

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA



**FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA APLICADA**

**SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS
SIMBIÓTICAS, ASOCIADAS A *Leucaena leucocephala* WIT (LAM.), EN EL
VALLE DEL CESAR Y LA GUAJIRA.**

NANCY JACKELINE SÁNCHEZ SANDOVAL

**TESIS DE MAESTRÍA
BOGOTÁ, D. C. 2010**

Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas, asociadas a
Leucaena leucocephala Wit (Lam.), en el valle del Cesar y la Guajira

Nancy Jackeline Sánchez Sandoval

Tesis de Maestría

Maestría en Biología Aplicada

Facultad de Ciencias

Universidad Militar Nueva Granada

Bogotá, D. C. 2010

Notas sobre el autor

Nancy Jackeline Sánchez Sandoval

Magister en Biología Aplicada con énfasis en Biotecnología- Universidad Militar Nueva Granada

Candidata a Ph.D. Biología Vegetal-Universitat de València-Spain

Especialista en Planeación para la educación Ambiental-Universidad Santo Tomas de Aquino

Licenciada en Biología y Química-Universidad Francisco de Paula Santander

DEDICATORIA

*A mi querida hija **MARIANA**, por ser el motor que impulsa mi vida, quiero dedicarte este trabajo como tributo por todas esas horas que no estuvimos juntas, en las cuales había en mi corazón ansiedad por estar contigo.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Ruth Bonilla, por su dirección y apoyo incondicional durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Pedro Jiménez, su codirección y asesoría oportuna en los momentos difíciles del desarrollo de este estudio.

Al personal técnico y científico del Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB de Corpoica en C. I. Tibaitatá por su colaboración y apoyo.

A la Doctora Vera Lúcia Divan Baldani de EMBRAPA, por su asesoría y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Universidad Militar Nueva Granada, por darme la oportunidad de concluir mi maestría y por los conocimientos adquiridos.

A mi querida familia, mamá, Victoria, Tita, Mariajosé, gracias por sus palabras de aliento y estímulo durante la realización de este trabajo.

A mis queridas amigas Lina y Johana, por no permitirme desfallecer.

Finalmente a mi esposo, porque siempre fue mi ayuda, apoyo y fortaleza en cada momento del desarrollo de esta maestría.

RESUMEN

La actividad ganadera en Colombia necesita mejorar su productividad y competitividad; uno de los principales desafíos es obtener productos inócuos, desarrollados en sistemas de producción amigables con la naturaleza y en equidad social, requisitos importantes para la comercialización internacional de productos agropecuarios. En este escenario, es apremiante generar tecnologías sostenibles en términos ambientales, económicos y sociales. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar, identificar y seleccionar cepas promisorias nativas de bacterias fijadoras de nitrógeno, a partir de nódulos de raíces de *Leucaena leucocephala* ubicadas en los departamentos del Cesar y La Guajira, con el propósito de utilizarlas como biofertilizante para potenciar la producción y la calidad de los forrajes en sistemas ganaderos. A las cepas seleccionadas se determinó la fijación de nitrógeno por el método de Reducción de acetileno (ARA) y la producción de compuestos indólicos utilizando el reactivo de Salkowski modificado bajo análisis colorimétrico. El experimento de nodulación se desarrolló en fitotrón Sanyo, Versatile Environmental Test Chamber, simulando las condiciones ambientales predominantes en la región y se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con 17 tratamientos y 3 repeticiones; 60 días después de la siembra se evaluaron variables agronómicas. De los 52 aislamientos, se seleccionaron doce, siete provenientes del departamento de La Guajira y cinco del departamento del Cesar. Se obtuvieron dos cepas promisorias denominadas RC02 y RG02, las cuales presentaron altos valores en la prueba de reducción de acetileno, siendo en su orden de 18,56 y 16,25 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4$ nódulos planta⁻¹ h⁻¹ y valores de 47,9 μgml^{-1} y 43,49 μgml^{-1} , respectivamente, en la producción de compuestos indólicos. La caracterización molecular de las cepas promisorias, mediante secuenciación del 16S rRNA, permite concluir que las cepas RC02 y RGO2, corresponden a *Rhizobium* sp., y *Burkholderia* sp., respectivamente, siendo ésta última el primer reporte de este género, como rizobacteria nodulante de *Leucaena leucocephala* en Colombia.

PALABRAS CLAVE: diazotróficas, fijación biológica de nitrógeno, *Leucaena leucocephala*, *Rhizobium*, *Burkholderia*.

ABSTRACT

The livestock in Colombia needs to improve its productivity and competitiveness, one of the main challenges is to produce safe food production systems developed friendly nature and social equity, key requirements for international marketing of agricultural products. In this scenario, it is urgent to generate environmentally sustainable technologies, economic and social. This study aimed to isolate, identify and select promising strains of native bacteria fixing nitrogen from root nodules of *Leucaena leucocephala* in the departments of Cesar and La Guajira, in order to use as biofertilizers to boost production and quality of forages in livestock systems. A selected strains was determined nitrogen fixation by acetylene reduction method (ARA) and the production of indole compounds using modified Salkowski reagent in colorimetric analysis. The experiment was conducted in phytotron nodulation Sanyo Versatile Test Chamber, simulating the environmental conditions prevailing in the region and used a completely randomized design with 17 treatments and 3 replications; 60 days after sowing agronomic traits were evaluated. Of the 52 isolates, selected twelve, seven from the department of La Guajira and five of the department of Cesar. Yielded two promising strains RC02 and RG02 called, which showed high values in the acetylene reduction test, being in the order of 18.56 and 16.25 $\mu\text{M C}_2\text{H}_4$ nodules $\text{plant}^{-1} \text{h}^{-1}$ and values of 47.9 μgml^{-1} and 43.49 μgml^{-1} , respectively, in the production of indole compounds. Molecular characterization of promising strains by 16S rRNA sequencing to the conclusion that the strains RC02 and RGO2 correspond to *Rhizobium* sp., and *Burkholderia* sp., respectively, the latter being the first report of this kind, as nodulating of rhizobacteria *Leucaena leucocephala* in Colombia.

Keywords: diazotrophic, biological nitrogen fixation, *Leucaena leucocephala*, *Rhizobium*, *Burkholderia*.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 EL NITRÓGENO	5
3.2 ROL DE NITRÓGENO EN LAS PLANTAS	6
3.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	7
3.3.1 Organismos fijadores de nitrógeno	7
3.3.2 Complejo nitrogenasa	9
3.4 PROCESO DE NODULACIÓN	10
3.4.1 Quimiotaxis e infección	10
3.4.2 Formación de Nódulos	11
3.4.3 Ventajas de la Simbiosis	13
3.4.4 Factores que afectan la Simbiosis	13
3.5 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RHIZOBIUM	15
3.5.1 Familia <i>Rhizobiaceae</i>	15
3.5.2 Familia <i>Leguminosae</i>	19
3.5.2.1 <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) de Wit.	20
3.6 APLICACIÓN DE LAS BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS	22
3.6.1 La ganadería en Colombia	22
3.6.2 Los sistemas silvopastoriles	23
3.6.3 Biofertilizantes	24

4. MATERIALES Y METODOS	27
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	27
4.2 TOMA DE MUESTRAS	27
4.3 AISLAMIENTOS DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	27
4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS	28
4.4.1 Caracterización microscópica	28
4.4.2 Caracterización macroscópica	28
4.4.3 Caracterización bioquímica	29
4.5 PRUEBA DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	29
4.6 PRUEBA DE REDUCCIÓN DE ACETILENO	31
4.7 PRUEBA DE DETECCIÓN DE ÍNDOLES TOTALES	32
4.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS	33
4.8.1 Extracción de DNA	33
4.8.2 Amplificación de DNA	33
4.8.3 Purificación de DNA	34
4.8.4 Análisis bioinformático	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1 ÁREA DE ESTUDIO	35
5.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	35
5.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS	36
5.3.1 Caracterización Macroscópica y microscópica de los aislamientos	36
5.3.1.1 Cepas aisladas a partir de nódulos	36
5.3.2. Caracterización bioquímica	41
5.3.2.1 Aplicación test Api 20NE	41
5.4 PRUEBA DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	43

5.5 PRUEBA DE REDUCCIÓN DE ACETILENO	46
5.6 PRUEBA DE DETECCIÓN DE COMPUESTOS INDÓLICOS	48
5.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PROMISORIAS	50
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
AGRADECIMIENTOS	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	

TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Tratamientos evaluados en la prueba de nodulación	31
Tabla 2	Características físicas y químicas del suelo en las zonas de estudio	35
Tabla 3	Características fenotípicas de cepas aisladas y purificadas a partir de nódulos de raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> , en el departamento del Cesar.	37
Tabla 4	Características fenotípicas de cepas aisladas y purificadas desde nódulos obtenidos a partir de inóculos de nódulos desde raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> , en el departamento de la Guajira	37
Tabla 5	Pruebas bioquímica de los aislamientos obtenidos API 20NE	42
Tabla 6	Comparación de las secuencias de los aislados RG02 yRC02, con las reportadas en las bases de datos del NCBI	50

FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Aislados obtenidos a partir de nódulos obtenidos desde raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> en suelos del departamento del Cesar. A. cepa RC04. B: cepa RC01. C: cepa RC02. D: cepa RC03. E: cepa RC05. 36
Figura 2	Cepas aisladas a partir de nódulos obtenidos desde raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> en suelos del departamento de la Guajira. A. cepa RG05, B: RG06; C: RG07; D: RG01; E: RG02; F: RG03; G: RG04. 36
Figura 3	Cambio del pH del medio por parte de las colonias aisladas desde nódulos de <i>Leucaena leucocephala</i> en el departamento del Cesar. Cepas RC01-RC05. (Nótese cambio de color del medio) 38
Figura 4	Cambio del pH del medio por parte de las colonias aisladas desde nódulos de <i>Leucaena leucocephala</i> en Guajira. Cepas RG01-RG07. (Nótese cambio de color del medio). 38
Figura 5	Plantas noduladas obtenidas a partir de inóculos del departamento del Cesar (RC01-RC05). A. Raíz de una planta inoculada con la cepa RC04. B: Nódulos obtenidos desde el inóculo RC04. C: Planta inoculada con RC04, después de 90 días. 44
Figura 6	Nódulos obtenidos a partir de la cepa RC04 en una planta de <i>Leucaena leucocephala</i> 44
Figura 7	Representación de medias variable: longitud radical 45
Figura 8	Representación de medias variable: número de nódulos 46
Figura 9	Actividad de la enzima nitrogenasa, mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA) 47
Figura 10	Producción de compuestos indólicos 48

1. INTRODUCCIÓN

La baja productividad de la ganadería colombiana frente a la de otros países que tienen importante participación en el mercado internacional, es evidente según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, con indicadores promedio muy bajos: 0,55 animales/Ha, 50 % de natalidad, lactancias de 800 litros o menos/año. Esta poca eficiencia en el uso de los recursos se traduce en altos costos de producción y consecuentemente en rentabilidades marginales. Para competir a escala nacional e internacional, la ganadería colombiana debe transformarse y ajustarse a la tendencia universal para los productos agropecuarios los cuales deben atender la demanda creciente de productos de alta calidad nutricional, libres de patógenos y contaminantes pero además generados en sistemas de producción amigables con la naturaleza (Murgueitio *et al.*, 2007).

El sistema de producción bovina para carne y leche, es la actividad principal del sector agropecuario en la región Caribe de Colombia, donde el mayor recurso para alimentar los animales proviene de gramíneas nativas o introducidas que se caracterizan por ser de baja calidad y disponibilidad, principalmente durante el periodo seco. Este limitante conlleva al insuficiente consumo de nutrientes digestibles, desequilibrios en la fermentación ruminal y por lo tanto baja absorción de nutrientes a nivel del duodeno (Navas, 2007).

Teniendo en cuenta lo anterior, El Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana, PEGA 2019, elaborado por la Federación de Ganaderos de Colombia (Fedegan), reconoce que la actividad ganadera, tal como se ha realizado, genera impactos ambientales negativos en todo el país, conduciendo a la pérdida de fertilidad y la degradación del recurso suelo, además de la transformación de numerosas áreas de ecosistemas naturales, principalmente bosques de trópico bajo, bosques andinos, páramos y humedales, en zonas de cultivo o pastoreo.

Una forma de mitigar el impacto generado por este tipo de actividades es la implantación de los sistemas silvopastoriles, estos sistemas son aquellos compuestos por gramíneas rastreras o erectas, árboles y arbustos leguminosos o no, animales que se alimentan de los componentes y productos vegetales. Estos componentes al interactuar entre ellos y con los factores abióticos ejercen una acción positiva sobre el suelo, el clima y sobre los productos del sistema (Santana, 2007).

Otra alternativa que permitiría mejorar la actividad ganadera, es el uso de biofertilizantes, en los que la biota microbiana, aislada y seleccionada del medio natural, devuelva al suelo, a través de leguminosas forrajeras como *Leucaena leucocephala*, nutrientes esenciales como el nitrógeno (Espinoza *et al.*, 2004.) permitiendo al suelo mostrar una mejor calidad, en beneficio de pastos y forrajes, potenciando el desarrollo ganadero. En los últimos años ha crecido el interés por los microorganismos benéficos del suelo, dado que estos pueden promover el crecimiento de las plantas y evitar la infección por patógenos. Estos microorganismos pueden ser de vida libre o simbióticos, en el caso de los organismos de vida libre se asocian a las raíces de las plantas en la zona conocida como rizósfera y en el caso de los simbioses forman estructuras específicas. (Espinoza *et al.*, 2004.)

La interacción entre estos microorganismos y las plantas está dada por la liberación de compuestos orgánicos por exudación de la planta (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003) y por otro lado los microorganismos estimulan la exudación de la raíz a través de la liberación de variadas sustancias producto de su metabolismo (Lugtenberg *et al.*, 2002 en Peña & Reyes, 2007). El uso de estos microorganismos del suelo como una herramienta biotecnológica se ha llevado a cabo mediante la elaboración de biofertilizantes.

En consecuencia, la implementación de un biofertilizante en un sistema silvopastoril minimiza el uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis, lo que brinda un manejo amigable con la naturaleza, proporcionando además un valor agregado a la

producción láctea de la región, especialmente en lo relacionado con la obtención de leches limpias o ecológicas, creando condiciones favorables para ubicar este producto y sus derivados en los mercados externos (Bonilla & Murillo, 1992).

Lo mencionado anteriormente, es posible gracias a que es bien conocido que las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, se asocian simbióticamente con las raíces de la leguminosa *Leucaena leucocephala*, formando nódulos capaces de fijar nitrógeno (Wang *et al.*, 2002). La obtención de cepas bacterianas aisladas, seleccionadas y eficientes en la fijación de nitrógeno a partir de bacterias asociadas a *Leucaena leucocephala*, podría contribuir a la fertilización limpia y amigable con la naturaleza en el Caribe seco colombiano, especialmente en los departamentos del Cesar y la Guajira.

En este trabajo se reporta el aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas diazotróficas provenientes de plantas de *Leucaena leucocephala*, y la evaluación de su inoculación en la fijación biológica de nitrógeno, con el fin de evaluar en el futuro su utilización como biofertilizantes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir con la selección de rizobios nativos eficientes en la fijación biológica de nitrógeno, asociados a *Leucaena leucocephala*, en el valle del Cesar y la Guajira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar a partir de muestras de nódulos, cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas, asociadas a *Leucaena leucocephala*, en el Valle del Cesar y la Guajira.
2. Describir fenotípicamente los aislamientos de bacterias nativas diazotróficas simbióticas, asociadas a *Leucaena leucocephala*, en el Valle del Cesar y la Guajira.
3. Seleccionar y evaluar la eficiencia de las cepas aisladas de plantas de *Leucaena leucocephala*, para la fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas.
4. Identificar molecularmente las bacterias fijadoras de nitrógeno más promisorias para su futura utilización como bioinsumos de leguminosas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 EL NITRÓGENO.

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas y es requerido en adecuadas cantidades para la producción de cosechas óptimas. La porción de nitrógeno necesario, dependerá de las necesidades de producción que se deseen alcanzar así como del tipo de textura del suelo, su aplicación oscila entre 20 a 80 Kg/ha. (Infoagro, 1997). Para el caso concreto de la pradera, la cantidad de nitrógeno requerido dependerá de la carga ganadera que soporte, es decir para una carga ganadera de 2,5 unidades de cabezas de ganado mayor por hectárea (U.C.M/ha), debe recibir como mínimo entre 150 y 200 Kg N/ha a lo largo del año (Sánchez, 1998).

