitrógeno entra al ciclo por medio de la semilla, compuestos nitrogenados del suelo, fijación biológica de nitrógeno mientras que la salida esta dada por la recogida de las cosechas, cuando se retira el ganado, pérdidas por quema, erosión, lavado, volatilización, así como milación por parte de las plantas, mineralización.

El regreso por su parte es a través del excremento del ganado, residuos de cosecha. Estas constituyen las trayectorias básicas del flujo del nitrógeno fijado por las leguminosas dentro del ciclo del nitrógeno. La fijación del nitrógeno que es reducir de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> requiere energía el proceso industrial utiliza como fuente de energía combustible fósil no renovable.

La energía usada en la fijación simbiótica proviene de los exudados de la raíz o bien directamente de la planta hospedera y se trata de una energía de origen solar captada en la fotosíntesis y de una fuente renovable distribuida en toda la superficie terrestre.

Las leguminosas silvestres están bien adaptadas a las distintas variaciones del ambiente, suelo y clima, acidez, y esta diferenciación de los individuos en cada lugar lo que le permite lograr dentro de cada especie las mejores características. La relación leguminosa - *Rhizobium* es directa y las variaciones de los factores edafoclimáticos han

influido o no en esta relación, se pierde o aumenta, sigue siendo específica o varía de acuerdo a las especies.

En mayo de 1991 Fidel subrayó que el pastoreo rotacional, la sacharina y las leguminosas que se adaptaran a las condiciones de nuestro país serían la solución verdadera de la ganadería y llamó a dedicar especial atención en los centros de investigación al logro de variedades de leguminosas que se pudieran establecer en las condiciones climáticas y de suelo del país.

En las leguminosas comerciales aplicando una tecnología integral de inoculación y manejo se ha logrado fijaciones de 100 – 300 kg ha año<sup>-1</sup> de N y aumentos de 20 – 40 % en los rendimientos de materia seca.

El problema que abordamos es claro y de gran importancia para la agricultura cubana y puede ser de gran connotación para producciones agroecológicas, sostenibles así como para productores o sistemas de cultivos de bajos insumos.

Objetivo General:

Determinar cepas nativas de Rhizobium en leguminosas silvestres bajo condiciones de diferentes suelos para la conformación de un cepario.

Objetivos específicos.

1. Determinar la presencia de Rhizobium sp en las leguminosas silvestres bajo condiciones de estudio.
2. Aislar y describir los nódulos presentes en las diferentes especies de leguminosas silvestres.
3. Caracterizar las cepas de Rhizobium predeterminadas.

Problema Científico.

La necesidad de profundizar en investigaciones biológicas que permitan aplicar microorganismos del suelo en función del fortalecer cada vez más los estudios

encaminados a la fijación simbiótica de nitrógeno (N ) en leguminosas para la alimentación del Ganado teniendo en cuenta el déficit creciente y sostenido de fertilizantes minerales en pastos y forrajes en el país.

Hipótesis.

La determinación de cepas nativas *Rhizobium* sp en leguminosas promisorias en diferentes tipos de suelo de interés agroproductiva fortalecería las posibilidades de emplear este inoculante biológico para el mejoramiento de la fijación de nitrógeno al suelo.

# CAPITULO I.

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

### 1.1. Leguminosas en los sistemas agropecuarios.

El hombre con su acción diaria rompe el equilibrio de la naturaleza afectando la comunidad natural primaria de los seres vivos en sentido general. Por lo cual es necesario conocer mas sobre la composición y características del conjunto de plantas que forman parte del entorno. (Funes, F. 2003: )

¿Qué son las leguminosas?

A las plantas angiosperma con flores y semillas encerradas en un fruto cuya característica distintiva es tener legumbres, como fruto; es decir, vainas, las cuales se abren longitudinalmente en dos valvas, a lo largo de dos suturas, que les agrupa como miembro de la familia Leguminoseae término en latín que se traduce al español como Leguminosas.

¿Dónde viven las leguminosas y que tipos hay de ellas?

Habitán en zonas templadas, tropicales y áridas, en sabanas y algunas pocas especies incluso son acuáticas. Sin embargo son más numerosas en las zonas tropicales y subtropicales. Esta familia incluye tipos diversos como hierbas, arbustos, bejucos y árboles.

¿Qué tan diversas es la familia de las leguminosas?

La familia de las Leguminoseae comprende alrededor de 650 géneros y 18, 000 especies (Polhill 1981). Esta es una de las seis familias de angiosperma más diversas que existen. En México, después de las compuestas, las leguminosas constituyen la segunda familia mas grande de plantas fanerógamas. Resultando los estados más ricos en esta familia Oaxaca y Chiapas. Maria Eugenia Fraile, Maria Dolores García Suárez, Angélica Martínez Bernal, Rebeca Slomianski, 2007.

¿Qué beneficio pueden reportar las leguminosas?

Las leguminosas a pesar de conocer sus beneficios aún no están debidamente extendidas en áreas tropicales, excepto Australia. En Cuba antes del 59, su utilización fue muy escasa, al comienzo de los 60 hubo interés en su desarrollo. A partir de 1965 se

sembraron áreas de kudzú, terciopelo, gandul, alfalfa, glycine, de ellas quedaron pocas, unas se deterioraron y otras los ganaderos perdieron el interés. Desde 1975 se reorganizaron las investigaciones y se han obtenido importantes resultados, los productores han ganado confianza nuevamente (sobre todo en el sector privado) comenzando la siembra y explotación de áreas comerciales, se han comenzado a perfeccionar los resultados existentes, tanto en especie rastreras, como arbustivas, en sistemas silvopastoriles, y en los pedestales (Funes, F. 2003).

A partir de 1959 se inició en Cuba un programa de desarrollo de la ganadería bovina con el mejoramiento del potencial genético del rebaño y el aseguramiento de una alimentación adecuada basada en los pastos, la aplicación de nuevas técnicas de manejo en la explotación, la creación de instalaciones, el mantenimiento de la salud animal, a través de un adecuado servicio veterinario y el progreso de la industria láctea (Martínez, R.O. 2003).

En la década de 1970-1979 la investigación se caracterizó por utilizar sistemas intensivos de producción de altos insumos, pues el país disponía de combustible, riego, fertilizantes y concentrados de cereales importados, además se conducía un programa de transformación de la cubierta vegetal en las empresas con la siembra de gramíneas mejoradas y algunas leguminosas que constituían la base alimentaría, fundamental, ya fuera para pastoreo o forraje (Martínez, R.O. 2003).