La reserva principal de este elemento está en la atmósfera, en donde se encuentra en forma de N_2 , pero esta molécula no puede ser utilizada por la mayoría de los seres vivos excepto algunas bacterias, que poseen la enzima nitrogenasa, las cuales juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento al fijar nitrógeno, convirtiendo el N_2 en formas inorgánicas (nitratos, amonio), asimilables por la planta (Santana, 2007). Se estima que se fijan en el suelo, unos 275 millones de Toneladas métricas (Tm) de N_2 /año. De ellas, 30 se fijan por causas naturales (descargas eléctricas de tormentas, erupciones volcánicas), 75 por fijación industrial y 175 por Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), bien por microorganismos fijadores de vida libre o por microorganismos simbióticos. (De Felipe *et al.*, 2006). Estudios han demostrado que el N que ingresa a las plantas proviene del suelo, y para ser absorbido, debe estar mineralizado, como nitrato NO_3^- y/o amonio NH_4^+ . Dado que se acumula principalmente en forma orgánica en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización del nitrógeno (MN), y así se presenta disponible para las plantas (Urzúa *et al.*, 2001).

El N disponible en los suelos cultivados es muy bajo y debe ser suministrado en forma de fertilizantes nitrogenados, que son sintetizados mediante el proceso de Haber-Bosch ($N_2 + 2H_2 \rightarrow 2NH_3$, 500°C y 350 atm). El uso de fertilizantes químicos nitrogenados en la agricultura, no suple la necesidad de nitrógeno y su producción tiene un alto costo económico y energético. Además, constituye un riesgo para el medio ambiente, en primer lugar, por la acumulación de nitratos en aguas superficiales y subterráneas que pueden llegar a ser una amenaza para la salud pública, y en segundo lugar, por la liberación de gases nitrogenados (N_2O , NO_x , NH_3) a la atmósfera, lo que contribuye al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida. Por tanto, la FBN representa una alternativa más económica y ecológicamente sostenible frente a la fertilización química (Urzúa, 2005).

3.2 ROL DEL NITRÓGENO EN LAS PLANTAS.

De los nutrientes minerales, el N es cuantitativamente el más importante para el crecimiento de las plantas y producción de la cosecha. La planta toma el nitrógeno del suelo en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) y es regulada por la química y la disponibilidad de éste elemento en el suelo (Rojas y Pérez, 2001 en Santana, 2007). Además el N tiene funciones fisiológicas en las plantas, como la osmorregulación y el balance catiónico y aniónico (Steingrover *et al.*, 1986). En general el NO_3^- se reduce a NH_4^+ y después este es asimilado en la glutamina y así subsecuentemente, el N puede llegar a activar el metabolismo de crecimiento de una planta. La nutrición con N influye en el crecimiento de la hoja, afectando el tamaño y/o la cantidad de carbohidratos, que a su vez está relacionada con la tasa de fotosíntesis de la planta (Santana, 2007). Entre otras funciones el N es componente esencial de los aminoácidos y los ácidos nucleicos, imprescindibles para la vida. Las leguminosas en simbiosis con las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, son capaces de tomar el nitrógeno directamente del aire, siendo éste transformado en amoníaco y luego en

amonio por bacterias que viven en simbiosis con la planta en sus raíces. El amonio es posteriormente utilizado por la planta para formar el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas que finalmente se incorporan a la cadena trófica (Paul y Clark, 1996 en Aita & Giacomini, 2003).

La transformación del N_2 a NH_3 corresponde a un proceso de reducción química. Para lograr este ambiente de reducción, la planta genera una hemina (proteína), denominada leghemoglobina, cuya función es proteger a la nitrogenasa del oxígeno indispensable para la respiración celular, pero no necesario en este proceso bioquímico. La actividad de la leghemoglobina se evidencia en la coloración rojiza que muestran los nódulos en corte transversal. Esta reacción es de alto consumo energético (16 ATP), sin embargo, la planta leguminosa logra un balance positivo por la enorme cantidad de nitrógeno fertilizante equivalente que produce (Urzúa, 2005).

3.3 LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

3.3.1 Organismos fijadores de nitrógeno. La vía más importante para la fijación de nitrógeno la constituye la Fijación Biológica, siendo altamente deseable la Fijación simbiótica (FS), ya que a partir de esta es posible obtener un importante suministro de nitrógeno para determinadas especies vegetales, las que en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Rhizobium*, obtienen este elemento a bajo costo (Olivares, 2004). Los microorganismos que realizan la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), convirtiendo el nitrógeno atmosférico en amoniaco, de manera libre o en asociación con plantas superiores, también son denominados diazotróficos (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación). Un diazótrofo es un organismo capaz de crecer sin fuentes externas de nitrógeno fijado (Postgate, 1998; Rodriguez *et al.*, 1984).

En general, las bacterias diazotróficas simbióticas pueden encontrarse en la estela radical y caulinar de especies de plantas Leguminosas y Gramíneas, donde además de

multiplicarse, pueden infectar las células radicales epidérmicas y corticales. Para casos donde las bacterias diazotróficas viven preferentemente en la superficie radical (rizoplano) y también dentro de espacios intercelulares de las células corticales de las plantas, se ha introducido el término asociaciones rizosféricas, no es clara la distinción entre bacterias diazotróficas asociativas de vida libre y las simbióticas. En contraste a la simbiosis donde la colaboración entre diferentes organismos (huésped, microorganismo) es mutuamente beneficiosa, en las asociaciones la relación es más casual y es más indirecta la transferencia de nitrógeno (Urzúa, 2005).

En cuanto a las plantas capaces de asociarse con bacterias aptas para realizar la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN), se cuentan las pertenecientes a la familia *Leguminosae* (leguminosas), que al igual que las demás plantas toman el nitrógeno mineral del suelo, pero, éstas además pueden obtener nitrógeno atmosférico (Twornlow, 2004 en Urzúa, 2005), para que esto ocurra es necesario que se encuentren en el suelo bacterias del género *Rhizobium*, que infectan y colonizan las raíces provocando estructuras conocidas como nódulos. En los nódulos ocurre la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2) en nitrógeno mineral (NH_3), por acción de la enzima nitrogenasa, presente en los bacteroides, nutriendo a la planta con el nitrógeno necesario para formar el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas que finalmente se incorporan a la cadena trófica. Este proceso se ha identificado como simbiosis *Rhizobium*-*Leguminosa* y es regulado genéticamente. (Olivares, 2004). Algunos de los genes indispensables en este proceso son los genes *nod*, *nif* y *fix*. (Nápoles *et al.*, 2007).

Las bacterias asociadas a las plantas que son capaces de colonizar sus raíces son llamadas Rhizobacterias y pueden ser clasificadas como benéficas, perjudiciales y grupos neutrales, sobre la base de su efecto en el crecimiento de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). Las rizobacterias benéficas que estimulan el crecimiento de las plantas son usualmente referidas como Promotoras de Crecimiento Vegetal o PGPR (Davison, 1988; Kloepper *et al.*, 1989), y se encuentran agrupadas incluyendo

diferentes especies de bacterias y cepas que pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, y *Pseudomonas* (Glick, 1995; Probanza *et al.*, 1996).

Las bacterias diazotróficas por su habilidad para convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio, el cual puede ser usado por la planta pertenecen a las PGPR. Debido a sus ventajas competitivas en un medio ambiente rico en carbono (C) y pobre en nitrógeno (N), los organismos diazotróficos pueden llegar a enriquecer en forma selectiva la rizosfera ubicándose en una buena posición para promover el crecimiento de la plantas. Aunque las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Azorhizobium*, son conocidas por su capacidad para fijar nitrógeno en una relación simbiótica con las raíces de las plantas leguminosas, ellas no son usualmente consideradas como PGPR, en esta específica interacción simbiótica. Sin embargo las *Rhizobiaceae* también tienen la habilidad para formar interacciones asociativas no específicas con raíces de otras plantas sin formación de nódulos (Reyes and Schmidt, 1979).

Las PGPRs, sintetizan compuestos como auxinas y otros parecidos a las giberelinas que aumentan la tasa de germinación de las semillas y el desarrollo de los pelos radiculares, los cuales permiten a la planta aumentar su capacidad de absorción (Hasan, 2002). La síntesis de reguladores de crecimiento, tales como auxinas y giberelinas es un factor importante en la fertilidad del suelo y debe ser considerado en la elaboración de biofertilizantes.

3.3.2 Complejo nitrogenasa. La enzima nitrogenasa es un complejo de dos proteínas, la dinitrogenasa, que contiene hierro (Fe) y Molibdeno (Mo), esta enzima es responsable de convertir o reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) en NH_4^+ , es sintetizada en el citosol por los bacteroides. (Somasegaran & Hoben, 1994) y la dinitrogenasa reductasa o proteína II que contiene únicamente Fe y cuya función es pasar electrones, uno a la vez, a la dinitrogenasa. Fuertes reductores no reducirán la

dinitrogenasa directamente, la mayor parte de la función se hace vía dinitrogenasa reductasa (Burris, 1991).

La acción de la nitrogenasa inicia con la transferencia de electrones desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa y requiere de la mediación de MgATP. La dinitrogenasa reductasa es reducida por la ferredoxina o la flavodoxina. Ésta une MgATP con lo que su potencial disminuye de 100 mV a alrededor de -400 mV. A este potencial pueden transferirse electrones a la dinitrogenasa. La transferencia está acompañada por la hidrólisis de MgATP a MgADP y Pi como el ADP es inhibitorio de la reacción, éste debe ser convertido nuevamente a ATP. Un electrón es transferido por cada 2MgATP hidrolizados. Dado que un simple electrón es inadecuado para llevar a cabo la reducción del N₂, el ciclo debe ser repetido hasta que la dinitrogenasa haya acumulado los electrones adecuados para la reducción. Como la reducción de N₂ está acompañado por una obligatoria reducción de 2H⁺ → H₂ la reacción completa es la siguiente: N₂ + 8H⁺ + 8e⁻ → 2NH₃ + H₂ (1). Al ser necesarios 2MgATP por cada electrón transferido, la reacción requiere un mínimo de 16MgATP bajo condiciones ideales. Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas los requerimientos están cercanos a los 20-30 MgATP. La hidrólisis de ATP acompaña la transferencia de electrones desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa, y está establecido que el clivaje de MgATP y la conversión a MgADP + Pi ocurre antes de la transferencia del electrón desde la dinitrogenasa reductasa a la dinitrogenasa en preparaciones de *K. pneumoniae* (Burris, 1991).

3.4 PROCESO DE NODULACIÓN

3.4.1 Quimiotáxis e Infección. La rizósfera es el medio donde las bacterias se multiplican y es en esta zona donde las raíces de las plantas liberan exudados como aminoácidos, azúcares y polisacáridos (Bonilla, *et al.*, 2002). Las bacterias detectan estas sustancias presentando quimiotáxis positiva o negativa. Algunos exudados de

las raíces de las leguminosas son conocidos como flavonoides, estas sustancias activan los genes encargados de la producción de factores de nodulación (*Nod*) en *Rhizobium*. Dentro de estas sustancias encontramos lipooligosacáridos (LOS) que generan una variedad de eventos en la planta como, encurvamiento del pelo radicular, división celular y secreción de inductores de genes *nod* adicionales e iniciación del hilo de infección (Klein *et al.*, 1988).

3.4.2 Formación de Nódulos. Dentro del proceso de formación de nódulos en las raíces de las plantas ocurren una serie de etapas en donde inicialmente se da un reconocimiento de la combinación adecuada o reconocimiento planta – bacteria por los exudados, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales. En segundo lugar ocurre la invasión del pelo radical y formación de un canal (o hilo) de infección, seguidamente el desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección. Posteriormente la diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo al que se le llama bacteroides, dentro de las células de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno y por último el proceso continuo de división de las células bacterianas y vegetales y formación del nódulo radical maduro (Brewin, 2004).

Las plantas leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios. Entre estos compuestos se encuentran flavonoides y en respuesta a ellos los *Rhizobium* activan una serie de genes implicados en la nodulación. El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la planta. En la superficie del rizobio se localiza una proteína específica de la adherencia, la ricadesina. Es una proteína que se une al calcio y puede actuar captando complejos de calcio en la superficie de los pelos radicales. Otras sustancias, como las lectinas, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de las células de rizobio. Después de la unión, los pelos radicales se

enroscan debido a la acción de sustancias específicas secretadas por la bacteria, que se conocen como factores *Nod*. (Brewin, 2004).

Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360 ° formando una estructura a la que se llama "cayado de pastor". La bacteria penetra entonces en el pelo radical e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radicales, y los factores *Nod* estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo. Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. (Brewin, 2004).

Los *Rhizobium* quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora llamada membrana peribacteroidal (MPB). A continuación hay una división continua y sincronizada de los *Rhizobium* rodeados de MPBs. Al cesar la división las bacterias se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas bacteroides. Estos quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos por la MPB. A estos grupos de bacteroides rodeados por la MPB se les llama simbiosomas. (Brewin, 2004).

Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan, y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia sino hasta que se han formado los bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Cuando el nódulo se deteriora las bacterias pasan al suelo. Las formas bacteroidales no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos *Rhizobium* en estado de latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del

nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo (Brewin, 2004).

3.4.3 Ventajas de la simbiosis. Entre las múltiples ventajas de esta simbiosis se destacan: 1. Abastecimiento de nitrógeno por parte de la planta, elevando considerablemente su contenido de proteínas. 2. Aporte de nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas (ej.: praderas asociadas compuestas por gramíneas y leguminosas). 3. Disponibilidad de nitrógeno en el suelo para el próximo cultivo en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el N. Otra posibilidad es el uso de abonos verdes donde se establece un cultivo de leguminosas con el único objetivo de incorporarlo al suelo para promover la mineralización de su N y suplir, así, las necesidades del cultivo en la siguiente rotación. 4. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales, e inclusive, seres humanos (Rodríguez, *et. al.*, 1984 en Urzúa, 2005).

A pesar de estas indiscutibles ventajas, los *Rhizobium* no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o, si se encuentran presentes, muchas veces son de baja efectividad. Existe entonces la posibilidad de introducir artificialmente estos microorganismos en el suelo a través de la práctica de la inoculación y favorecer así la simbiosis. Adicionalmente, cabe destacar que inocular las semillas de leguminosas tiene un bajo costo para el productor, con un valor promedio estimado en sólo un 5% sobre costo de la semilla (Urzúa, 2005).

3.4.4 Factores que afectan la Simbiosis. Dentro de los factores que afectan la simbiosis, se encuentran los factores físicos: Entre estos se cuentan la temperatura,

luz y humedad. La temperatura afecta de modo indirecto incidiendo sobre procesos metabólicos como la respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración. El ciclo de Calvin se cumple normalmente en las leguminosas a una temperatura promedio de 15-20 °C, cuando ésta temperatura se aumenta, la respiración se incrementa disminuyendo la disponibilidad de carbono para la simbiosis, afectando el crecimiento y sobrevivencia de la bacteria. Mientras que cuando la temperatura disminuye (menor 7 °C), la nodulación es poco probable, debido a la reducción del número de raíces laterales y pelos radicales. (Pérez y Torralba, 1997).

En cuanto a la luz, afecta la simbiosis a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Para obtener una máxima nodulación y óptima fijación de N₂, es necesaria una cierta cantidad de luz. En el caso de las leguminosas arbóreas, la luz es un factor limitante desde el punto de vista de su importancia en la tasa fotosintética de la planta, pues de la fotosíntesis provienen nutrientes para abastecer al nódulo (Sprenst, 1995).

Respecto a la humedad, la falta de oxígeno por exceso de agua puede ser una limitación para el crecimiento de *Rhizobium*, que es una bacteria micro-aeróbica. La corteza del nódulo de los rhizobios crea una barrera a la difusión de O₂, evitando la inactivación de la nitrogenasa que es sensible al oxígeno. En general la máxima actividad fijadora ocurre cuando el suelo está en condiciones de capacidad de campo (Drevon, 1995 en Santana 2007).

Factores químicos, entre los que se cuentan el pH y algunos minerales. El pH, puede afectar tanto a la bacteria como la formación de los nódulos. Afecta el crecimiento de la bacteria porque *Rhizobium*, crece normalmente en el rango de 6.5 y 7.2, según la especie aunque, algunas especies presentan tolerancia a la acidez como *Bradyrhizobium lupini* que pueden sobrevivir a pH 4 incluso a pH 3.5. Asimismo la acidez del suelo puede limitar el crecimiento de las comunidades de bacterias en la rizósfera y llegar a afectar la infección de la planta (Ledgard and Giller, 1995 en

Russelle, & Birr, 2004). La formación de nódulos se ve afectada porque hay etapas en el proceso de nodulación que son sensibles a la acidez donde ciertas enzimas bajan su actividad debido al pH no óptimo (Andrew and Johnson, 1976 en Schubert *et al.*, 1990).

La deficiencia o exceso de ciertos elementos minerales afectan directa o indirectamente la nodulación. Por ejemplo, el molibdeno es un constituyente de la nitrogenasa, así que una deficiencia de Mo en el medio causa un efecto directo y negativo en la fijación del nitrógeno. Sin embargo, el Fe (que también es un elemento constituyente de la nitrogenasa) no tiene un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno cuando este escasea en el medio. También son importantes otros elementos como calcio, fósforo, azufre, cobre o zinc ya que originan cambios en el pH que afectan directamente la fijación. Los fertilizantes químicos utilizados tratan de influenciar un mayor crecimiento de la planta y una mayor fijación del nitrógeno (Gibson, 1971).

3.5 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RHIZOBIUM

3.5.1 Familia *Rhizobiaceae*. Son diversos los géneros bacterianos que participan en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, estos forman nódulos en las raíces y ocasionalmente en los tallos de muchas leguminosas. En las últimas dos décadas la clasificación de los rizobios se ha desarrollado rápidamente, por la aplicación de taxonomía polifásica y por la investigación continua, hasta la fecha se han descrito 31 especies dentro de seis géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium* (Wei *et al.*, 2002).

La familia *Rhizobiaceae*, son bacterias pertenecientes a la División *Proteobacteria*, presentan forma de bacilos, su pared celular contiene un bajo porcentaje de peptidoglucanos, característica que las incluye en el grupo de las bacterias Gram negativas, carecen de esporas, son aerobias y su tamaño oscila entre 0.5 a 0.9 x 1.2 a

3µm (Somasegaran & Hoben, 1994). La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos mucilaginosos extracelulares que van desde una goma acuosa a altamente densa, cuya composición varía con la cepa. En el interior de los nódulos los *Rhizobios* sufren un cambio morfológico formando los bacteroides. Estas células son agrandadas, vacuoladas y en algunos casos claramente ramificadas, carecen de flagelos y quizá no son capaces de reproducirse. Los bacteroides están encerrados en membranas de origen de la planta huésped, a veces aislados y a veces en grupo, dependiendo de la especie. Al final de la vida activa del nódulo los bacteroides se desintegran. (Santana, 2007).

El Género *Allorhizobium*, contiene solo una especie, *A. undicola*. Cuyas características son: bacilos Gram negativos de 0.5-0.7 µm de ancho × 2.0-4.0 µm de largo, forman colonias de 0.5-3.0 mm de diámetro después de 1-2 días de incubación en medio de cultivo compuesto por extracto de levadura, manitol y agar (LMA). *A. undicola*, rizobio de rápido crecimiento que produce ácido y polisacáridos extracelulares en LMA. Presenta movimiento en medio líquido. Originalmente aislado de los nódulos de la raíz de una planta acuática, *Neptunia natans*, que crece en África. Invade las raíces debido al daño causado por la germinación de raíces nuevas y forma nódulos en la base de las raíces laterales y adventicias. Esta bacteria nodula *Medicago sativa*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis*, *Lotus arabicus*, y *Faidherbia albida*. *A. undicola* forma una rama larga más cercana a las especies de *Agrobacterium* en el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias de genes de 16S rRNA. Por eso, se sugirió combinar este género en *Rhizobium*, juntos con las especies de *Agrobacterium* (De Lajudie *et al.*, 1998).

El género *Azorhizobium*, bacilos de 0.5-0.6 × 1.5-2.5 µm. Con movimiento en medio semisólido, presentan flagelos peritricos y en medio líquido con flagelo lateral. Las colonias son circulares translúcidas, gomosas y tienen un color cremoso. Crece tan rápido como *Rhizobium* (las colonias miden más de 2 mm de diámetro después de 2 días de incubación), pero produce álcali como *Bradyrhizobium* en LMA. Crece mejor con ácidos orgánicos como fuente de carbono que usando carbohidratos (excepto

glucosa). Fija N₂ en vida libre bajo condiciones microaeróbicas y en simbiosis. Hay una sola especie descrita en este género, *A. caulinodans*. Esta bacteria fue aislada de nódulos de los tallos de *Sesbania rostrata* que crece en Senegal. También puede formar nódulos en las raíces de la planta huésped. La especie *A. caulinodans* tiene muchas características que la diferencian de otros grupos rizobianos. La capacidad de nodular los tallos de *Sesbania* y de fijar nitrógeno tanto en vida libre como en condiciones simbióticas son características únicas de esta especie (Dreyfus *et al.*, 1988).

En cuanto al género *Bradyrhizobium*, son bacilos de 0.5-0.9 a 1.2-3.0 µm. Se mueven con un flagelo polar o subpolar. Este género consiste de cepas de lento crecimiento, productoras de álcali. Las colonias son circulares, rara vez translúcidas, blancas y convexas con un diámetro menor a 1 mm después de 5-7 días de incubación. Han sido descritas cuatro especies dentro este género con base en el análisis polifásico incluyendo caracterización fenotípica, hibridación de DNA-DNA, polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de genes de 16S rRNA amplificados por PCR, nodulación con plantas selectivas, etc. Excepto *B. yuanmingense*, otras tres especies en este género, *B. japonicum* (especie tipo), *B. elkanii* y *B. liaoningense* pueden nodular a la soya (*Glycine max*). *B. yuanmingense* nodula a *Lespedeza cuneata*, pero no a la soya (Yao *et al.*, 2002). *B. japonicum* tiene un amplio rango de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas. Algunas cepas fijan nitrógeno en vida libre bajo ciertas circunstancias (Young *et al.*, 2001).

Género *Mesorhizobium*. Las bacterias de este género son bacilos que miden 0.4-0.9 × 1.2-3.0 µm. Son pleomórficos, en condiciones adversas de crecimiento, (alta concentración de sales y en los nódulos). Se han reportado flagelos peritricos o un flagelo polar o subpolar. Las colonias en LMA son circulares, convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas, miden 2-4 mm de diámetro después de 5 días de incubación a 28 °C de algunas especies o menos de 1 mm después de 7 días de

incubación de otras. Son bacterias quimio-organotróficas que usan como fuente de carbono y energía muchos carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos. No utilizan ni celulosa ni almidón. Todas las cepas producen ácido en LMA. Forman nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de diferentes plantas leguminosas de regiones templadas, subtropicales y tropicales. Se separó a este género de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* debido a su posición filogenética única, su crecimiento lento o moderado y su producción de ácido. Hay ocho especies en este género: *M. loti* (especietipo), *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. mediterraneum*, *M. plurifarum* y *M. tianshanense* (Jarvis *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; De Lajudie *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

Las bacterias del género *Rhizobium*, son bacilos que miden $0.5-1.0 \times 1.3-3.0 \mu\text{m}$. Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en LMA. El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de polisacárido extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género son bacterias de rápido crecimiento productoras de ácido en LMA. Hay 13 especies definidas: *R. leguminosarum* (especie tipo), *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. loessense*, *R. mongolense*, *R. sullae*, *R. tropici* y *R. yanglingense*. (Frank, 1889 en Young *et al.*, 2001).

Género *Sinorhizobium*. Son bacilos que miden $0.5-1.0 \times 1.2-3.0 \mu\text{m}$. El nombre genérico *Sinorhizobium* fue propuesto por primera vez para designar a las bacterias de rápido crecimiento aisladas en China que nodulan a la soya. Posteriormente se separó este género de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las

secuencias de genes de 16S rRNA, sin embargo no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan estos dos géneros. Las especies en este género crecen rápidamente y producen ácido en medio LMA. Se han identificado tres copias del gen ribosomal en ellas. Plásmidos grandes y megaplásmidos (> 1000 kbp) son comunes en estas especies y los genes simbióticos están localizados en esos plásmidos. La especie tipo, *S. meliloti*, fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente (Chen *et al.*, 1988; De Lajudie *et al.*, 1994; Rome *et al.*, 1996).

3.5.2. Familia Leguminosae. Las plantas pertenecientes a esta familia tienen la habilidad para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios. La familia *Leguminosae* comprende tres subfamilias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae*, cada una de las cuales contiene géneros aptos para formar nódulos en las raíces. En estas tres subfamilias, el porcentaje de especies noduladas varía. Hay unos pocos géneros no nodulantes en las subfamilias avanzadas *Papilionoideae* y *Mimosoideae*, pero la subfamilia menos especializada *Caesalpinioideae* incluye muchos géneros no nodulantes. *Caesalpinioideae* es la subfamilia más primitiva de los *Fabales*, se asume que la simbiosis fue desarrollada en un estado relativamente tardío durante la evolución de las leguminosas. Esto se afirma porque varias especies de *Parasponia* de la familia *Ulmaceae* forman nódulos que fijan nitrógeno como las leguminosas (Cook *et al.*, 2005).

Las plantas leguminosas son muy diversas en morfología, hábitat y ecología, se encuentran desde plantas anuales árticas a árboles tropicales. Debido al gran número de leguminosas que son noduladas por rizobios, la simbiosis con rizobios no es aparentemente una adaptación a un nicho ecológico especializado sino que depende de alguna peculiaridad genética de las leguminosas, una que es tan compleja que raramente ha cubierto a cualquier otra planta del reino (Cook *et al.*, 2005).

3.5.2.1 *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Entre los nombres vulgares con los cuales se designa a esta planta se encuentran: Leucaena, Tantan, Iguaque, Güaje (en México), Huaxín (en la América Central), Zarcilla (Puerto Rico), entre otros. Esta planta pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Mimosoideae*. Leucaena se usa para una variedad de propósitos, incluyendo madera, leña, forraje y abono orgánico. Originalmente la *Leucaena* existió en las tierras medias de Guatemala, Honduras, El Salvador y el sur de México, su ubicación se extiende desde la latitud 12° a la 20° N. Sus variedades fueron diseminadas por las civilizaciones pre-colombinas desde el norte de México hasta Nicaragua, hoy en día la *Leucaena leucocephala* se cultiva entre las latitudes 25° N. y 25° S. (Parrota, 1992).

De forma natural *Leucaena leucocephala*, se encuentra a la orilla de los caminos, en pastizales abandonados y en bosques secundarios en etapa temprana en regiones costeras secas, se considera a veces como una “mala hierba” debido a su capacidad de colonizar rápidamente y su tendencia a formar matorrales densos en sitios perturbados (Somasegaran & Martin, 1986).

El clima más propicio es aquel con una precipitación anual entre 600 y 2000 mm, con una temporada seca de 2 a 6 meses, esta planta es tolerante a la sequía, aunque las temporadas secas prolongadas reducen grandemente la productividad. Tolera regímenes de temperatura con un amplio espectro. El mejor crecimiento ocurre en áreas con una temperatura anual promedio de entre 25 y 30 °C, puede, además, sobrevivir las heladas ligeras de corta duración, pero su crecimiento se ve severamente restringido en temperaturas bajas. Además soporta una gran variedad de condiciones de suelo, desde pedregosos hasta arcillas densas. El mejor crecimiento ocurre en suelos bien drenados que son de moderadamente alcalinos (pH de 7.5) hasta ligeramente ácidos (pH de 6.0). El fósforo disponible en el suelo a niveles adecuados parece ser esencial para el desarrollo radical vigoroso; la disponibilidad reducida del fósforo a un pH del suelo bajo puede limitar el crecimiento. En cuanto a la altitud,

Leucaena leucocephala, es una especie de tierras bajas, que por lo general crece en altitudes entre 100 y 1,500 m (Espinoza y Gil, 1999 en Espinoza *et al.*, 2007).

Entre sus características morfológicas se observa que es un árbol o arbusto caducifolio o perennifolio, que alcanza de tres a seis metros de altura incluso doce metros con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm. La copa es redondeada y ligeramente abierta. Tiene hojas alternas, bipinnadas, de 9 a 25 cm de largo, verde grisáceas y glabras; folíolos de 11 a 24 pares, de 8 a 15mm de largo, elípticos y algo oblicuos. El tronco es usualmente torcido y se bifurca a diferentes alturas, con ramas cilíndricas ascendentes, desarrollando muchas ramas finas cuando crece aislado. La corteza es externa lisa a ligeramente fisurada, gris negruzca, con abundantes lenticelas longitudinales protuberantes. Interna de color crema-amarillento, fibrosa, amarga, con olor a ajo. Grosor total: 3 a 4 mm. La flor es en forma de cabezuelas, con 100 a 180 flores blancas, de 1.2 a 2.5 cm de diámetro; flor de 4.1 a 5.3 mm de largo; pétalos libres; cáliz de 2.3 a 3.1 mm. El fruto se ve como vainas oblongas, estipitadas, en capítulos florales de 30 o más vainas, de 11 a 25 cm de largo por 1.2 a 2.3 cm de ancho, verdes cuando tiernas y cafés cuando maduras; conteniendo de 15 a 30 semillas. Las semillas son ligeramente elípticas de 0.5 a 1 cm de largo por 3 a 6 mm de ancho, aplanadas, color café brillante, dispuestas transversalmente en la vaina. La semilla está cubierta por una cera que retarda la absorción de agua durante la germinación, la raíz es profunda y extendida; la raíz primaria penetra en las capas profundas del suelo y aprovecha el agua y los minerales por debajo de la zona a la que llegan las raíces de muchas plantas agrícolas. *Leucaena leucocephala* es una planta hermafrodita (Cook *et al.*, 2005).

En cuanto a su raíz es pivotante muy bien desarrollada y profunda y, por lo general, un sistema radical lateral de distribución amplia, aunque escaso. En los suelos fértiles y bien drenados, las raíces laterales crecen agudamente hacia abajo. Las raíces finas se encuentran a menudo concentradas en los horizontes superficiales, cerca de la base del tallo. Las raíces laterales horizontales y pequeñas en las capas de suelo aireado

superficial forman asociaciones simbióticas con facilidad con las bacterias fijadoras de nitrógeno de *Rhizobiaceae*. Las tasas de fijación anual de nitrógeno en la *Leucaena* han sido calculadas tan altas como de 110 kg por ha bajo condiciones de campo. La nodulación parece ser influenciada grandemente por la reacción del suelo y es pobre a unos valores de pH de menos de 5.5 (Parrota, 1992).

3.6 APLICACIÓN DE LAS BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS

3.6.1 La ganadería en Colombia. En Colombia, el renglón pecuario ocupa aproximadamente el 75% de la superficie total agropecuaria, dedicándose mayormente a producción de pastos para ganado bovino, manejado en un 70% bajo sistemas de producción intensivos. La región Caribe colombiana posee 3.3 millones de hectáreas en pastos y una población bovina de 6.9 millones de bovinos, que generan el 38.7% de la leche y el 38% de la carne que produce el país (Cuesta, 2005). En la actualidad, los departamentos del Cesar y la Guajira, se destacan como los principales departamentos ganaderos de la Costa Caribe, con un hato cercano a 1.5 millones de cabezas, las cuales representan casi el 6% del hato colombiano y el 20% de la región. (Gamarra, 2005).

Colombia se encuentra en el tercer lugar como productora de leche en Suramérica y vigésimo segundo a nivel mundial, sin embargo, la carne y la leche son productos muy importantes dentro del Tratado de Libre Comercio (TLC) con los Estados Unidos y la Unión Europea, por lo tanto es necesario aumentar la producción para poder competir, teniendo en cuenta además que las posibilidades se limitan por la colocación en el mercado de derivados como la leche en polvo en la cual Colombia es un modesto productor, comparado con países como Australia o Nueva Zelanda los cuales producen aproximadamente 30 y 70 veces más, respectivamente. En los departamentos del Cesar y la Guajira la situación es grave si se tiene en cuenta que la producción se encuentra por debajo del promedio nacional con una tasa promedio de 2.91 litros/vaca/día (FEDEGAN, 2004).

Se ha considerado que el 90% de los suelos utilizados en la actividad agropecuaria de la región Caribe han sufrido diversos niveles de deterioro físico, químico y biológico, afectando severamente su capacidad productiva y comprometiendo a mediano y largo plazo la viabilidad económica de los sistemas ganaderos. Esto debido a factores como la fertilización de síntesis química, la disminución en la biodiversidad ocasionada por la intervención de tipo industrial y el daño, en general, a la integridad de los ecosistemas suelo, agua y aire (Bonilla & Murillo, 1992).