La alimentación es el problema más difícil de resolver en los sistemas de producción con bajos insumos, donde los recursos materiales y financieros son deficitarios, lo cual impone como una necesidad el establecimiento de estrategias flexibles capaces de satisfacer los requerimientos de los animales. Por otra parte, el potencial de producción de leche de los pastos ha variado, notablemente, en los últimos años con la introducción de las nuevas variedades de gramíneas y leguminosas, al superar de 50 a 100 % la obtenida en los pastos naturales (Lamela, Cáceres, Pereira, Hernández, Senra, 1992; Senra, Muñoz, García-López, Ojeda, 1993, Senra, 2000). Cuando se pretende intensificar la producción de leche elevando la productividad por animal o por área, reduciendo el costo, es necesario buscar especies de mayor potencial forrajero y mejor valor nutritivo (Milton, Alvin, Deise, Ferreira, 2001).

Monzote *et al.* (2001) han encontrado que en sistemas mixtos agricultura – ganadería un uso más eficiente de los recursos disponibles para aprovechar las potencialidades

naturales que tienen los agroecosistemas de producir alimentos y fuentes de energía, los sistemas integrados animales/cultivos donde se incluyen leguminosas rastreras y arbóreas que tienen la capacidad de sustentarse y alcanzar niveles productivos superiores, incrementos en las producciones individuales y por hectáreas (Ruíz, R., Monzote, Marta., Funes – Monzote, F. 1997: pp 15 - 21).

Las asociaciones de gramíneas y leguminosas herbáceas, resultan una alternativa posible para sustituir los monocultivos, fundamentados en los altos rendimientos de materia seca y fibra bruta de las primeras y los contenidos de proteína bruta de las segundas, además de la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico a través del *Rhizobium* por estas últimas (Brotein, 1984 :p 15 ).

Una de las alternativas a utilizar en cultivos asociados incluye la tecnología de bancos de proteínas (Franco, M. 1998 y Ruiz, R. 1998 ). Consideramos bancos de proteínas a las siembras de áreas densas y compacta, con plantas de elevado contenido proteico generalmente leguminosas, que se someten a un pastoreo dirigido.

Lo más común es usar plantas perennes, bien sea rastrera como la *glycine (Neonotonia wightii)*, *centrosemas* o *teramnus* o arbóreas como la leucaena, aunque últimamente existe preferencia por los productores por los árboles o asociaciones con estos y leguminosas trepadoras. Los arboles, como indican Ruiz y Febles en 1999, sufre menos los efectos del pastoreo, al no afectarse por los animales con sus patas o con las deposición de las excretas y orina como ocurre con las especies rastreras (Simón, L., Oquendo, G. 2005)

## 1.2. Simbiosis *Rhizobium* – Leguminosas.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

En la zonas radicales hay diversas formas de interacciones, una muy importante es la simbiosis. En estas, sea con bacteria u hongo, se activa una mayor actividad fotosintética de la planta ya que el hongo y la bacteria requiere de energía para elaborar sustancias nutritivas y entregarlas a la planta.

La palabra simbiosis proviene de las palabras griegas *sym* (unido) y *bios* (vida). Simbiosis son asociaciones entre miembros de dos especies diferentes que viven en contacto

íntimo. Existe una variedad de relaciones simbióticas entre organismos. Una asociación simbiótica puede beneficiar a ambas especies involucradas, o puede beneficiar a un solo miembro, sin efecto o con efecto negativo en el otro.

Si ambos miembros se benefician la simbiosis es un *mutualismo*. Si solo un miembro se beneficia, mientras el otro no es afectado la relación se llama *comensalismo*. Si un miembro se beneficia mientras el otro es dañado (a veces incluso destruido), se habla entonces de *parasitismo*. Cualquiera de los tres tipos de simbiosis pueden ser *obligado* (necesario para la supervivencia de uno o ambos miembros) o *facultativo* (existiendo solo bajo ciertas condiciones).

*Mutualismo* es la relación que se pone de manifiesto entre miembros de dos especies, donde ambos se benefician. Por medio de esta relación ambas especies incrementan su supervivencia, crecimiento o reproducción. Las evidencias sugieren que esta relación es más de explotación mutua que de esfuerzo cooperativo entre individuos.

El mutualismo puede ser simbiótico o no simbiótico. En el *mutualismo simbiótico* los individuos coexisten y su relación es obligatoria. Al menos un miembro del par se vuelve totalmente dependiente del otro. También, de forma extrema los dos organismos que interactúan llegan a funcionar como un solo individuo. En el *mutualismo no simbiótico* los dos organismos no coexisten físicamente aunque depende el uno del otro para algunas funciones esenciales.

Las relaciones mutualistas están asociadas a una variedad de procesos vinculados a la adquisición de energía y nutrientes, protección y defensa, reproducción y dispersión.

El sistema digestivo de los herbívoros está habitado por una diversa comunidad de organismos mutualistas que juegan un papel crítico en la digestión de las partes de la planta ingeridas. Las cámaras del estómago de un rumiante contienen grandes poblaciones de bacterias y protozoos que levan a cabo el proceso de fermentación. Los habitantes del rumen son primariamente anaerobios, adaptados a este peculiar ambiente. Los ruminantes son quizás, los más estudiados pero no el único ejemplo del rol del mutualismo en la nutrición animal. Los estómagos de virtualmente todos los herbívoros mamíferos y de algunas especies de aves y reptiles tienen una flora microbiana para digerir la celulosa de los tejidos de las plantas.

Determinadas bacterias que viven en el suelo penetran por los pelos radiculares y forman nódulos debido al estímulo del metabolismo bacteriano. Estas bacterias aportan compuestos nitrogenados a las plantas y hacen posible su desarrollo aun en suelos pobres de nitrógeno.

Entre los distintos sistemas biológicos que son capaces de fijar dinitrógeno, la simbiosis Rhizobium-Leguminosas contribuye con la mayor cantidad de nitrógeno al ecosistema y a la producción de alimentos. Se calcula que la fijación de dinitrógeno por las plantas leguminosas alcanza 20% de la cantidad total fijada anualmente sobre el planeta. La simbiosis Rhizobium-leguminosas constituye la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y bacterias.