Con el ánimo tanto de aumentar la productividad de la ganadería y así mismo contribuir a la preservación del ambiente, la utilización de otros sistemas productivos se está haciendo más relevante. Tal es el caso de los sistemas productivos tipo silvopastoril.

3.6.2 Los sistemas silvopastoriles. Un sistema silvopastoril se define como un sistema de producción pecuaria en donde las plantas leñosas perennes, árboles o arbustos interactúan con los componentes convencionales, forrajeras herbáceas y animales, bajo un sistema de manejo integral, lo cual puede ser visto como una alternativa sostenible que permite reducir el impacto ambiental de los sistemas tradicionales de producción (Mahecha, 2002).

El silvopastoreo, es un sistema de producción que beneficia al medio ambiente, y a los productores debido a que su implementación trae a futuro, un aumento en la productividad agropecuaria de la zona donde se implemente. Entre los beneficios que conlleva la adopción de este sistema, están el aumento en la fertilidad del suelo, el mejoramiento de sus características físico-químicas, el aumento en el ciclaje de nutrientes, la recuperación de la biodiversidad, la fijación biológica de nitrógeno, el aumento del área de absorción de las raíces, la acción de la micro y macrofauna en el equilibrio biológico y el control de la erosión (Mahecha, 2002).

Los sistemas silvopastoriles más estudiados y de los que existen mayor número de reportes han sido los asociados con árboles ó arbustos leguminosos, en donde se da un mayor número de interacción entre los componentes. Entre las especies arbustivas investigadas en Colombia, consideradas como potenciales por su alto valor nutritivo o servicios multipropósito dentro de los sistemas silvopastoriles se encuentran: Leucaena (*Leucaena leucocephala*), Acacia (*Acacia* sp.), Nacedero (*Trichantera gigantea*), Poró (*Erythrina poeppigiana*), Algarrobo (*Prosopis juliflora*), Chachafruto (*Eythrina edulis*), Pízamo (*Erythrina fusca*), Guácimo (*Guazuma ulmifolia*), Matarratón (*Gliricidia sepium*), Orejero (*Enterolobium cyclocarpum*), Flor amarillo (*Cassia spectabilis*), y Botón de oro (*Tithonia diversifolia*), entre otros (Mahecha, 2002).

3.6.3 Biofertilizantes. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal generalmente son usadas en la elaboración de biofertilizantes, las cuales tienen la capacidad de estimular el crecimiento y productividad de las plantas (Bashan, 1998). Desde años anteriores, la simbiosis Rhizobium-leguminosa ha sido utilizada como una alternativa para mejorar el rendimiento de los cultivos, disminuir los costos de producción y ser amigables con el ambiente, considerándose este proceso simbiótico como la forma más eficiente de fijar nitrógeno atmosférico. Existen estudios como el realizado por Pazos *et al.*, 2000, en el que se reemplazo totalmente la fertilización química de nitrógeno por la fijación biológica de nitrógeno en soya con óptimos resultados. De otro lado en forraje para ganado se encontró que entre el 75 a 97% de nitrógeno se asimila por la fijación simbiótica (De Oliveira *et al.*, 1999).

De otro lado un reciente estudio elaborado por Rivera-Cruz *et al.*, (2010), reportó la estimulación del crecimiento de *Citrus aurantium* bajo condiciones de invernadero cuando el suelo fue biofertilizado con un inoculante elaborado a partir de cepas de bacterias de *Azospirillum* y *Azotobacter*, con una subsecuente disponibilidad de N y P en el suelo.

Los biofertilizantes se han desarrollado en el mundo por la capacidad para proporcionar una fuente confiable de bacterias benéficas para el crecimiento de las plantas. En las últimas décadas, se ha observado el desarrollo de la industria de inoculantes en Iberoamérica, principalmente los inoculantes destinados al cultivo de soja. Para el caso de Argentina primer exportador mundial de aceite y harina de soja y tercer productor mundial después de USA y Brasil, realizaron un programa de selección iniciado en 1980, con numerosos ensayos en diferentes áreas productivas, y determinaron a la cepa E109 de *Bradyrhizobium japonicum* como recomendable para la inoculación de la soja. Posteriormente en el año 2001 realizaron un estudio comparativo de nodulación y eficiencia de 50 cultivares de soja empleando diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *Sinorhizobium fredii*, los resultados indicaron una alta capacidad de nodulación para todas las cepas evaluadas y alta eficiencia de *B. japonicum* con todos los cultivares, pero no sucedió lo propio con *S. fredii*. (Perticari, A en: www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf). Corpoica dentro del Programa de Investigación de Recursos Biofísicos ha venido desarrollando diversos inoculantes entre los que se cuentan un inoculante con base en micorrizas arbusculares denominado Mycobiol, con la capacidad para infectar raíces de varios tipos de cultivos y mejorar la capacidad de las plantas para tomar, transportar y asimilar nutrientes del suelo, específicamente el fósforo obteniéndose cultivos más sanos y rentables. Mycobiol contiene tres tipos diferentes de hongos de los géneros *Glomus*, *Entrophospora* y *Acaulospora*, su utilización en horticultura permite la sustitución entre el 30% y el 50% de la fertilización química fosforada, mejorando la rentabilidad de los cultivos, al aplicarlo en etapas tempranas de desarrollo se incrementa la supervivencia de plántulas en semillero y vivero, así como de plantas provenientes de cultivo de tejidos en la etapa de endurecimiento y aclimatación. Otros biofertilizantes elaborados son Monibac y Rhizobiol producidos a partir de bacterias asimbióticas y simbióticas fijadoras de nitrógeno, productos que benefician la producción agropecuaria, y disminuyen el impacto negativo que causan los fertilizantes nitrogenados de síntesis sobre el medio ambiente, reduciendo de manera

efectiva en un 50% la cantidad de fertilizantes y por ende los costos. (Corpoica, 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Fueron seleccionadas dos fincas representativas en cada departamento, la finca Doña Rosa, municipio La Paz del departamento del Cesar, situado a 10°41.5'97" Latitud Norte y 73°16,7'82" Longitud Oeste y la finca La Esperanza, municipio Distracción, en el Departamento de la Guajira, ubicada a 10°89'0,2" Latitud Norte y 72°88'15,6" Longitud Oeste a una altura de 215m. Estos suelos pertenecen a la zona agroecológica Cj, Tierras de planicies aluviales y coluvio-aluviales de la región Caribe, de relieve plano a ligeramente ondulado con pendientes menores del 7%. Sus suelos desarrollados a partir de materiales sedimentarios, son superficiales a profundos, generalmente bien drenados y de fertilidad moderada a alta; están localmente limitados por piedras a nivel freático (**CORPODIB:** www.corpodib.com).

4.2 TOMA DE MUESTRAS

Se seleccionaron 10 plantas vigorosas, sin indicios de ataques de plagas o presencia de enfermedades, de sus raíces se tomaron los nódulos que se observaban de tamaño grande y mediano, ubicados en la parte superior de la raíz principal, tomando 80 nódulos, los cuales fueron separados y almacenados en tubos de ensayo que contenían silicagel (Sosa *et al.*, 2004) y transportados para su procesamiento en el laboratorio de microbiología de suelos de Corpoica-Tibaitatá.

4.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Para el aislamiento de las cepas nativas, los nódulos fueron rehidratados durante 60 minutos en agua destilada estéril, Posteriormente se inició el proceso de desinfección, sumergiéndolos durante 30 segundos en una solución de alcohol al 70%, luego se

lavarón entre 3 y 5 veces con agua destilada estéril y posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% durante dos minutos. Finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril, se colocaron en placas de porcelana y se maceraron con ayuda de un rastrillo (Protocolo del laboratorio de microbiología de suelos: Código IN-R-308, Corpoica, Tibaitatá).

La suspensión obtenida se sembró por agotamiento en una caja de petri que contenía el medio extracto de Levadura, Manitol y Agar (LMA), con el indicador Rojo Congo. (Protocolo del laboratorio de microbiología de suelos código IN-R-312, Corpoica-Tibaitatá). Posteriormente se incubó a una temperatura entre $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 2 a 6 días hasta la observación de colonias en la superficie del medio.

Las colonias obtenidas a partir de nódulos, que presentaron características de rizobios de acuerdo a lo descrito por Vincent (1970), se sembraron por agotamiento en nuevas cajas de petri conteniendo el medio LMA, con el objetivo de obtener cultivos puros. Posteriormente, los aislamientos puros se conservaron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio LMA sólido inclinado e impermeabilizados con aceite mineral estéril, para su posterior caracterización fenotípica.

4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

4.4.1 Caracterización microscópica: Una vez comprobada la pureza de cada una de las cepas, se realizó una tinción de Gram, donde se pudo observar a través de un microscopio óptico la morfología celular, la respuesta de estas células a la tinción, además de la no formación de esporas. (Bécquer *et al.*, 2000).

4.4.2 Caracterización macroscópica: La pureza de los aislamientos fue verificada en el medio LMA suplementado con rojo congo (Bécquer *et al.*, 2000), paralelamente se sembró cada uno de los aislamientos en el medio LMA suplementado con azul de bromotimol, con el objeto de observar la reacción de acidez o alcalinidad de cada una

de las cepas en este medio de cultivo. Finalmente se procedió a realizar la descripción morfológica de las colonias, teniendo en cuenta las siguientes características:

1. Tiempo de crecimiento: Rápido (1-3d), Moderado (4-5d), Lento (>6d)
2. Color de la colonia: Transparente, blanco lechoso, rosada.
3. Detalle óptico: translucido, opaca, brillante
4. Elevación de la colonia: plana, cóncava, convexa
5. Forma de la colonia: redonda, irregular, punctiforme
6. Borde de la colonia: liso, rugoso, entero, dentado, ondulado, filamentoso, lobulado
7. Formación de moco: presente o ausente
8. Elasticidad del moco: Ausencia o presencia de hilo
9. Diámetro de la colonia: medido en milímetros

4.4.3 Caracterización Bioquímica. Se realizó mediante la aplicación de la prueba API20NE, el cual consta de 20 microtubos con medios deshidratados que combinan 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. Mediante esta técnica se observó la actividad metabólica de las cepas aisladas a partir de los nódulos, inoculando una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en estudio en solución fisiológica en cada microtubo de la prueba API20NE y la observación tras un período de incubación de 18 a 24 h con una temperatura de 30 °C.

4.5 PRUEBA DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Con el fin de evidenciar la capacidad nodulífera de los aislamientos obtenidos, se realizaron las pruebas de nodulación en semillas de *Leucaena leucocephala*. Las

cepas caracterizadas fenotípicamente y que presentaron características de la familia rizobiaceas fueron sembradas en caldo extracto de levadura más manitol (LM), suplementado con azul de bromotimol e incubados en condiciones de agitación 120rpm a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas para las cepas de crecimiento rápido y 3 días \pm para las cepas de crecimiento lento.

Cada inóculo se preparó a una concentración de 1×10^8 UFC ml^{-1} y se inóculo 1ml/semilla. Las semillas de *Leucaena leucocephala*, fueron escarificadas en ácido sulfúrico al 98% durante 5 minutos, luego se lavaron hasta remover las trazas de ácido. Seguidamente se desinfectaron durante 5 minutos en hipoclorito de sodio al 3% y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril, finalmente las semillas se sumergieron en solución de alcohol al 75%. (Protocolo microbiología de suelos: Código IN-R-308, Corpoica, Tibaitatá). Las semillas fueron incubadas en cámara húmeda a una temperatura $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su germinación. Una vez germinadas las semillas fueron sembradas en macetas de 24 onzas que contenían un sustrato estéril compuesto de vermiculita- arena, en proporción 2:1.

Las plantas inoculadas fueron regadas 3 veces por semana y fertilizadas una vez por semana con 1,5mL/matera de la solución de Hoagland, libre de nitrógeno. (Anexo 1). Las plantas fueron incubadas en un fitotrón Sanyo, Versatile Environmental Test Chamber, bajo condiciones controladas de luz (16 horas) y oscuridad (8 horas), con una temperatura de 28°C y humedad relativa del 70%. Por otra parte, el testigo absoluto (T_0) únicamente fue hidratado y el testigo químico (T_1) fue hidratado y fertilizado con la solución de Hoagland con 200 ppm de nitrógeno en forma de KNO_3 .

Se empleó un diseño estadístico completamente al azar (DCA), con 17 tratamientos con 3 repeticiones, para un total de 51 unidades experimentales. Los tratamientos evaluados se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos evaluados en la prueba de nodulación

TRATAMIENTO/ CEPA	ORIGEN país/dpto
T ₀ : Testigo absoluto (sin inóculo y sin solución nutritiva)	
T ₁ : Testigo químico (sin inóculo pero fertilizado con solución nutritiva más nitrógeno KNO ₃ 200ppm).	
T ₂ :UFLA 1 (Cepa de referencia)	Brasil
T ₃ : UFLA 2 (Cepa de referencia)	Brasil
T ₄ : C-50 (Cepa de referencia comercial)	Rodesia
T ₅ : RC01	Colombia-Cesar
T ₆ : RC02	Colombia-Cesar
T ₇ : RC03	Colombia-Cesar
T ₈ : RC04	Colombia-Cesar
T ₉ : RC05	Colombia-Cesar
T ₁₀ : RG01	Colombia-Guajira
T ₁₁ : RG02	Colombia-Guajira
T ₁₂ : RG03	Colombia-Guajira
T ₁₃ : RG04	Colombia-Guajira
T ₁₄ : RG05	Colombia-Guajira
T ₁₅ : RG06	Colombia-Guajira
T ₁₆ : RG07	Colombia-Guajira

Dentro de los tratamientos se incluyeron las cepas de referencia: C-50, (Laboratorio microbiología de suelos, Corpoica-Tibaitatá) cepa de referencia comercial, las cepas UFLA 1 y UFLA2, provenientes de la universidad federal de Labras en Brasil. (Anexo 2).

Después de 60 días de la siembra e inoculación, se evaluaron las variables: longitud de la parte aérea, longitud radical, peso fresco de la parte aérea, peso fresco radical, peso seco de la parte aérea, peso seco radical, número de nódulos efectivos (nódulos que presentaron color rosa). Estas variables se analizadas bajo el programa estadístico SPSS y para la comparación de medias se uso el test de DMS con un 95% de confianza.

4.6 PRUEBA DE REDUCCIÓN DE ACETILENO (ARA)

Se tomaron raíces noduladas, previamente inoculadas con los aislados de los departamentos de Cesar y la Guajira, las cuales se introdujeron en frascos con un volumen conocido de 280 mL. Estos frascos se cerraron herméticamente y se les retiró las posibles trazas de gases existentes en su interior que pudieran alterar los

resultados de la prueba. Se sustituyó el 10% de la atmósfera del frasco de cultivo (28 ml) con acetileno y se incubó durante 1 hora a 32° C. (Eckert *et al.*, 2001).

La concentración de etileno se midió inyectando 1 mL de la atmósfera de frasco de cultivo en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer con detector de ionización de llama de una columna Poropak N 200/300 mesh de 6 pies y 3 mm de diámetro. La temperatura en la columna fue de 50°C, en el inyector de 70°C, en el detector 120°C. El nitrógeno se utilizó como gas de arrastre en un flujo de 4,2 mL/min, con un tiempo de retención de etileno de 1,24 minutos y para el acetileno de 2,35 minutos. La actividad de reducción de acetileno para cada aislamiento, se calculó teniendo en cuenta la altura del pico de etileno en centímetros en el cromatógrama según la ecuación de la curva patrón: $Y = 0,145X + 0,548$ con un $R^2 = 0,997$, para bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, obtenida de la curva de calibración construida a partir de diluciones seriadas de etileno en concentraciones de 1; 1:10; 1:100; 1:1000 y 1:10000 en las mismas condiciones del cromatógrafo (Corpoica, 2009, Anexo 4).

4.7 PRUEBA DE DETECCIÓN DE COMPUESTOS INDÓLICOS

La producción de compuestos indólicos se detectó utilizando el reactivo de Salkowski modificado bajo análisis colorimétrico. (Gallardo, I. & Celis, L., 2008). Cada cultivo bacteriano fue ajustado a una misma concentración: 1DO a 600 nm en caldo LM suplementado con triptófano (100ug/mL). Después de 72horas de incubación, se tomó un volumen de 1 mL de cada una de las muestras y se centrifugó a 10000 rpm; por 10 min, para recuperar el sobrenadante, sobre el cual se realizó la detección de compuestos indólicos. Al sobrenadante se le adicionó reactivo Salkowski modificado H_2SO_4 (Glickman and Dessaux, 1995) en una relación 2:1 (2ml= sobrenadante, 1ml= reactivo de Salkowski). Después de 30 min en completa oscuridad, esta reacción desarrolló una coloración violácea que se midió en un espectrofotómetro Génesis 10uv a 540 nm para determinar los valores de absorbancia de cada muestra.