Los beneficios recíprocos de esta relación simbiótica se basan en la asociación de bacterias del género Rhizobium con la mayoría de las plantas leguminosas. Esta asociación resulta en la formación de un nuevo órgano, *el Nódulo*, que se localiza en las raíces de la planta. En este nódulo tiene lugar la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico.

El nitrógeno atmosférico llega a las plantas a través del suelo, donde es subsecuentemente reducido a amonio por la nitrogenasa de los bacteroides de Rhizobium. Este amonio se incorpora entonces a los esqueletos carbonados para producir aminoácidos y proteínas. Solo las leguminosas con nódulos fijadores de nitrógeno (con color rojizo) tienen esta enzima (Blondeau, .1981: ).

El *Rhizobium* es una bacteria no esporulante y son específicos para ciertos géneros de leguminosas. Se encuentran generalmente en el suelo y se multiplican en la rizosfera de la planta cuando germinan las semillas. Muy tempranamente penetran la raíz de la planta, a través de un mecanismo, no muy bien dilucidado, sea por invasión de pelos radicales o por heridas superficiales en la base de las raíces laterales. El examen microscópico muestra un hilo de infección que se ramifica entre las células corticales de la raíz, subsecuentemente estalla y libera bacterias en las células para formar el primordio del nódulo. Las células de la planta huésped se multiplican ocasionando también la multiplicación de los Rhizobium en cada una de las células hijas

La síntesis de amonio a partir de nitrógeno elemental e hidrógeno fue puesta en práctica como proceso industrial desde 1913 y se haya muy difundida en el mundo para la producción de fertilizantes nitrogenados. Esta reacción transcurre a alrededor de los 350° C y 350-1000 atmósferas de presión, es decir, en condiciones que requieren de un alto consumo de portadores energéticos.

El mismo proceso reductor del nitrógeno elemental es llevado a cabo por las bacterias a temperatura ambiente y presiones atmosféricas normales gracias al complejo enzimático que poseen, la nitrogenasa, cuya función es la activación de la molécula de nitrógeno y su posterior reducción.

Por ello, una importante alternativa para la solución de la falta de abonos nitrogenados, sobre todo en los países con economías limitadas, es el manejo de la actividad nitro fijadora de los microorganismos del suelo, de modo que pueda suplirse en alguna medida el suministro de fertilizantes nitrogenados a los cultivos. Las plantas no pueden utilizar el nitrógeno del aire para su nutrición, sino que lo toman cuando se encuentra en forma de ion amonio o nitrato. Sin embargo, ya desde la antigüedad se conocían los efectos beneficiosos del cultivo de leguminosas sobre los cultivos posteriormente plantados en los mismos suelos.

Los avances de la microbiología a fines del pasado siglo, posibilitaron que se describiera el fenómeno de la fijación del nitrógeno en las leguminosas como una asociación simbiótica entre la planta y cierta bacteria, que fue descrita en 1888 por Beijerinck como *Bacillus radicicola*, hoy conocido como género *Rhizobium*.

La fijación simbiótica del nitrógeno es la vía más productiva, por la cual el nitrógeno puede ser incorporado al suelo en proporciones que se han calculado entre 73 y 865 kg/ha/año. Se calcula que la fijación de nitrógeno atmosférico por las plantas leguminosas alcanza el 20 % de la cantidad total fijada anualmente sobre el planeta, con valores similares a los de la producción mundial de fertilizante nitrogenado.

Según datos de Cast (1976), la cantidad de nitrógeno fijada artificialmente (síntesis química), es sólo la mitad de la fijada por la vía natural; a pesar de ello, la fijación sintética del nitrógeno, tiene un gran peso en el impacto del nitrógeno en los diferentes ecosistemas agrícolas.

No todas las leguminosas pueden formar nódulos y por el contrario, otras que se conoce que son capaces de nodular, en ocasiones carecen de nódulos ya que en el suelo donde han crecido está ausente el otro miembro de la simbiosis, es decir, la especie de *Rhizobium* que provoca la formación de los mismos. Las bacterias del género *Rhizobium* son organismos Gram negativos, no esporógenos y pleomórficos. La célula joven tiene corrientemente forma de bastoncito con un máximo tamaño de 3 x 1 micrómetro; son mótils, con flagelación monótrica o perítrica.

Cuando la célula envejece pierde motilidad y acumula abundantes inclusiones lipídicas, que se colorean mal. Otra fase de su desarrollo parecen ser los llamados bacteroides, que pueden encontrarse en el interior de los nódulos radicales y carecen en absoluto de motilidad, con formas engrosadas de diversa morfología o ramificadas y mayor cantidad de volutina que la célula común de forma bacilar.

El hábitat del *Rhizobium* está distribuido parcialmente entre el suelo y la planta hospedera, siendo simbióticos en esta última y heterótrofos en aquel. Se sabe de casos en que se han encontrado bacterias nodulares en suelos después de 13-17 años de haber sido cultivadas las correspondientes especies de plantas leguminosas.

1.3. Fijación de nitrógeno atmosférico a través de los nódulos.

## **FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO**

Resulta paradójico que, habiendo una reserva inagotable de nitrógeno en la atmósfera, la disponibilidad de este elemento sea uno de los factores más importantes que limitan el crecimiento de las plantas y representa más del 70 % de los costos por fertilizantes en los países en desarrollo. Es que, tal y como se encuentra en la atmósfera en estado gaseoso  $N_2$  no puede ser aprovechado por los organismos superiores. La capacidad de las leguminosas eficientemente noduladas de tomar aquel elemento de la atmósfera, la independizan total o parcialmente de la absorción de nitrógeno edáfico, lo que les otorga importancia notable en el desarrollo de sistemas económicos de producción. La fijación biológica del nitrógeno en la naturaleza es una propiedad única que tienen unos pocos organismos provistos de información genética para la síntesis de una [enzima](#) llamada

Nitrogenasa. Ésta cataliza la conversión de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a amoníaco, a temperatura ambiente y presión atmosférica normal.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$  por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes (Sprent J. y Sprent P., 1990).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr J.P. *et al.*, 1998). Dichas bacterias comprenden organismos fototrofos, como bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cianobacteriae; organismos quimioautotrofos, como bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y organismos heterotrofos como las bacterias pertenecientes a la familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent J. y Sprent P., 1990). Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos. Son estas formas simbióticas, concretamente las establecidas entre las rizobiáceas y las leguminosas, las que antiguamente eran aprovechadas para la renovación de los suelos mediante la práctica de la rotación de cultivos; hoy en día sin embargo, desde la aparición de la “revolución verde” en agricultura, esta práctica se ha sustituido por la utilización de fertilizantes químicos a pesar del elevado coste energético y ambiental que supone. Para poder disminuir la dependencia a fertilizantes nitrogenados que está adquiriendo la agricultura mundial se han propuesto varias alternativas que abarcan desde la modificación genética de las plantas a la optimización y mejora de la fijación biológica de nitrógeno (Vance C.P. 2001).

Dentro de esta última opción el sistema rizobiáceas–leguminosas es el que ha sido estudiado ampliamente y en mayor profundidad. Ya en el siglo XVI Leonhard Fuchsius dibujó leguminosas noduladas (Fuchsius L., 1542) y en el siglo XVII, Malpighi observó nódulos en raíces de judía (*Phaseolus vulgaris*) y de haba (*Vicia faba*) (Malpighi M., 1675). No fue sin embargo hasta finales del siglo XIX cuando el botánico ruso Woronin detectó la presencia de bacterias en nódulos de lupino y alisos (Woronin M.S., 1866).

Unos años después Frank demostró que en suelos quemados no se producían nódulos (Frank B., 1879) y a continuación Hellriegel y Wilfarth, que son los investigadores reconocidos universalmente como descubridores de la fijación simbiótica, demostraron en varias leguminosas el requerimiento de una infección previa para la formación del nódulo (Hellriegel H. y Wilfarth H., 1888). Posteriormente Beijerinck corroboró la necesidad de una infección bacteriana para la formación del nódulo al infectar plantas de *Vicia faba* con cultivos puros procedentes de nódulos de dicha leguminosa (Beijerinck M.W., 1888). No obstante, no ha sido hasta en estos últimos 20 años cuando se ha empezado a comprender este sistema íntimamente si bien aún hay algunos puntos del proceso simbiótico que se desconocen.

Una de las incógnitas es la influencia de algunos nutrientes especialmente requeridos por el sistema en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis, así como en la organogénesis del nódulo. Concretamente se ha observado que la deficiencia de un micronutriente, el boro (B), afecta drásticamente a la nodulación llegando al punto de abortarla (Bolaños L. y col., 1994), aunque no se ha probado la causa última de tan drástico efecto. También se ha sugerido la existencia de una relación entre este micronutriente y un macronutriente como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). En este sentido se ha observado que la relación B- $\text{Ca}^{2+}$  es importante para el mantenimiento estructural de la pared celular (Kobayashi M. y col., 1999), y que juega un papel en el proceso de simbiosis en leguminosas (Carpena R.O. y col., 2000). Nuestras investigaciones van encaminadas precisamente a profundizar en el conocimiento de las consecuencias de la deficiencia del B en distintos pasos de la nodulación y analizar el papel que juega el  $\text{Ca}^{2+}$  durante dicha deficiencia, así como la relación existente entre ambos bioelementos a lo largo de todo el proceso de simbiosis. Un segundo objetivo de nuestra investigación en este campo es el estudio del papel de dicha relación B/Ca en condiciones de estrés salino, donde hemos encontrado cómo los suplementos de B y Ca recuperan la fijación simbiótica del nitrógeno, así como el desarrollo y la productividad de plantas noduladas de guisante, muy inhibidas en condiciones salinas.

## **FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS**

Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y

Bradyrhizobiaceae (Madigan M.T. y col. 2000). Dentro de estas familias sólo unos determinados géneros son capaces de efectuar el proceso de fijación de nitrógeno: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*. Con el fin de simplificar la lectura nos referiremos a todos estos géneros como *Rhizobium*.

A diferencia de las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*, las rizobiáceas no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por si mismas. Para llevar a cabo el proceso estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- 1) Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.
- 2) Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.
- 3) Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- 4) Diferenciación de la bacteria a forma especializada.

### **NODULACIÓN:**

La formación de los [nódulos](#) en las raíces de las leguminosas, es una de las etapas de la fundamental importancia en el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Existe una perfecta relación de simbiosis entre la planta (leguminosa) y las bacterias (del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*). Esta simbiosis consiste en que el *rhizobium* entrega a la planta nitrógeno en forma asimilable para la misma, y a su vez, la planta suministra las sustancias nutritivas que necesita el *Rhizobium* para cumplir sus funciones vitales.

En general, cada especie de leguminosa solo se relacionará con una determinada especie de Rhizobium. De allí que inoculantes elaborados para soja no producirán nodulación en alfalfas y tréboles. No obstante lo expresado, existen algunas excepciones, entre especies de rhizobium y especies de leguminosas, como es el caso de **Rhizobium Leguminosarum**, que nodula tanto en lenteja, como en arveja y vicia.

Los rizobios en el suelo apenas sobreviven a temperaturas superiores a 35°C por encima de la cual pierden totalmente la capacidad de infectar y fijar N<sub>2</sub>. La bacteria entra en la planta por intermedio de un pelo radicular, a través de un hilo de infección ( rápida multiplicación de los Rhizobium ) llega así a una célula interna de la raíz, se transforma en bacteroide y comienza su multiplicación. También es importante que, la cepa de Bradyrhizobium transporte la mayor cantidad de nitrógeno fijado bajo la forma de UREIDOS, lo cual se traduce en una redistribución eficiente hacia los órganos reproductivos, disminuyendo el aborto de flores y por lo tanto incrementando los rendimientos. La infección induce a la célula a multiplicarse y dividirse ( proceso de formación nodular ) y el resultado es un nódulo radical que es una espesa masa de células infectadas con los bacteroides, que es donde se producen los procesos de captación de nitrógeno del aire y su transformación en amoníaco, o sea la etapa de efectividad.

La efectividad se relaciona con la eficiencia de los procesos bioquímicos que ocurren en la producción de amoníaco, como compuesto fundamental incorporado a los compuestos orgánicos del torrente circulatorio de las leguminosas. En este proceso intervienen la enzima Nitrogenasa que cataliza la reacción química fundamental ( la transformación de nitrógeno atmosférico en amoníaco ). Para su máxima eficiencia debe trabajar a muy bajas tensiones de oxígeno, lo cual se logra a través de un pigmento conocido como Leghemoglobina, que actúa como un filtro de oxígeno. Esta leghemoglobina es la responsable del color rojo que se observa en el interior de los nódulos al hacer un corte.

## **TIPOS DE NODULOS.**

Los *nódulos indeterminados* se dan en plantas como las del género *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*. En este tipo de nódulos realiza la fijación de nitrógeno en la zona central.