Curva Patrón. La concentración de ácido indolacético (AIA) se calculó mediante la concentración de compuestos indólicos, utilizando la ecuación $Y = 0,0429X + 0,1342$ ($R^2 = 0,9788$) donde Y=Absorbancia de la muestra a 540 nm y X= $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Anexo 5).

4.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Teniendo en cuenta los mayores valores de ARA y producción de compuestos indólicos, obtenidos de los de los 7 aislamientos provenientes de la Guajira y 5 de Cesar, se seleccionó la cepa más promisoría para cada región cuya codificación es RG02 y RC02, para realizar su identificación molecular.

4.8.1 Extracción de DNA: las cepas bacteriana se cultivaron en 5 mL de medio LM, durante 24 horas en agitación a 120rpm a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. De esta suspensión se tomaron 25uL en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se llevaron a baño María (80°C por 15 minutos, lo que permitió lisar el material celular, posteriormente se centrifugo a 13000 rpm, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1,0 mL de agua Milli-Q estéril.

4.8.2 Amplificación de DNA: Para amplificar la región del gen 16S rRNA se preparó una mezcla de 25uL de reacción de buffer (1x), teniendo en cuenta los siguientes reactivos: MgSO_4 (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), Primers 27F (5'GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') y 1492R (5'GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (0,2mM), 0,25 uL de taq DNA Polimerasa (Platinum) y 1,5 uL de DNA molde (muestra del aislamiento). Las condiciones del termociclador fueron ciclo de denaturación: 1 ciclo 94°C por 5min. 50 ciclos de denaturación 94°C por 30s, ciclo de anillaje: 66°C por 30s y extensión: 72°C por 1min. y 3 ciclos de extensión final: 72°C por 10 min. Los fragmentos amplificados se observaron a través de electroforesis usando un gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE acondicionado con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio que permitiera visualizar la aparición de bandas.

4.8.3 Purificación de DNA: La purificación del DNA amplificado se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El DNA se cuantificó en un nanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se analizó con el programa ND-1000 V.3.3.0 a una longitud de onda de 260nm. El producto de la purificación se llevó al secuenciador PRISM® 310 Genetic Analyzer, para secuenciar los fragmentos de DNA marcados con fluorocromos.

4.8.4 Análisis bioinformático: Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de la base de datos National Center of Biotechnology Information (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar un análisis “Basic Aligment Search Tool” para nucleótidos (BLASTn) (Garrido, 2009).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Las características de las zonas de estudio se presentan en la tabla 2

Tabla 2 Características del suelo en las zonas de estudio.

ZONA DE ESTUDIO	CARACTERÍSTICAS DEL SUELO							
	pH	textura	% Mat. Org.	Ca	Mg	K	Na	P
				m-eq/g suelo				
Finca la Esperanza (Guajira)	6,5	F-Ar	0,2	1,6	0,9	1,11	0,15	27
Finca doña Rosa (Cesar)	6,8	F-Ar-A	0,4	1,8	0,8	1,14	0,17	170

Los suelos son de pH cerca a la neutralidad con porcentajes de materia orgánica muy bajos pudiendo ser clasificados como de mediana a baja fertilidad.

5.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

A partir de nódulos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, se obtuvieron 52 cepas. Teniendo en cuenta sus características fenotípicas se seleccionaron 12 cepas; 5 procedentes de Cesar (RC01, RC02, RC03, RC04, RC05) (Fig. 1) y 7 provenientes de Guajira (RG01, RG02, RG03, RG04, RG05, RG06, RG07) (Fig. 2).

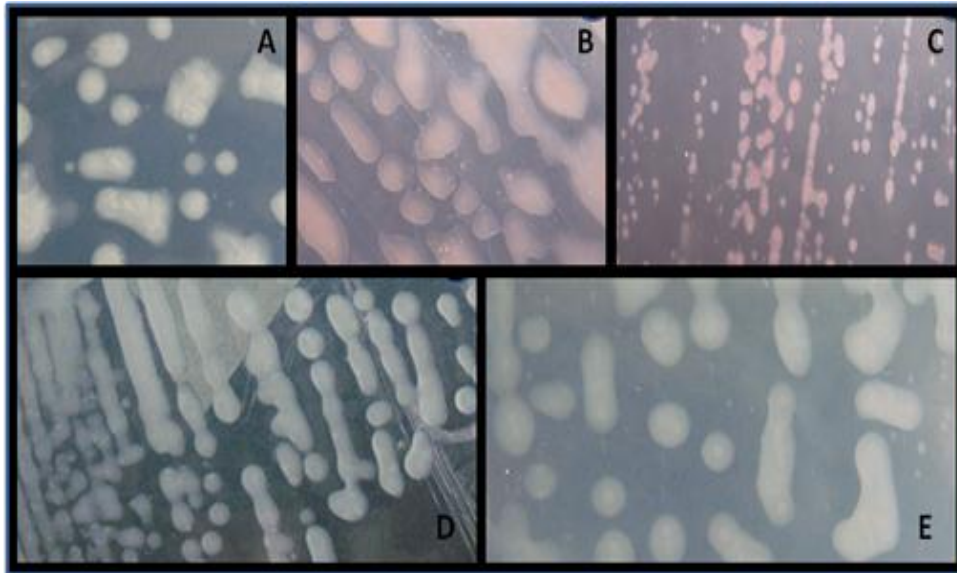


Figura 1. Aislados obtenidos a partir de nódulos obtenidos desde raíces de *Leucaena leucocephala* en suelos del departamento del Cesar. A: cepa RC04. B: cepa RC01. C: cepa RC02. D: cepa RC03. E: cepa RC05.

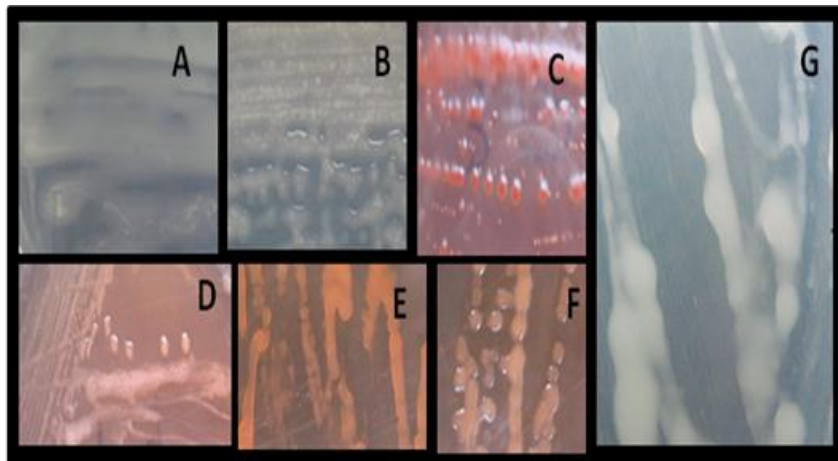


Figura 2. Cepas aisladas a partir de nódulos obtenidos desde raíces de *Leucaena leucocephala* en suelos del departamento de la Guajira. A: cepa RG05; B: RG06; C: RG07; D: RG01; E: RG02; F: RG03; G: RG04.

5.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLAMIENTOS

5.3.1 Caracterización microscópica y macroscópica

Las características macroscópicas de los aislados obtenidos a partir de nódulos provenientes del departamento del Cesar, se muestran en la tabla 3, mientras que sus células se observaron como bacilos cortos, delgados y negativos a la tinción de Gram.

Tabla 3. Características fenotípicas de cepas aisladas y purificadas a partir de nódulos de raíces de *Leucaena leucocephala*, en el departamento del Cesar.

Aislados	Características de los aislados									
	FAA	TC	CC	DO	EL	FC	BC	FM	EM	DC
RC01	AC	R	T	TR	C	R	L	P	AH	1,0-5,0
RC02	AC	R	T	TR	C	P	L	A	AH	0,3-1,0
RC03	AC	R	BL	TR	C	R	L	P	AH	0,5-5,0
RC04	AL	M	BL	O	C	R	R	A	AH	0,5-5,0
RC05	AC	R	BL	TR	C	R	L	P	AH	1,0-6,5

FAA: Formación de ácido-álcali (AC: acidifica, AL: alcaliniza, N: neutro). TC: tiempo de crecimiento (R: rápido 1-3d, M: moderado: 4-5d, L: lento:>6d)). CC: color de colonia (T: transparente, BL: blanco Lechoso, R: rosada). DO: detalle óptico (TR: translúcido, O: opaca, B: brillante). EL: Elevación (P: plana, C: convexa, Co: cóncava). FC: Forma Colonia (R: Redonda, I: irregular, P: puntiforme). BC: borde de la colonia: (L: liso, R: rugoso, E: entero, D: dentado, O: ondulado, F: filamentosos, L: lobulado). FM: Formación de moco (P: presente, A: ausente). EM: Elasticidad del Moco (AH: Ausencia de Hilo, PH: presencia de hilo). DC: diámetro de la colonia, medido en milímetros.

Las características macroscópicas de los aislamientos obtenidos a partir de nódulos de Guajira se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Características fenotípicas de cepas aisladas y purificadas desde nódulos obtenidos a partir de nódulos de raíces de *Leucaena leucocephala*, en el departamento de la Guajira.

Aislados	Características de los aislados									
	FAA	TC	CC	DO	EL	FC	BC	FM	EM	DC
RG01	AC	R	BL	TR	C	P	L	P	AH	1-6,0
RG02	AL	L	BL	O	C	R	L	P	AH	0,5-2,0
RG03	AL	L	BL	O	C	R	L	P	AH	0,5-4,0
RG04	AL	L	BL	O	C	I	L	P	AH	0,5-3,8
RG05	AC	R	BL	TR	C	R	L	P	AH	0,5-4,0
RG06	AC	R	BL	TR	C	R	L	P	AH	0,4-3,6
RG07	AC	R	BL	TR	C	I	L	P	AH	0,5-3,5

FAA: Formación de ácido-álcali (AC: acidifica, AL: alcaliniza, N: neutro). TC: tiempo de crecimiento (R: rápido 1-3d, M: moderado: 4-5d, L: lento:>6d)). CC: color de colonia (T: transparente, BL: blanco Lechoso, R: rosada). DO: detalle óptico (TR: translúcido, O: opaca, B: brillante). EL: Elevación (P: plana, C: convexa, Co: cóncava). FC: Forma Colonia (R: Redonda, I: irregular, P: puntiforme). BC: borde de la colonia: (L: liso, R: rugoso, E: entero, D: dentado, O: ondulado, F: filamentosos, L: lobulado). FM: Formación de moco (P: presente, A: ausente). EM: Elasticidad del Moco (AH: Ausencia de Hilo, PH: presencia de hilo). DC: diámetro de la colonia, medido en milímetros.

Las cepas aisladas del departamento del Cesar después de 2 y 5 días de incubación en medio LMA suplementado con azul de bromotimol presentaron un rango de pH que

varió entre 4,23 a 6,31; observándose la acidificación del medio de cultivo, cuyo pH inicial fue de 6,55 (Fig. 3). Los aislamientos obtenidos del departamento de Guajira mostraron un rango de pH entre 5,09 a 6,88, lo que permite inferir que los aislados RG01, RG05, RG06, RG07 acidificaron el medio de cultivo y RG02, RG03, RG04 alcalinizaron el medio (Fig. 4). La acidificación del medio de cultivo puede estar relacionado con la capacidad de estos microorganismos de utilizar azúcares como el manitol como fuente de carbono promoviendo la acidificación del medio por la excreción de ácidos (Morales, 1992).



Figura 3. Cambio del pH del medio por parte de las colonias aisladas desde nódulos de Leucaena leucocephala en el departamento del Cesar. Cepas RC01-RC05. (Nótese cambio de color del medio)

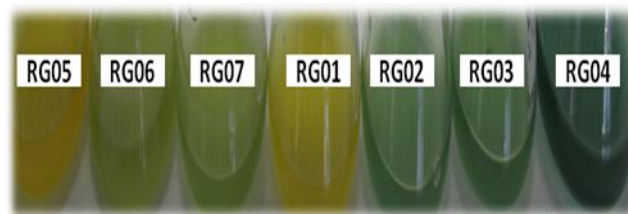


Figura 4. Cambio del pH del medio por parte de las colonias aisladas desde nódulos de Leucaena leucocephala en Guajira. Cepas RG01-RG07. (Nótese cambio de color del medio)

Los aislados RC01, RC03, RC05, RG01, RG05, RG06 y RG07 presentaron un crecimiento rápido, formaron colonias mucosas, con un diámetro que oscila entre 0,5 hasta 6mm, después de 2 a 3 días de incubación. Microscópicamente se observaron como bacilos pleomorficos con reacción negativa a la tinción de Gram, además de excretar sustancias ácidas al medio. Lo anteriormente mencionado, puede deberse a que las bacterias aisladas desde leguminosas en suelos semiáridos tropicales tienden a

crecer rápidamente dado que las condiciones del suelo le implican un desarrollo rápido. Amarger *et al.*, (1997) reportaron que *Leucaena leucocephala*, puede ser nodulada por varias especies del género *Rhizobium* que presentan crecimiento rápido, de tamaño grande (>3mm) y acidifican el medio de cultivo.

Por otra parte, la cepa RC04 presentó un crecimiento moderado entre 3 y 5 días, las colonias presentaron gránulos posiblemente de polihidroxibutiratos. Esta cepa en el medio de cultivo LMA suplementado con azul de bromotimol mostró una reacción ácida, observándose una variación con respecto al pH inicial de 6,55 a 6,31 después de 5 días de incubación. Para el caso de los aislados desde la Guajira RG02, RG03, RG04, se pudo observar que presentaron un crecimiento lento después de 5 días de incubación y alcalinizaron el medio de cultivo. Stowers *et al.*, 1984, afirmaron que los rizobios de crecimiento lento excretan sustancias básicas al medio de cultivo LMA suplementado con azul de bromotimol y esto se debe a la utilización preferencial de compuestos nitrogenados en vez de compuestos de carbono, también se relaciona la alcalinización del medio con una forma menos evolutiva a aquellos que lo acidifican, es decir, los rizobios que alcalinizan el medio son una forma más ancestral que aquellos que los acidifican.

El aislado RC02 presentó un crecimiento rápido, las colonias tuvieron un diámetro menor a 1mm, punctiformes y escasa producción de moco. Esta cepa acidificó el medio de cultivo mostrando una variación de pH después de 5 días de incubación con valor de 6,58 a 4,56. La producción de escaso moco en el medio de cultivo puede ser una característica que favorezca la fijación simbiótica de nitrógeno y esto se vio reflejado en la prueba de Reducción de acetileno, pues esta cepa obtuvo el mayor valor. Resultados similares fueron obtenidos por Roughley *et al.*, (1992) en cepas con características como las del aislado RC02 siendo muy eficientes en la fijación biológica de nitrógeno.

Estudios realizados por Tan and Broughton (1982) afirmaron que ciertas combinaciones de aminoácidos y azúcares promueven la acidificación del medio, una vez crecen los microorganismos de crecimiento rápido, mientras que los microorganismos de crecimiento lento alcalinizan el medio. Los microorganismos de crecimiento rápido utilizan más galactosa para su crecimiento que los microorganismos de crecimiento lento. Estos mismos autores sugieren que el cambio de pH por los rizobios crecidos en medio LMA es producto de la asimilación preferencial de azúcares por los organismos de crecimiento rápido, excretando posteriormente ácidos orgánicos mientras que los microorganismos de crecimiento lento prefieren compuestos nitrogenados y consecuentemente liberan cationes. Por otra parte Allen and Allen (1950) afirmaron que rizobios que forman colonias secas y diámetro pequeño tienen una mayor capacidad para fijar N, coincidiendo con los obtenidos en este trabajo de investigación, donde el aislamiento RG02 presentó el mayor valor de ARA (16,25 $\mu\text{mol/ml C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$) y producción de compuestos indólicos lo cual favorece el crecimiento vegetal.

Esta característica presentada por las cepas de crecimiento rápido, puede ser una ventaja adaptativa, teniendo en cuenta que los suelos en estudio, están catalogados como áridos a semiáridos. Según Sprent (1995) citado por Martins (1997), en estas zonas sobreviven mejor los rizobios de crecimiento rápido y son más comunes que los de crecimiento lento, dado que los microorganismos tienen como prioridad sobrevivir más que fijar nitrógeno. Martins (1997) encontró un incremento en el número de aislados de crecimiento rápido en regiones áridas comparadas con regiones semiáridas, quizá sea esta la razón por la que en este estudio se encontraron 8 cepas de crecimiento rápido.