Los *nódulo determinado* es inducido en plantas como las del género *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*, entre otras. A diferencia que en los indeterminados, en esta clase de

nódulos no hay un meristemo permanente. Así, su crecimiento se basa en la expansión en vez de en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica.

## CAPITULO II.

### Metodología de investigación.

El estudio da continuidad a los resultados del proyecto PRCT 1149 donde se realizó una prospección de leguminosa silvestres en la región central, colectándose 385 ecotipos, seleccionándose de acuerdo a criterios de adaptabilidad, uso, frecuencia de aparición 10 especies para el estudio y tres suelos de la provincia de Villa Clara.

Especies de leguminosas seleccionadas.

Nombre Vulgar	Nombre Científico.
1. Teramnus labiales cv semilla clara	<i>Teramnus labiales cv semilla clara</i>
2. Conchita azul	<i>Clitoria ternatea</i>
3. Teramnus uncinatum	<i>Teramnus uncinatum</i>
4. Centrosemas pubencens flor morada	<i>Centrosemas pubencens sp</i>
5. Glycine	<i>Neonotonia wightii</i>
6. Centrosema pubencens flor blanca	<i>Centrosema pubencens sp</i>
7. Kudzú	<i>Pueraria phaseoloides</i>
8. Centrosema plumieri	<i>Centrosema plumieri sp</i>
9. Siratro	<i>Macroptilium atropurpureum</i>
10. Canavalia	<i>Canavalia ensiformes sp</i>

#### Suelos 1. (Guinia)

Pardo grisáceo típico, corteza de granodionita, medianamente desaturado ( 40-70%) poco profundo (< 20 cm), medianamente humificado (2-4 %), poca pérdida del horizonte A (< 25 %), Loam arenoso, poca graviliosidad (2-15%), pedregoso (2-3%), fuertemente ondulado.

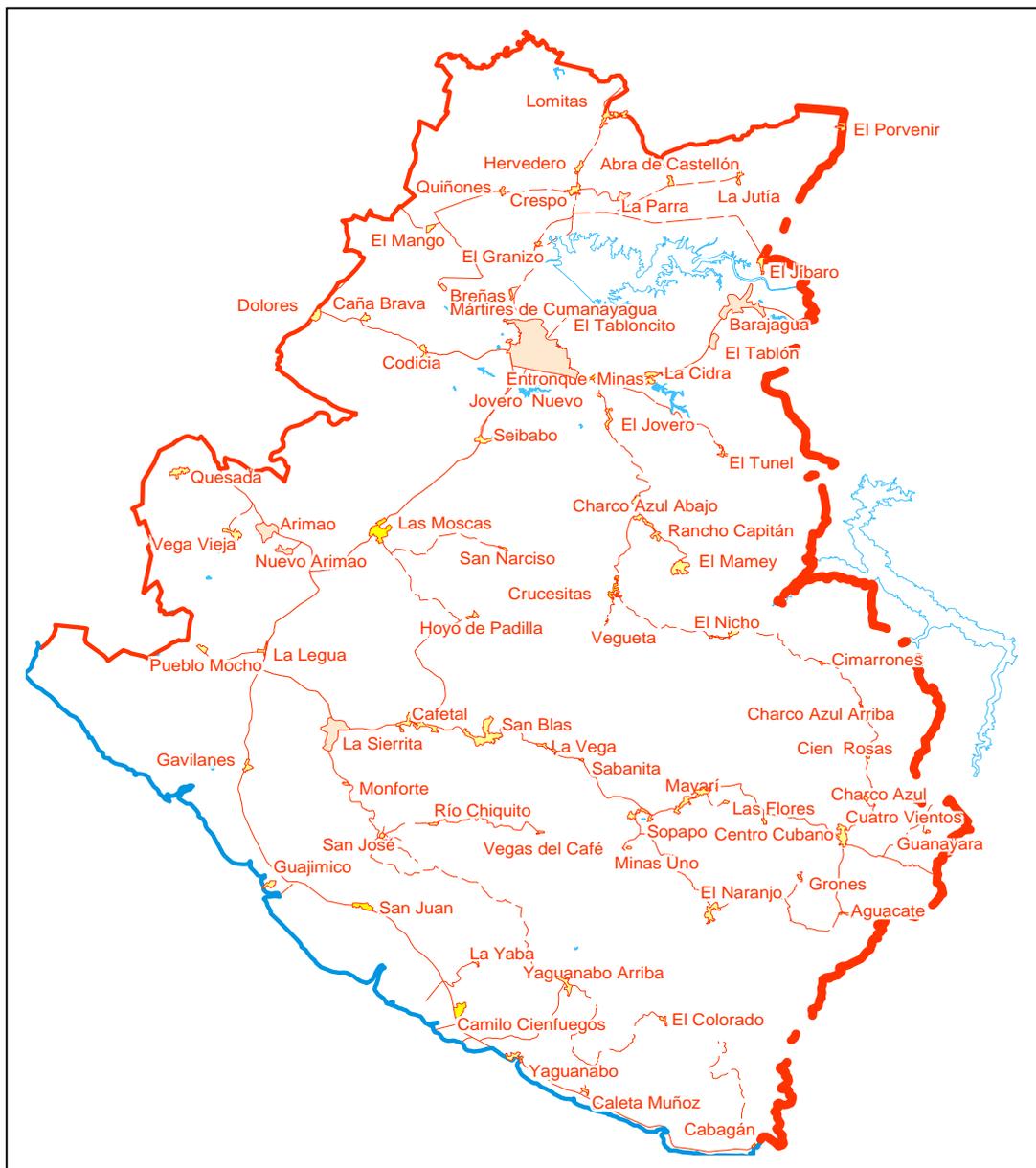
#### Suelo 2. Santa Clara (Laboratorio de Inseminación artificial).

Oscuro plástico no gleyzado, pardo oscuro, materiales transportados, carbonatado o no carbonatado saturado, muy profundo (>100cm), medianamente humificado (2-4%) arcilla Loam arcillosa, casi llano.

### Suelo 3. El Cocal (Autopista nacional)

Pardo sin carbonato Típico, roca ígnea intermedia, saturado (> 47%), profundo, (51-100 cm), medianamente humificado (2-4%), poca pérdida del horizonte A (<25%), Loam arcillosos, poca graviliosidad (<2%), ondulado.