De la misma forma Barnett and Gatt (1991) afirmaron que los aislamientos obtenidos a partir de Acacia pueden verse altamente influenciados por la localización geográfica, encontrándose una mayor proporción de aislados de rizobios de crecimiento rápido en zonas áridas. Mientras que Herridge and Roughley (1975),

encontraron que aislados de rizobios de crecimiento rápido y que formaron colonias grandes y mucoides en el laboratorio fueron simbióticamente ineficientes con respecto a aislados que formaron colonias pequeñas.

Kuykendall and Elkan (1976) aislaron cuatro cepas de *Rhizobium japonicum* a partir de nódulos de soya, estas cepas presentaron diferencias en la eficiente fijación de nitrógeno y utilización de fuentes de carbono, mediante las diferentes morfologías de colonias presentadas en el medio de cultivo; estos autores pudieron concluir que los *R. japonicum* que presentaron colonias con un diámetro ≤ 1 mm fueron más eficientes en la FBN con respecto a aquellos que presentaron tamaños de colonias con un diámetro ≥ 3 mm, Estos resultados coinciden con los presentados en este estudio donde las cepas con diámetro de colonia $\geq 2,5$ mm fueron menos eficientes en la FBN que las que presentaron diámetro de colonia pequeño ≤ 1 mm, como el aislado RC02.

5.3.2 Caracterización Bioquímica

5.3.2.1 Aplicación test API-20NE. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos a partir de la lectura del Test API20 NE para cada una de las cepas en estudio.

Tabla 5 Pruebas bioquímica de los aislamientos obtenidos API 20NE

REACCIÓN	12 AÍSLADOS											
	GUAJIRA							CESAR				
	NÓDULOS							NÓDULOS				
	RG 01	RG0 2	RG0 3	RG0 4	RG0 5	RG0 6	RG0 7	RC0 1	RC0 2	RC0 3	RC0 4	RC05
Reducción de Nitratos en nitritos	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Reducción de Nitratos en Nitrógeno	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Formación de índoles	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación de la Glucosa	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
L-Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis B-glucosidasa Esculina	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Hidrólisis de proteasa	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
B-galactosidasa (Parantrofenil-Bgalactopironidasa)	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Asimilación D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Asimilación L-Arabinosa	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Asimilación D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Asimilación D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Asimilación N-acetil glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Asimilación D-maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Asimilación Gluconato potásico	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Asimilación ácido caprico	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Asimilación ácidoadípico	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Asimilación ácido málico	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Asimilación citrato trisódico	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Asimilación ácido fenilacético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+

Los aislamientos RC04, RG01, RG02, RG03, RG04, RG05, RG06 asimilaron un amplio rango de monosacáridos y disacáridos como fuente de carbono, tales como D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil glucosamina y D-maltosa. Lo anterior es similar a lo obtenido por Kumari *et al.*, 2009 quienes evaluaron cepas de *Rhizobium* aisladas a partir de nódulos de cinco especies de leguminosas del género

Indigofera, encontrando que utilizaron un amplio rango de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como fuentes de carbono. De la misma forma, Amarger *et al.*, 1997 encontraron resultados similares en su estudio con aislados de *Rhizobium* a partir de la leguminosa *Phaseolus vulgaris*, los cuales también utilizaron azúcares como L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-glucosamina, D-glucuronato, lactosa, maltosa, manitol, D-manosa, rafinosa, L-rhamnosa, D-ribosa, D-sorbitol, trehalosa, xylosa, glucitol, inositol, glicerol, almidón soluble y gluconato, como fuente de carbono.

Para el caso del NO_3 , las cepas RG02, RG06 y RC04 utilizaron este sustrato como fuente de nitrógeno bajo condiciones de laboratorio; mientras que las cepas RG03, RG07 y RC01, redujeron los nitratos a nitrógeno. En el suelo los nitratos pueden inhibir el proceso de nodulación y disminuir la fijación biológica de nitrógeno. Los aislados RC02, RC03, RC04, RC05, RG02, RG03, RG05, RG06, RG07, fermentaron la glucosa, este proceso permite obtener energía en forma de ATP para cumplir sus funciones celulares. Los aislados RG04 y RC04 fueron los únicos incapaces de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Como otra característica la mayoría de los aislados excepto RG06, RC01 y RC03 poseen la enzima oxidasa, útil en la identificación de bacterias Gram (-).

5.4 PRUEBA DE NODULACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno que podrían pertenecer a la familia *Rhizobiaceae*, exhibiendo un comportamiento simbiótico que se revela en la formación de nódulos en las raíces de las plantas crecidas. (Fig. 5 y 6).



Figura 5. Plantas noduladas obtenidas a partir de inóculos del Departamento del Cesar (RC01-RC05). A: Raíz de una planta inoculada con la cepa RC04. B: Nódulos obtenidos desde el inóculo RC04. C: Planta inoculada con RC04, después de 90 días.



Figura 6. Nódulos obtenidos a partir de la cepa RC04 en una planta de *Leucaena leucocephala*

De acuerdo con el análisis de varianza y diferencia de medias se observó que los aislados evaluados sobre las plantas de *L. leucocephala* no presentaron diferencias significativas sobre las variables de: longitud parte aérea, peso fresco parte aérea, peso fresco radical, peso seco parte aérea, y peso seco radical, por cuanto el nivel de significancia fue $p > 0,05$ (Anexo 3). Para las variables longitud radical y número de nódulos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos donde las cepas inoculadas superaron al testigo absoluto. En cuanto al testigo químico, se pudo observar que este no presentó diferencias significativas en las variables antes descritas comparado con las plantas inoculadas (Fig. 7), lo cual permite inferir que la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno podría llegar a reemplazar hasta en un 80% la fertilización química nitrogenada, favoreciendo la

nutrición de las plantas, disminuyendo costos de producción y contaminación ambiental.

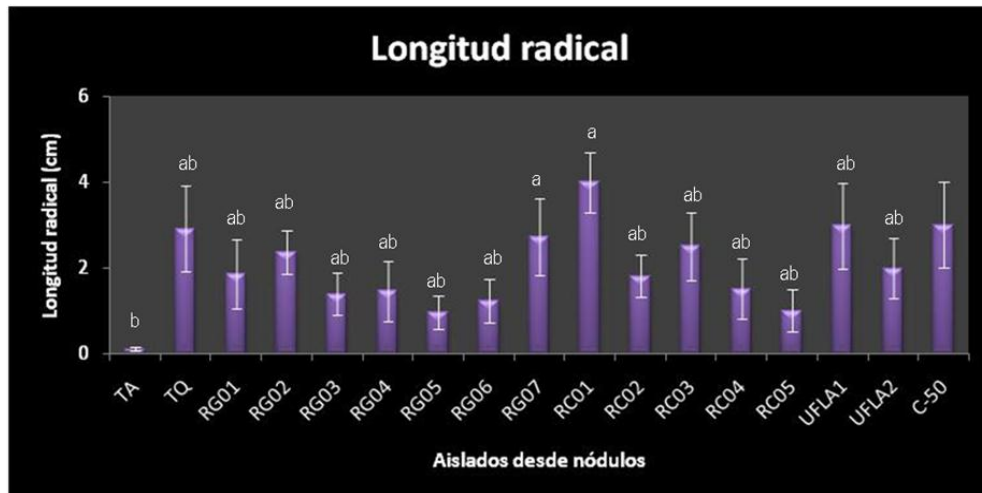


Figura 7 Representación de medias variable: longitud radical

Al observar el número de nódulos obtenidos en las plantas inoculadas con los aislamientos y compararlas con las cepas de referencia se pudo ver un mayor número de nódulos en las plantas inoculadas con los aislados nativos lo que puede deberse a que estos podrían tener una mayor capacidad de infección probablemente debido a una mejor adaptación a las condiciones evaluadas. Por otro lado al evaluar las plantas fertilizadas químicamente (testigos químicos) y sin inocular (testigos absolutos) se evidenciaron estructuras nodulares en las raíces lo cual pudo deberse a una posible contaminación del sustrato o a una contaminación cruzada dada por el estrecho espacio dentro del fitotrón (Fig. 8). Sin embargo al realizar un corte transversal de los nódulos estos no presentaron la coloración rosada característica de los nódulos efectivos por lo cual se pudo inferir que estos nódulos no poseen la capacidad de fijar nitrógeno biológicamente corroborando este resultado con la prueba de ARA.



Figura8. Representación de medias variable:número de nódulos

5.5 PRUEBA DE REDUCCIÓN DE ACETILENO

Según los resultados obtenidos en la prueba de reducción de acetileno para los aislamientos seleccionados a partir de nódulos de *L. leucocephala*, las cepas RC02, RG02, RC01, RG06, presentaron la mayor actividad de la enzima nitrogenasa, con valores de ARA de 18,56; 16,25; 6,11; 5,13 $\mu\text{MC}_2\text{H}_4$ nódulos/planta⁻¹ h⁻¹ respectivamente. Para el caso de los testigos químicos y absolutos, no se observó la actividad de esta enzima especializada en reducir el nitrógeno atmosférico en nitrógeno inorgánico para que pueda ser utilizado por las plantas lo cual se pudo corroborar en los nódulos que presentaban color blanco. En cuanto a las cepas de referencia evaluadas, únicamente UFLA1 presentó un valor medio comparado con algunos de los aislados nativos evaluados (Fig. 9). La capacidad de reducción de acetileno puede variar de forma significativa en los diferentes aislamientos. Esto pudo deberse al genotipo de cada bacteria, lo cual puede influir en la capacidad de estos microorganismos en fijar nitrógeno de manera natural asociados con leguminosas (Eckert *et al.*, 2001).

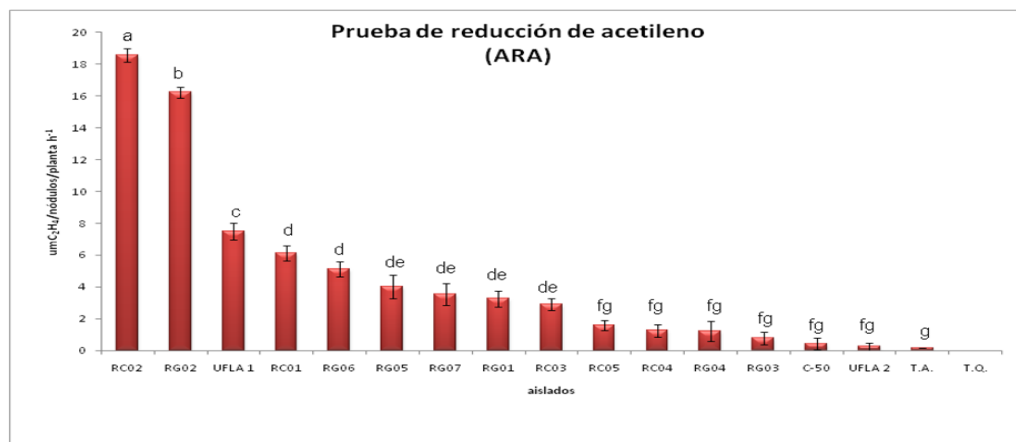


Figura 9. Actividad de la enzima nitrogenasa, mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA)

Estudios realizados por Grajeda-Cabrera *et al.*, (2003) donde utilizaron diferentes métodos para estimar la fijación de nitrógeno en frijol bajo condiciones de campo, mostraron valores de ARA entre 2,053 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{planta}^{-1}\text{h}^{-1}$ y 4.348 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{planta}^{-1}\text{h}^{-1}$. Estos valores son similares a los obtenidos para las cepas RC03 con valor de 2,90 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$, RG01 con valor de 3,25 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$, RG05 con valor de 4,00 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$ y RG07 con valor de 3,52 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$.

Ayala (2005) evaluó el efecto de 8 cepas de *Rhizobium* spp, sobre la actividad específica de la enzima nitrogenasa en plantas de maní variedad Red Starr a los 40 días de crecimiento, encontrando que las cepas aisladas a partir de *Arachis hypogaea* y *Centrosema pubescen*, presentaron la mayor actividad de la enzima con valores de 12,83 y 13,84 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{planta}^{-1}\text{h}^{-1}$ respectivamente; el menor valor obtenido en la evaluación de la enzima nitrogenasa fue de 4,36 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{planta}^{-1}\text{h}^{-1}$, sin embargo se observó un efecto positivo en la fijación biológica de nitrógeno sobre la producción de biomasa en las plantas evaluadas. Los resultados obtenidos por Ayala son similares a los obtenidos para las cepas RC02 con valor de 18,56 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$ y RG02 con valor de 16,25 $\mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{h}^{-1}/\text{nódulo/planta}$, sin embargo las cepas evaluadas en este trabajo de investigación siguen presentando valores de ARA superiores. Por otro lado Rey *et al.*, (2005) evaluaron el efecto de la doble

inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *L. leucocephala*, encontrando como mayor valor de ARA $0,318 \mu\text{molC}_2\text{H}_4\text{planta}^{-1}\text{h}^{-1}$. Comparando con los anteriores resultados se evidenció una mayor actividad enzimática de las cepas nativas evaluadas en el presente trabajo (Fig. 9).

5.6 PRUEBA DE DETECCIÓN DE COMPUESTOS INDÓLICOS

A las cepas que presentaron mayor fijación de nitrógeno se les determinó la producción de compuestos indólicos. Estas cepas fueron RC01, RC02, RC03, RG02, RG06 al igual que las cepas de referencia UFLA 1, UFLA2, C-50 (Fig. 10).

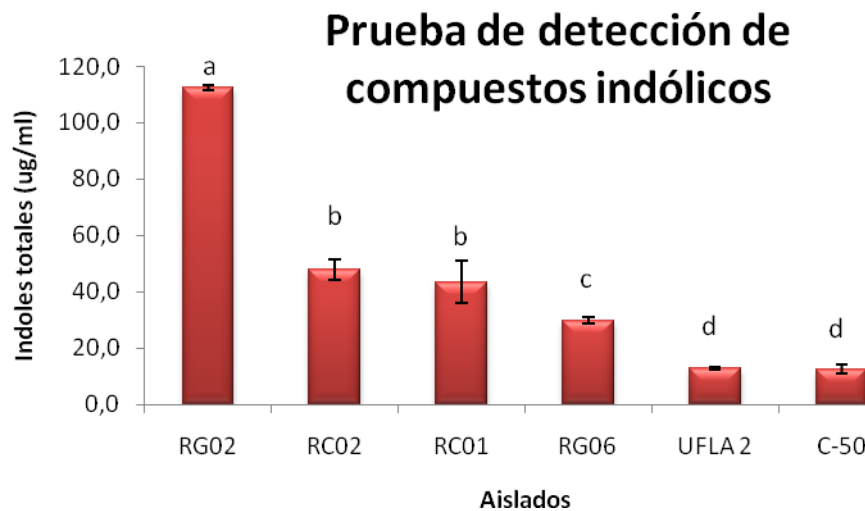


Figura 10. Producción de compuestos indólicos

La capacidad de producir fitohormonas como ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas en medios libres de nitrógeno se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de diferentes géneros de bacterias como *Rhizobium* sp. *Azotobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. Existen reportes sobre la producción de AIA por parte de diferentes microorganismos entre los que se destacan *Rhizobium* sp. (22 mg/L), *Azospirillum brasilense* (20-40mg/L), *Azospirillum lipoferum* (16-32mg/L), *Xanthomonas* sp. (22mg/L), *Pseudomonas* sp. (20-65 mg/L), *Azotobacter* sp. (>22 mg/L), *Acinetobacter* sp. (3-18 mg/L), *Bacillus* sp. (30-40 mg/L), *Corynebacterium*

sp., y *Flavobacterium* spp., (20 – 30 mg/L) (Anwar 2000; 1991, Rives *et al.*, 2007, Somers *et al.*, 2005; Vandeputte *et al.*, 2005).

La producción de compuesto indólicos de las cepas nativas RG02, RC02, RC01, RG06 fue de 112,59 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, 47,9 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, 43,49 $\mu\text{g/ml}^{-1}$, 29,79 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ respectivamente, lo que demuestra un valor en promedio superior a las especies anteriormente mencionadas, siendo entonces estas cepas promisorias por presentar valores muy superiores de producción de ácido indolacético en comparación con cepas eficientes reportadas.