El estudio se realizó durante 1 año en la localidad de Barajagua entre las coordenadas: Por las X 591 y 594 y por las Y 258 y 260; en el municipio de Cumanayagua, provincia de Cienfuegos. Cumanayagua se encuentra ubicada al norte de la provincia de Cienfuegos, limitando con los municipios de Cienfuegos por el sur, Cruces por el este, y por el oeste y con Manicaragua, Trinidad.



La investigación se realizó por etapas.

Primera Etapa.

Se colectaron los suelos de los lugares seleccionados en el mes de octubre.

En la estación Experimental de suelos Escambray se montó el experimento en la casa de cristal con condiciones semicontroladas en bolsas de polietileno para frutales. La siembra se realizó en el mes de Junio del 2011. Con un período de crecimiento y desarrollo de seis meses, donde se mantuvo la humedad necesaria mediante riego.

Etapa 2.

Durante la etapa de desarrollo y crecimiento (antes de la floración), como momento óptimo para la colecta de los nódulos se procedió de la siguiente forma, 1. Extracción del suelo de forma suave virando la bolsa, 2. Separación suelo /raíces, 3. Aislamiento y colecta de los nódulos.

Etapa 3.

### **Aislamiento.**

Para aislar *Rhizobium* de leguminosas nativas que se quieren cultivar utilizamos dos vías  
1. Directo del nódulo 2. El suelo más próximo a las raíces.

Para este caso utilizamos la primera vía.

El procedimiento de esta técnica es una adaptación a partir de las escritas y descritas por autores y normas que no la invalidan.

1. Los nódulos colectados se colocan en un crisol se lavan con agua corriente de forma suave durante 10 – 15 minutos, secándolo con papel de filtro.
2. Introducir los nódulos en solución antiséptica, preferiblemente agua oxigenada o hipoclorito de sodio 0.1%, durante 2 a 3 minutos.
3. Lavar los nódulos cuatro o cinco veces en agua estéril (durante dos o tres minutos).
4. Lavar los nódulos en alcohol al 70% durante tres minutos.

5. Lavar los nódulos cuatro o cinco veces en agua estéril, a partir de aquí se cambian las condiciones ambientales por controladas en el cuarto de siembra.
6. Se toman los nódulos se depositan en un placa de porcelana cóncava y utilizando un agitador de vidrio, pinza estéril (para manipular los nódulos ya esterilizados en el proceso antes descrito), se deposita 0.5 ml de agua estéril para ayudar en el triturado de los mismos.
7. Se comienza la siembra en medio FRED, la misma se realiza de dos formas profunda o superficial, en este caso elegimos la segunda. Se toma una asada con el asa para realizar una siembra en forma de zigzag alrededor de la placa o de un extremo a otro cubriendo toda la placa (también se puede pipetear 0.1 ml de la solución y verterla sobre la placa y con una espátula dispersarla por toda la superficie que no fue lo utilizado en este caso). Luego inocular y dar seguimiento hasta que crezca.

### **Colecta de muestras de suelo:**

#### **1. Colecta del nódulo.**

Se separaron cuidadosamente los nódulos de las raíces de las plantas y del suelo, luego se depositaron en placas petri previamente esterilizadas y se llevaron al laboratorio.

#### **1. Colecta de muestras de suelo:**

Para el aislamiento de microorganismos que viven libres en el suelo, como es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno de forma asociativa, de las solubilizadoras de fósforo y de las estimuladoras del crecimiento vegetal, se recogieron aproximadamente de 50 – 100 g de suelo a una profundidad entre 0 y 15 cm (altura que poseía la bolsa utilizada) de diferentes tratamientos. El suelo colectado fue de la zona próxima a las raíces (zona rizosférica), a un 50 % de la floración del cultivo.

La muestra de suelo se colocó en un frasco con tapa, previamente esterilizado y se lleva al laboratorio para aislar los microorganismos (cepas) y hacer las evaluaciones correspondientes. En el laboratorio la muestra de suelo se mezcla bien y se pone a secar al aire sin llegar a la desecación extrema.

## **Técnicas de conservación de estos nódulos con el fin de mantener viables las bacterias.**

Después de tener la colección representativa de la zona, se procede al proceso de aislamiento. Para este fin existen técnicas puestas a punto. Las bacterias del género *Rhizobium* no se desarrollan muy bien sobre los medios clásicos de cultivo a base de Peptona y azúcares comunes. De ahí que se realiza en un medio especial, a base de Manitol.

## **Tinción de Gram.**

Esta técnica rutinaria del laboratorio, permite separar las bacterias en dos grandes grupos Gram positiva y Gram negativa. Las bacterias del género *Rhizobium* son gram negativas. Pero esta prueba no es definitiva pues en el suelo hay un gran número de microorganismos que cumplen con esto. Pero al menos esta prueba consiste en un medio rápido para excluir contaminantes Gram positivo.

## **Determinación de la velocidad de crecimiento.**

El crecimiento de las bacterias del género *Rhizobium* en el Medio de YEM es relativamente lento. Las especies de crecimiento lento lo hacen siempre después de los 7 días, mientras que las de crecimiento rápido lo hacen después de los 3 días de sembradas

## **Sensibilidad a Bacteriofagos.**

La interacción entre bacterias y bacteriófagos dejan zonas decoloradas, en cultivos densos de *Rhizobium*. Esto permite establecer diferentes grados de sensibilidad ante determinados bacteriófagos, lo que permite un mejor acercamiento a la especie

## **Mediciones:**

1. Se determinó en primer lugar la presencia o no de nódulos.
2. Descripción de los nódulos.

- a) Forma
- b) Color.
- c) Tamaño.

### 3. Caracterización de las cepas.

#### Diseño Experimental.

Bloque al azar, con tres réplicas. (Fuentes Nordet, Felicita Elena., Abreus Heredia, E.E., Fernández Pérez E., Castellanos Soler, Magalys. 2007: pp 56-82 )

Variables en estudio fueron las cepas nativas, especies de leguminosas y los suelos.

El Análisis Estadístico: Paquete SPSS. Determinación de prueba de rango Múltiple de Duncan para un 95% de confiabilidad.

### CAPITULO III

#### Resultados y discusión.

- 3.1. Determinar la presencia de *Rhizobium* sp en las leguminosas silvestres bajo condiciones de estudio.

Tabla 1. Especies de leguminosas con presencia de nódulos en los suelos estudiados.

Especies	Suelo 1 (Guinia)	Suelo 2 (Sta Clara)	Suelo 3 (El cocal)
1. T. labiales cv semilla clara	X	X	X
2. Conchita azul	X	X	X
3. T. uncinatum	X	X	
4. C. pubescens flor morada	X	X	X
5. Glycine	X	X	
6. C. pubescens flor blanca	X	X	
7. Kudzú	X	X	
8. C. plumieri	X	X	X
9. Siratro			
10. Canavalia	X	X	

La tabla 1 muestra la presencia de nódulos en las leguminosas y suelos estudiados donde se puede observar que los suelo pardo grisáceo típico de la zona de guinia y Oscuro plástico no gleyzado de Santa Clara (en áreas del laboratorio de Inseminación artificial en la carretera de Camajuani), provincia de Villa Clara presentaron un comportamiento similar donde todas las leguminosas nodularon para un primer indicio de la presencia de cepa de *Rhizobium* en suelos. Mientras que el suelo Pardo grisáceo típico de la finca el cocal (autopista nacional) en la provincia de Villa Clara, su comportamiento es totalmente diferente solo tres especies de las que estaban presentes nodularon.

Dentro de las leguminosas el siratro (*Macroptilium atropurpureum* cv *siratro*) fue el de peor respuesta sin presencia de nódulo en ninguno de los tres suelos, aunque las plantas si germinaron y presentaron buen desarrollo. Demostrando que todos los suelos agrícolas no poseen las bacterias del género *Rhizobium* u otras simbióticas necesarias para promover un desarrollo adecuado en las leguminosas y algunas de estas plantas requieren socios específicos con esta bacteria para producir buenos resultados en cuanto a la fijación del nitrógeno. Es así, como cada leguminosa necesita su propia cepa específica de rhizobios para formar eficientemente nódulos de nitrógeno en sus raíces (stoddard, 1975).

### 3.2. Aislar y describir los nódulos presentes en las diferentes especies de leguminosas silvestres.

Los nódulos aislados presentaron cantidades, color, forma y tamaño.



Foto 1. Descripción de los nódulos conchita azul (*Clitoria ternatea*).

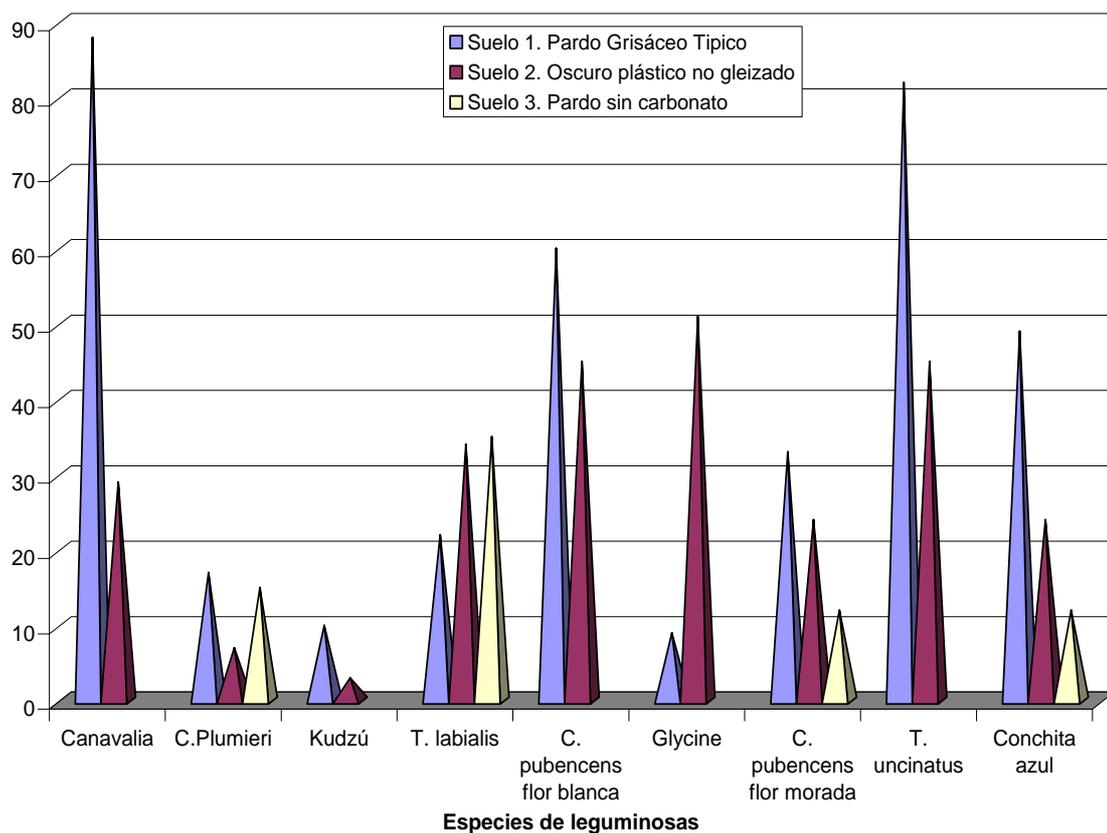


Foto 2. *Centrosema pubescens* flor blanca, presencia de nodulos y sus características morfológicas (45 nódulos/ plantas).

Dentro de los suelos el de mejor comportamiento fue el Pardo grisáceo típico (Guinia), con un número significativo de nódulos destacándose la canavalia y el *terannus uncinatus* y con peores resultados las especies kudzú (*Pueraria Phaseoloides*).

Los nódulos encontrados presentaron una forma redondeada y su coloración externa fue similar a la de la raíz, variando de café claro a café oscuro, con una superficie costrosa. Su coloración interna varió de un color rojo ladrillo, pasando por verde oscuro y blanco, los cuales se presentaron en gran cantidad. En cuanto al número de nódulos, en general registró valores de medio a alto en un rango mínimo promedio de 3 a 88 nódulos por raíz. El tamaño de los nódulos se encontró en un rango de medio alto (0.76mm a 1.16mm de diámetro) que oscilan entre 0.1 x 0.1 los más pequeños y 0.8 x 0.7 los de mayor tamaño representado por la conchita azul (*Clitoria ternatea*), con forma variada desde ovalada, esférica hasta irregular foto 1 y 2. Los nódulos se distribuyeron con mayor frecuencia en las raíces secundarias que en las primarias en proporción de 5:1, resultados similares a alcanzaron Pérez *et al*, 2010 en un estudio morfológico en *Terannus sp*