Boiero *et al.*, (2007), realizaron un estudio sobre la producción de fitohormonas por parte de tres cepas de *Bradyrhizobium japonicum* y sus posibles implicaciones fisiológicas y tecnológicas reportando que su mejor cepa obtuvo un valor de producción de AIA en LMA de 3,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$, valor inferior al obtenido por las cepas evaluadas en el presente estudio. El valor mayor estuvo en 112,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y fue obtenido de la cepa RG02, seguido de un valor de 47,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, obtenido de la cepa RC02.

Por otra parte se ha estimado que el 80% de las bacterias aisladas a partir de la rizósfera tienen la capacidad de producir ciertas fitohormonas como la AIA (Patten, C.L. & Glick, B.R. 1996), situación que ha sido confirmada en el presente estudio pues de 5 aislamientos evaluados para la producción de compuestos indólicos, cuatro mostraron resultados positivos con valores altos en comparación con los reportados por otros autores como Peña & Reyes (2007) con valor de AIA de 24,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la cepa 33,*Rhizobium* sp, inoculada y reaislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

De otro lado Kumari *et al.*, (2009) afirmaron que un máximo de 149,7 $\mu\text{g/ml}$ de AIA fue producido cuando se utilizó como fuente de carbono el manitol para la cepa de *Rhizobium* aislada a partir de *Indigofera viscosa* valor similar al obtenido para la cepa RG02. Estos mismos autores reportaron un valor de 107 $\mu\text{g/ml}$ para cepas de

Rhizobium aisladas a partir de *Alysicarpous vaginalis* creciendo en un medio suplementado con triptófano utilizando como fuente de carbono el manitol. Por lo anterior ellos concluyeron que la máxima producción de AIA para todas las cepas de *Rhizobium* se obtiene cuando la fuente de carbono es el manitol.

Como se mostró en la figura 10, las cepas que presentaron mayor producción de compuestos indólicos fueron RG02 y RC02; teniendo en cuenta estos resultados, estas dos cepas fueron identificadas molecularmente mediante el análisis del gen 16S rRNA en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Militar Nueva Granada.

5.7 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PROMISORIAS

El resultado de los alineamientos de las secuencias obtenidas para cada una de las cepas permitió tener una aproximación taxonómica, comparadas con otras secuencias reportadas en las bases de datos de genes de NCBI y Greengenes. (Tabla 6, Anexo6-9).

Tabla 6. Comparación de las secuencias de los aislados RG02 y RC02, con las reportadas en las bases de datos del NCBI

AISLAMIENTO	HOMOLOGÍA/SECUENCIA	Nº ACCESIÓN NCBI	MÁXIMA IDENTIDAD	E	PUBLICACIONES
GUAJIRA 27F	<i>Burkholderia caribensis</i> strain MWAP64 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb Y17009.1 <i>Burkholderia caribensis</i> 16S rRNA gene, strain MWAP64	Y17009	98%	0.0	Int. J. Syst. Bacteriol. 49 PT 2, 787-794 (1999)
GUAJIRA 1492R	<i>Burkholderia</i> sp. TFD4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU827473.1	99%	0.0	Syst. Appl. Microbiol. 33 (2), 67-70 (2010)
CESAR 27F	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 41184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	FJ418698.1	98%	0.0	J. Microbiol. 47 (3) 287-296 2009
CESAR 1492R	<i>Rhizobium</i> sp. STM 4037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EF152476.1	98%	0.0	Can. J. Microbiol. 54 (3), 209-217 (2008)

Máxima identidad: % Identidad (valores < 98 no se incluyen); E:(valores > 0,0 no se incluyen).

Las dos cepas presentaron un porcentaje de similitud del 98%, con secuencias de microorganismos reportadas en el GenBank. La cepa RG02 podría ser *Burkholderia caribensis* número de accesión: NR026462.1 o *Burkholderia* sp número de accesión EU827473.1 capaz de fijar nitrógeno en diversas especies vegetales Balachander *et*

al., (2007) reportaron que *Bulkhorderia* es un habitante común del suelo y se asocia con las raíces de las plantas formando nódulos capaces de fijar nitrógeno. Por otra parte Moulin *et al.*, (2001) aislaron *Bulkhorderia sp* a partir de nódulos de la leguminosa *Aspalathus carnosa* en el sur de Africa y comprobaron que este aislado fue capaz de nodular *Macroptilium atropurpureum*, leguminosa tropical que establece simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*.

Además varios autores demostraron que diferentes especies de *Bulkhorderia*: *B. caribensis*, *B. phymatum* y *B. tuberculum*, aisladas desde *Mimosa bimucronata*, *M. pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* and *M. acutisca*, fueron capaces de formar nódulos efectivos y fijar nitrógeno evidenciándose la actividad de la enzima nitrogenasa. (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Con respecto al aislado RC02, podría ser un *Rhizobium sp* número de accesión: FJ418698.1 o, número de accesión: EF152476.1, con un porcentaje de similitud del 98%, además ha sido reportado que esta especie es capaz de asociarse con leguminosas tropicales. Parrota (1992) reportó la simbiosis de *L. leucocephala* con *Rhizobium* con una tasa de fijación de nitrógeno del 110Kg por Ha bajo condiciones de campo. De otro lado Rincón (2000), evaluó cepas nativas de *Rhizobium* aisladas a partir de *Leucaena* y cepas introducidas obteniendo resultados mayores en materia seca y fijación de nitrógeno con las cepas nativas. De la misma forma Moawad and Bohlool (1984) evaluaron la eficiencia de cepas de *Rhizobium* aisladas desde *Leucaena* en diferentes tipos de suelo en Hawái obteniendo que el tipo de suelo es capaz de influenciar la capacidad de infección de las cepas. Diferentes autores (Hashem, *et al.*, 1998; Martínez-Romero, *et al.*, 1991; Trinick, M. J. 1980, George *et al.*, 1996), reportaron la estrecha relación simbiótica que existe entre *Leucaena* y el género *Rhizobium*, por lo que se puede afirmar que en el presente estudio la cepa RC02 puede ser un *Rhizobium sp*.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron y se seleccionaron como promisorias doce aislados a partir de nódulos asociados a *Leucaena leucocephala*, los cuales presentaron diversidad fenotípica lo que revela que existen variedad de cepas que nodulan esta planta.

La prueba de reducción de acetileno permitió comparar la efectividad de las cepas aisladas a partir de nódulos de *L. leucocephala* obteniéndose una mayor fijación de nitrógeno, de acuerdo a esta metodología semicuantitativa, por las cepas RC02 y RG02, demostrando además que los aislados nativos son más eficientes en la FBN que las cepas de referencia, factor determinante en la conservación de la biodiversidad ecológica en el suelo.

Las cepas RC01, RC02, RG02, RG06 pueden ser considerados como cepas promisorias pues además de nodular, y presentar altos valores en la prueba de reducción de acetileno, fueron capaces de producir compuestos indólicos de gran importancia en la fase de vivero por los altos costos que ocasiona este rubro a los productores de plántulas.

De acuerdo con la secuenciación 16S rRNA, realizada en la presente investigación, puede considerarse que la cepa RG02 es *Burkholderia* sp., especie asociada a leguminosas y la cepa RC02 una especie del género *Rhizobium*, género asociado a plantas de *L. leucocephala*.

RECOMENDACIONES

Aplicar técnicas de N_{15} para verificar la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) en las plantas de interés.

Implementar técnicas moleculares para la descripción de bacterias fijadoras de nitrógeno que permitan identificar a nivel de género, especie y cepa ya que esto permitiría realizar estudios de competencia de cepas en el suelo, establecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes nichos ecológicos, estudios de impacto ambiental debido al uso de biofertilizantes.

Evaluar la capacidad de asociación y efectividad de las cepas promisorias RC02 y RG02 en la fijación biológica de nitrógeno bajo invernadero y campo, evaluando el efecto de las condiciones del suelo sobre el desarrollo de la simbiosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, C., GIACOMINI, S. J. 2003. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas. R. Bras. Ci. Solo, 27:601-612.

ALLEN, E., ALLEN, O. N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, Madison. Vol.: 14.

ANDREW, C. S., JOHNSON, A.D. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. II. Chemical composition (calcium, nitrogen, potassium, magnesium, sodium and phosphorus). Australian Journal of Agricultural Research 27(5) 625 – 636.

ANWAR, G. 2000. Production of growth hormones and nitrogenasa by diazotrophic bacteria and their effect on plant growth. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. pp 9-25; 32-44

AMARGER, N., MACHERET, V., LAGUERRE, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. Nodules International Journal of systematica bacteriology: Vol. 47, No. 4 p. 996-1006.

AYALA, L B. 2005. Estudios de algunos aspectos de la fijación simbiótica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypoagea*). II. Evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación maní-*rhizobium* spp. *Agronomía Tropical*, 27:427-449.

BACILIO-JIMÉNEZ, M., AGUILAR FLOREZ, S., VENTURA-ZAPATA, E., PÉREZ-CAMPOS, E., BOUQUELET, S., ZENTENO, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and soil* 249:271-277.

BALACHANDER, D., RAJA, P., KUMAR, K., AND SUNDARAM, SP. 2007. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 2 (2), pp. 049-057, *Mini Review*

BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, Vol. 16, No. 4, pp. 729-770.

BARNET, Y.M. and GATT, P. C. 1991. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and soil*. 135: 109-120

BÉCQUER, C. J. 2004. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología*. Vol.18, N. 1.

BÉCQUER, C. J., PRÉVOST, D., PRIETO, A. 2000. Caracterización fisiológica-bioquímica de cepas de rizobios, aislados en leguminosas forrajeras. Revista de biología. Vol. 14, No 1.

BOIERO, L., PERRIG, D., MASCIARELLI, O., PENNA, C., CASSÁN, F. and LUNA, V. 2007. Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum and possible physiological and technological implications. Appl Microbiol Biotechnol. 74:874–880

BOLAÑOS, L., RIVILLA, R., REDONDO-NIETO, M., BREWIN, N. J. Y BONILLA, I. 2004. Interacciones planta-*Rhizobium* mediadas por glucoconjugados durante la infección del nódulo y el desarrollo de simbiosomas. X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno: Sesión III

BONILLA, R. y MURILLO, J. 1992. Desarrollo de sistemas de manejos para la recuperación de suelos compactados de los departamentos de la Guajira, César y Magdalena. Memorias del Encuentro Nacional de Labranza de Conservación. Editora Guadalupe Ltda. Villavicencio, Meta. Colombia, 1998. 460 p.

BONILLA, R., MURILLO, J., AARON, M., GNECCO, M., VALERA, L., OROZCO, G. 2002. Mejoramiento y conservación de suelos algodoneros. Técnicas de labranza e incorporación de abonos verdes. Innovación y cambio tecnológico Vol. II No 2P 53-59.

BREWIN, N. J. 2002. Pods and Nods: a new look at symbiotic nitrogen fixing. Biologist 49 (3).

BREWIN, N. J. 2004. Plant Cell Wall Remodeling in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. Critical Reviews in Plant Sciences, 23(4):293–316.

BURRIS, R. 1991. Nitrogenases. The Journal of Biological chemistry, Vol. 226, No 15. pp: 9339-9342

COOK, B., PENGELLY, B., BROWN, S., DONELLY, J., EAGLES, D., FRANCO, A., HANSON, J., MULLEN, B., PARTRIDGE, I., PETERS, M., SCHULTZE, R. 2005. Tropical forages: an interactive selection tool. (CD-ROM), CSIRO, DPI&F(QLD), CIAT AND ILRI Brisbane, Australia

CORPODIB: www.corpodib.com). Consulta Enero 12 de 2010.

CORPOICA. Insumos agrícolas orgánicos: Rhizobiol y Monibac, alta eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno. <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Productos/bioinsumos4.asp>. Consulta Enero 20 de 2010.

CUESTA, P., 2005. Manual técnico. Producción y utilización de recursos forrajeros en sistemas de producción bovina de las regiones Caribe y valles interandino. Colombia Arteprint Ltda. ISBN 958-8210-79-8

CHEN, W. X., YAN, G. H., LI, J. L. 1988. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen.nov. International Journal of systematic bacteriology. Vol. 38. No 4

CHEN, W., MOULIN, L., BONTEMPS, C., VANDAMME, P., GILLES, B., BOIVIN-MASSON, C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by proteobacteria is widespread in nature. Journal of bacteriology: Vol. 185, No. 24. p. 7266–7272

CHEN, WEN-XIN., TAN, ZHI-YUAN, GAO, JUN-LIAN, LI, YING AND WANG, EN-TAO. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., Isolated from Tropical Legumes. International journal of systematica bacteriology, Vol. 47, No. 3, p. 870-873

CHEN, W. M., JAMES, E. K., COENYE, T., CHOU, J., BARRIOS, E. B., DE FARIA, S. M., ELLIOTT, G. SHEU, S., SPRENT, J. AND VANDAMME, P. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 1847–1851.

DAVISON, J. 1988. Plant Beneficial Bacteria. Nature Biotechnology 6, 282 – 286.

DE FELIPE ANTÓN, M.R., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M., LUCAS SÁNCHEZ, M.M., FEDOROVA, E., GOLVANO HERRERO, M. P., GONZÁLEZ SAMA, A., GUASCH PEREIRA, L., DE LORENZO CARRETERO, C., DE LA HERAS, N., POZUELO GUANCHE, J. M., PUEYO DABAD, J. J., VIVO RODRÍGUEZ, A. 2006. Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*. An. R. Acad. Nac. Farm., 72: 423-442

DE LAJUDIE, P., LAURENT-FULELE, E., WILERNS, W., TORCK, U., COOPMAN, R., D. COLLIN, M., KERSTERS, K., DREYFUSLT, B., GILLIS, M. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. Nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 1277-1 290.

DE LAJUDIE, P., WILLEMS, A., POT, B., DEWETTINCK, D., MAESTROJUAN, G., NEYRA, M., COLLINS, C., DREYFUS, B., KERSTERS, K., GILLIS, M. 1994. Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 44, No. 4 p. 715-733.

DE LIMA SOARES, A., ANDRADE RESEN, J. DE PEREIRA, P., FERREIRA, A. MARTINS, H., SILVA LIMA, A. BASTOS DE ANDRADE, M. & DE SOUZA MOREIRA, F. 2006a. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (mg). i – caupi. R. Bras. Ci. Solo, 30:795-802.

DE LIMA SOARES, A. L., AVELAR FERREIRA, P. A., ANDRADE RESENDE PEREIRA, J. P., MARTINS DO VALE, H. M., SILVA LIMA, A., BASTOS DE ANDRADE, M. J., Y DE SOUZA MOREIRA, F. M. 2006b. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (mg). ii – feijoeiro. R. Bras. Ci. Solo, 30:803-811

DE OLIVEIRA, L. A., PARACAIMA DE MAGALHÃES, H. 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. Revista de Microbiología, 30:203-208.

DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J. and OKON, Y. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences, 22(2):107–149

DREVON, J. J. 1995. Manual técnico de la fijación biológica del nitrógeno, Leguminosa/Rhizobium. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Roma. 1-5 pp.

DREYFUS, B., GARCIA, J. L., GILLIS, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. s p . nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. International journal of systematic bacteriology Vol. 38, No. 1 p. 89-98

ECKERT, B., BALLER, O., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M. AND HARTMANN, A. 2001. *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 17-26.

ESPINOZA, F. Y GIL, J. 1999. Experiencias con *Leucaena leucocephala* en el Estado Cojedes. In: Chacón, E.; Baldizán, A. y Fossi, H. (Eds.). II Cursillo sobre Recursos Alimentarios para la Producción de Leche y Carne en Bovinos a Pastoreo, UCV, Fac. Cs. Vet., Maracay, pp. 27 –39.

ESPINOZA, F., TORRES, A. Y CHACÓN, E. 2007. *Leucaena leucocephala* y Cují (*Acacia macracantha* y *Mimosa tenuiflora*) como aporte de proteína económica en los sistemas doble propósito. Recursos Agroalimentarios. Capítulo I. I Simposio: Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela.

FEDEGAN. Federación Colombiana de Ganaderos. www.fedegan.org.co.

FEDEGAN. 2004. Modelo de gestión de desarrollo ganadero regional. Lineamientos generales.

PLAN ESTRATÉGICO DE LA GANADERÍA COLOMBIANA 2019. 2006 Federación Colombiana de Ganaderos. FEDEGAN-FNG. portal.fedegan.org.co/Documentos/pega.

FRANK, B. (1889). Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges* **7**, 332±346.