El decrecimiento significativo en la producción de nódulos en plantas de caupí como consecuencia de la deficiencia de P guardó relación con la alta concentración de fósforo que requiere los nódulos para su formación con el cambio en la distribución de masa de los diferentes órganos de la planta a favor del crecimiento radical y el sistema aéreo y en detrimento de los nódulos según estudios realizados por Gómez, (2003), esta pudo ser una de las causas en los resultados alcanzados por algunas especies, pues esta característica varía con las especies de plantas y cultivares

Irael, (1993) obtuvo en plantas deficientes en fósforo de leguminosas de granos en simbiosis con *Rhizobium*, provocó decrecimiento en la cantidad total de nitrógeno fijado del aire debido a la disminución en la producción de nódulos por plantas, pero sobre todo porque se afecta el funcionamiento de la nitrogenasa (Al Niemi *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2001), aunque los resultados en este último sentido son contradictorios y pudieran depender del genotipo (Vadez *et al.*, 1997, 1999).

### 3.3. Caracterizar las cepas de *Rhizobium* predeterminadas.

Para lograr un buen crecimiento en las colonias se sembró en tres placas de modo tal que en la tercera se pudo observar colonias aisladas con características de *Rhizobium*.

En la foto 3, se muestra que la dimensión de la cepa es variable más incidente fue la forma de la colonia y en la dimensión, se observa que el color de las colonias y el largo de las mismas son las características de la especie *Rhizobium*.

Las especies Kudzú (*Pueraria Phaseoloide*), *Terannus labiales* (*Terannus labialis*), fueron las especies que no crecieron en ningún suelo de los estudiados, mientras que la glycine (*N. Wightii*) y los centrosemas (*C. Pubencens*) presentaron un crecimiento rápido y con características típicas de los *Rhizobium* como resulta colonias con presencia mucosa, no se tiñeron es decir no absorbieron el color, redondas y con bordes lisos, apareciendo tanto en forma agrupada como aislada de esta última se tomo una muestra para la comprobación final.

Como resultado de la última prueba mas profunda y posible a realizar para las condiciones particulares del lugar donde se desarrolló la investigación, se pudo constatar que las especies que respondieron de forma positiva ante la primera prueba, cuando se le realizó la prueba de la tinción de gram respondieron de forma positiva.

Al observar en el microscopio se observaron como bastones cortos con coloración rosada. Resultados similares obtuvieron Pérez *et al*, 2010 en su estudio con el *terannus* donde los morfotipo 2 y 4 fueron los mejores y los que coinciden con los resultados de la presenta investigación, contiene células de formas bacilares alargadas con colonias de diámetro (>2mm) y color translúcido. El morfotipo 3 está integrado por células de formas esferoidales pequeñas (largo <1.5m y ancho 1m), al igual que sus colonias cuyos diámetros son <2mm y presentan un color blanco-crema. El morfotipo 4 está conformado por células de formas bacilares alargadas de gran longitud, la cual supera las 2m, con colonias de diámetro pequeño (<2mm) y color blanco.

González Peña, D. (2007) en su estudio con Conchita azul (*C. ternatea*) y Glycine (*N. Wightii*) aislando microorganismos proveniente de los nódulos radicales corroboran los resultados presentes no así con el Kudzú (*P. phaseoloide*) donde sus resultados son superiores.

## Conclusiones.

1. En los tres suelos estudiados existe presencia de *Rhizobium*, aunque no en todas las especies como sucedió con el siratro (*Macroptilium atropurpureum*), que no nódulo en ninguno.
2. Los nódulos presentaron forma variada que van desde redondeada, esféricas hasta irregular, donde los pequeños midieron 0.1 cm x 0.1 cm hasta los mas grandes de la Conchita azul (*Clitoria ternatea*) con 0.8 cm x 0.8 cm.
3. Las cepas identificadas son mucosas, redondeadas, con bordes lisos y se tiñeron de color rosado (en su apariencia visual), y al microscopio con apariencia de bastones cortos.

## Recomendaciones

- Continuar los estudios con las muestras de suelos.

## Bibliografía.

- Altieri, Miguel A. (1997). *Agroecología Bases científicas para una agricultura sustentable* (Primera Edición.). La Habana: Editorial CEAS-ISCAH.
- Dr., P. C. A., Grisales, O. Tatiana, & Fuentes, B. Julio. (2010). *Ciencia animal*. 1, 3, 62-67.
- Eugenia, F. M., García Suárez Maria Dolores, & Martínez Bernal Angelica. (2007). *Revista Agroecología y Desarrollo*, 1-12.
- Fuentes Nordet, Felicia E., E.E., A. H., Fernández Pérez, E., & Castellanos Soler, Magalys. (2007). *Experimentación agrícola*. La Habana: Félix Varela, La Habana.
- Funes - Monzote, F. (2000). *Integración ganadería –agricultura con bases agroecológicas*. DECAP.
- Funes, F. (2003.). Retos futuros. Curso Internacional Ganadería. Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente:
- Gómez Jorrín, Luis A. (2003). Identificación de genotipos de Caupí (*Vigna unguiculata*, Walp) con alta capacidad para fijar nitrógeno del aire a baja disponibilidad de fósforo.
- Gómez Jorrín, L. (2003). *Identificación de genotipos de caupí (Vigna unguiculata L, walp)*.
- Gómez Jorrín, L. (1996). I Taller Internacional del cultivo de la Vigna en el trópico
- González Peña, Dianevis. (2007). *II Simposio Internacional sobre ganadería Agroecológica*. La Habana: MINAG.
- Israel, D.W. (1993). Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology*.
- Stoddard, D. (1997). Fixatios in root nodule an indicator of N fixation efficiency in legumes.
- T.S., A., Kahn T.R, & Mc Dermott, T.R. (1998). *Plant and soil*, 198, 71-78.
- Ruíz, R., Monzote, Marta., Funes – Monzote, F. (1997). *Diplomado de alimentación para ganado en el trópico*.
- Vadez, V., D.P., B., Lasso, J.H., & Drevon, J.J. ( 1999.). Utilization of the acetylene

reductions a ssay to screen for tolerance of symbiotic N fixation limiting P nutrition in common Bean. *Physiol, plant.*

Variability of N fixation in common bean ( *Phaseolus vulgaris* L) under deficiency is related to use efficiency N fixation tolerance to P deficiency. *Euphytica*. (1997). 106, 231-242.