GALLARDO, I. & CELIS, L., 2008, Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Acido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos, Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, pp 1-159

GAMARRA, J., 2005. La economía del Cesar después del algodón. Colombia: Banco de la República. No 59. CEER, ISSN 1692-3715

GARRIDO RUBIANO M. F. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del cesar en dos épocas climáticas. Tesis de Maestría. Maestría Biología aplicada. Universidad Militar Nueva Granada.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2nd edition. Volume I. (Eds. Boone, D.R., Castenholz, R.W. & Garrity, G.M.). Springer-Verlag, New York, USA. 2001. p. 119

GE HONG WEI, G. H., WANG, E. T. TAN, Z. Y., ZHU, M. CHEN, W. X. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. And *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **52**, 2231–2239.

GIBSON, H. 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. Plant and Soil, Special Volume 1971, 139-152.

GONZALEZ, N.S., PICON, M. G., ANDREOLI, Y. E., ZABLOTOWICZ, R. M., NAVARRO, C.A., MARTINEZ, L. 1994. Identificación serológica de razas de *Bradyrhizobium japonicum* naturalizadas en la región pampeana norte. Ciencia de suelo **12**:22-26

GONZALEZ, C. M. 2007. Diversidad de las especies desnitrificantes del género *Halomonas* Tesis doctoral. Universidad de Granada.

GLICK, B. 1995. The enhancement of plant grown by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41(2) 109-117

GLICKMAN, E., DESSAUX, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowsky Reagent for indolic compound produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 61 No 2, 793-796 p.

GEORGE, S., MOHAN KUMAR, B., WAHID Z, R. A. AND KAMALAM, N. V. 1996. Root competition for phosphorus between the tree and herbaceous components of silvopastoral systems in Kerala, India. *Plant and Soil* 179: 189-196.

GRAGEDA-CABRERA, O. A., VERA-NÚÑEZ, J. A., CASTELLANOS, J. Z., PEÑA-CABRIALES, J. J. 2003. Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *Terra* Vol.: 21 No. 1

HASAN, H.A.H. 2002. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinna vyroba*, 48 (3):101-106

HASHEM, F. M., SWELIM, D. M., KUYKENDALL, L. D. MOHAMED, A. I., ABDEL-WAHAB, S. M., HEGAZI, N. I. 1998. Identification and characterization of salt- and thermo-tolerant *Leucaena*-nodulating *Rhizobium* strains, *Biol Fertil Soils* 27 :335–341

HERRIDGE, D. F. & ROUGHLEY, R. J. 1975. Variation in Colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. *J. appl. Bact.* 38:19-27

HUNGRIA, M. & GARY, STACEY, G. 1997. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Bio/. Biochem.* Vol. 29, No. 5/6, pp. 819-830.

INFOAGRO: http://www.infoagro.com/abonos/analisis_suelos.htm

JARVIS, B. D. W., VAN BERKUM, P., CHEN, W. X., NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., CLEYET-MAREL, J. C. , GILLIS, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International journal of systematica bacteriology* Vol. 47, No. 3 p. 895-898

JESÚS, E. DA C., DE SOUZA MOREIRA, F. M., APARECIDA FLORENTINO, L., DANTAS RODRIGUES, M. I., SILVA DE OLIVEIRA, M. 2005. Diversidade de

bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, Vol.40, No.8, p.769-776.

KLEIN, S., HIRSCH, A., SMITH, C. and SIGNER E. 1988. Interaction of *nod* and *exo Rhizobium meliloti* in Alfalfa nodulation. *Molecular plant-microbe interactions* Vol. 1 No 2. Pp 94-100

KLOEPPER J., LIFSHITZ R. AND ZABLOTOWICZ R. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. [Trends in Biotechnology](#), [Volume 7, Issue 2](#), P: 39-44

KUMARI, B. S., RAGHU RAM, M. AND MALLAIAH, K. V. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(1) pp.010-014.

KUYKENDALL, L. D. and ELKAN, G. H. 1976. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. *Applied and environmental microbiology* Vol. 32, No. 4. p. 511-519.

KUYKENDALL, D., YOUNG, J., MARTÍNEZ, E., KERR, A., SAWADA, H. 2005. *Rhizobium*. Frank 1889, 338. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Editorial Springer US. P. 325-340.

LEIBAR, I. 2006. La vermiculita, un aislante termo-reflector de barro. Probioco, comunicado técnico.

LEDGARD, S.F., AND K.E. GILLER. 1995. Atmospheric N₂ fixation as an alternative N source. p. 443–486. In P.E. Bacon (ed.) *Nitrogen fertilizer in the environment*. Marcel Dekker, New York.

LIMA LINS, C. E., CAVALCANTE, U.M., SAMPAIO, E. SACCONI MESSIAS, A., COSTA MAIA, L. 2006. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. *Applied Soil Ecology* 31: 181–185.

LÓPEZ-LARA, I. M. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.

LUGTENBERG B, THOMAS F, A-WOENG CH, BLOEMBERG G. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Anton van Leeuwenhoek* 81: 373-383

MAHECHA, L. 2002. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*: Vol. 15: 2.

MARTIN, L., NEVES, M. C., and RUMJANEK, N. G. 1997. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from Cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soit Biel. Biochem.* Vol. 29, No. 5/6. pp. 1005-1010.

MARTINEZ-ROMERO, E. SEGOVIA, L., MARTINS, F., FRANCO, A., GRAHAM, P., PARDO, M. 1991. *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. International journal of systematica bacteriology Vol. 41, No. 3 p. 417-426

MOAWAD, H., BOHLOOL, B. 1984. Competition Among *Rhizobium spp.* for Nodulation of *Leucaena leucocephala* in Two Tropical Soils. Applied and environmental microbiology, 48, No. 1 p. 5-9

MOAWAD, H., EL-DIN, B., ABDEL-AZIZ, R. A. 1998. Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. Plant and Soil 204: 95–106.

MORALES, R. A. 1992. Atrapamiento y caracterización de cepas de rizobios procedentes de suelos del algarrobal del monte. Multequina 1: 181-188.

MOULIN, L., MUNIVE, A., DREYFUS, B., AND BOIVIN-MASSON, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the betasubclass of Proteobacteria. Nature 411: 948–950.

MURGUEITIO RESTREPO, E., MOLINA, C. H., RIASCOS DE LA PEÑA, V. M., CUARTAS, C., URIBE TRUJILLO, F., LOPERA MARÍN, J. J. 2007. Montaje de modelos ganaderos sostenibles basados en sistemas silvopastoriles en seis sub-regiones lecheras de Colombia. Proyecto piloto departamento del Cesar Hacienda el Porvenir. Fedegan Tecnig@n Valledupar. Corpoica-Motilonia. Fundación centro para la investigación en sistemas sostenibles de producción agropecuaria-Cipav.

MYLONA, P., PAWLOWSKI, K., BISSELING, T. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell, Vol. 7, 869-885.

NÁPOLES, M. C. GÓMEZ, G., COSTALES, D. 2007. Factores de nodulación experiencia en Cuba. Cultivos Tropicales, Vol. 28, No. 4, p. 71-80.

NAVAS PANADERO, A. 2007. Sistemas silvopastoriles para el diseño de fincas ganaderas sostenibles. Revista Acovez, 16.

OLIVARES, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín - CSIC, Granada <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/> Consulta: [23 de febrero del 2010].

PATTEN, C. L., AND GLICK, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207–220.

PAUL, E.A. & CLARK, F.E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. 2.ed. California, Academic Press. 340p.

PARROTTA, J. A. 1992. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit Leucaena, tantan. SO-ITFSM-52. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 8 p.

PÉREZ, S. y TORRALBA, A.; 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. 21 pp. En *Scriptus Naturae* (<http://scriptusnaturae.8m.com>).

PEÑA, H. Y REYES, I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa l.*). *Interciencia*: Vol: 32 N° 8.

PERTICARI, A. Uso de biofertilizantes. Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soja. www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf. (Consulta: 10 de agosto de 2010).

POSTGATE, J. 1998. *The fundamental of nitrogen fixation*. University Press Cambridge. 1983. 252pp.

PROBANZA, a., LUCAS, J. A., ACERO, N., GUTIERREZ, F. J. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder *alnus glutinosa* (L) Gaertn.) growth. *Plant and soil* 182, 59-66

RAMIREZ, J. 2004. Producción de biopolímeros via fermentative utilizando cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y arquitectura. Departamento de Ingeniería química. 67p.

REY, A. M., CHAMORRO, D. R., RAMIREZ, M. 2005. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje en *Leucaena leucocephala*. *Revista Corpoica*. Vol: 6, No 2.

REYES A., RAMÍREZ, M., LOZANO, A. Caracterización de cepas de *Rhizobium* sp. que nodulan frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Scientific registration n° : 2205 Symposium n° : 10. Presentation : poster.

REYES, I., ALVAREZ, L., EL-AYOUBI, H., VALERY, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras de crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20 (1): 37-48.

REYES, V. G. and SCHMIDT, E. L. 1979. Population Densities of *Rhizobium japonicum* Strain 123 Estimated Directly in Soil and Rhizospheres. *Applied and environmental microbiology*, may 1979, p. 854-858 37, No. 5

RINCÓN, J. J., CLAVERO, T., RAZZ, R., PIETROSEMOLI, S., MENDEZ-CASTRO, F., NOGUERA, N. 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit).

RIVERA-CRUZ, C., TRUJILLO-NARCIA, A., ALEJO, D. E. 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N. solubilizadoras de P. y sustratos orgánicos en el crecimiento del naranjo agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia* Vol. 35 No 02.

RIVES, N., ACEBO, Y. y HERNÁNDEZ, A., 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos tropicales* Vol. 28 No 2 P 29-38

RODRÍGUEZ, B., SEVILLANO, G., SUBRAMANIAM, P. 1984. La fijación de Nitrógeno atmosférico una biotecnología en la producción agraria. Instituto de recursos naturales y agrobiología. *Temas de divulgación*. 1ª edición en 1984.

ROJAS, B. M. Y PÉREZ, Z. 2001. Consideraciones sobre el uso del nitrógeno. *Boletín técnico, Instituto del café. Costa Rica. Oficina regional Pérez Zeledón, Icafe.* Año 1 (4): 2-3.

ROME, S., FERNANDEZ, M. P. BRUNEL, B. NORMAND, P., CLEYET-MAREL, J. C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from Annual *Medicago* spp. *International journal of systematica bacteriology*, Vol. 46, No. 4 p. 972-980

ROMEIRO, R.S. (2001): *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Editora UFV. Universidad Federal de Viçosa, 279 p.

ROUGHLEY, R. J. WAHAB, F. A. AND SUNDRAM, J. 1992. Intrinsic resistance to streptomycin and espectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 24: 715-719

RUSSELLE, M. AND BIRR, A. 2004. Biological nitrogen fixation: Large-Scale Assessment of Symbiotic Dinitrogen Fixation by Crops: Soybean and Alfalfa in the Mississippi River Basin. *Agron. J.* 96:1754–1760

SÁNCHEZ MIYARES, L. 1998. Manejo del nitrógeno en praderas a lo largo del año. *Pastos y forrajes. Tecnología Agroalimentaria. CIATA. Edición especial.*

SANTANA JIMÉNEZ, M. 2007. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para sombra de café en Puerto Rico. Tesis maestro en ciencias en agronomía. Universidad de Puerto Rico. Recinto universitario de Mayagüez.

SILVA LIMA, A., SIMÃO ABRAHÃO NÓBREGA, R., BARBERI, A., DA SILVA, K., FURTADO FERREIRA, D., DE SOUZA MOREIRA, F. M. 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil* 319:127–145

SCHUBERT, S., SCHUBERT, E. and MENGEL, K. 1990. Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). *Plant and Soil* 124:239-244.

SOMASEGARAN, P. and HOBEN, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450p.

SOMASEGARAN, P. AND MARTIN, R. B. 1986. Symbiotic characteristics and *Rhizobium* requirements of a *Leucaena leucocephala* x *Leucaena diversifolia* hybrid and its parental genotypes. *Applied and environmental microbiology*, Vol.: 52, No 6 p. 1422-1424.

SOMERS E, PTACEK D, GYSEGOM P, SRINIVASAN M & VANDERLEYDEN J., 2005. Azospirillum brasilense produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 71: 1803–1810

SOSA, A., ELÍAS, A., GARCÍA, O., SARMIENTO, M. 2004. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 38, No. 2, 197

SPRENT, J. I. 1995. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 27, No. 4/5, pp. 401-407.

STEINGROVER, E. P. RATERING Y J. SIESLING. 1986. Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity. *Physiologia Plantarum*. 66: 550-556

STOWERS, M. D., AND A. K. J. EAGLESHAM. 1984. Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum* strains. *Plant Soil* 77:3-14.

STOWERS, M. D. 1984. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. *Plant soil* 80: 191-200.

- TAN, I. K. P., BROUGHTON, W. J. 1982. Rhizobia in tropical legumes. XIV Ion uptake differences between fast and slow growing strain. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 295-299
- TWORNLOW, S. 2004. Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. The future challenge. En: Rachid Serraj (ed.) *Symbiotic Nitrogen Fixation*. Sci. Publ. Inc. USA. 382 pp.
- TRINICK, M. J. 1980. Relationships amongst the fast growing *Rhizobia* of *lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa*, spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other Rhizobial groups. *Journal of applied bacteriology*, 49: 39-53
- URZÚA, H. 2005. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Cien. Inv. Agr.* 32(2) 133-150.
- URZUA, H., URZUA, J. M., PIZARRO, R. 2001. Pre-selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en vicia forrajera, para abonos verdes. *Ciencia e investigación agraria* 28(1): 3-6.
- VANDEPUTTE O, ODEN S, MOL A, VEREECKE D, GOETHALS K, EL JAZIRIM & PRINSEN E., 2005. Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Appl Environ Microbiol* 71: 1169–1177
- VINCENT JM. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. In: *International Biological Programme IBP Handbook 15*. Blackwell Scientific, Oxford
- WANG, E. T. VAN BERKUM, P., SUI, X. H. BEYENE, D., CHEN, W. X., MARTINEZ-ROMERO, E. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 49, 5 1-65.
- WANG, E. T., ROGEL, M. A., SUI, X. H., CHEN, W. H. MARTÍNEZ-ROMERO, E., BERKUM, P. V. 2002. *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa*, is native to American soils. *Arch Microbiol*, 178 :301–305.
- WEI, GE HONG, WANG, EN TAO, TAN, ZHI YUAN, ZHU, MING E. AND CHEN, WEN XIN. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. And *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2231–2239.
- YAO, ZHU YUN, KAN, FENG LING, WANG, EN TAO, WEI, GE HONG, AND CHEN, WEN XIN. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species

of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2219–2230

YOUNG, J. M., KUYKENDALL, L. D. MARTÍNEZ-ROMERO, E. KERR, A., SAWADA, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 89–103.

ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICIÓN SOLUCIÓN NUTRITIVA

SOLUCIÓN DE JENSEN

K_2HPO_4	0,2 gL ⁻¹
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 gL ⁻¹
NaCl	0,2 gL ⁻¹
$CaHPO_4$	1 gL ⁻¹
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,1 gL ⁻¹
H_3BO_3	2,86 gL ⁻¹
$MnSO_4 \cdot H_2O$	2,03 mgL ⁻¹
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 mgL ⁻¹
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 mgL ⁻¹
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,09 mgL ⁻¹

Diluido 4 veces

SOLUCIÓN DE HOAGLAND

KNO_3	1,02 g/L
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$	0,492 g/L
$NH_4H_2(PO_4)$	0,23 g/L
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,49 g/L
H_3BO_3	2,86 mg/L
$MnCl_2 \cdot 2 H_2O$	1,81 mg/L
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,08 mg/L
$ZnSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,22 mg/L
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,09 mg/L
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5 %	0,6 mL

Diluido 4 veces

ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE REFERENCIA

CÓDIGO DE LA CEPA	SINÓNIMOS	GÉNERO	ESPECIE	LEGUMINOSA HOSPEDERA	ORIGEN
UFLA-1	BR115	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Brasil
UFLA-2	BR322	<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>		Brasil
C-50	CIAT1967 ST71	<i>Rhizobium</i>	<i>spp.</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	Rodesia

ANEXO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS AISLADOS OBTENIDOS A PARTIR DEL ENSAYO DE NODULACIÓN

Tabla 1. Análisis de varianza Longitud Radical

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	202,65	16	12,67	2,399	*0,018
Error	163,70	31	5,28		
Total	8351,45	48			

Tabla 2. Análisis de varianza Longitud Foliar

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	105,71	16	6,61	1,639	0,116
Error	124,94	31	4,03		
Total	3552,33	48			

Tabla 3. Análisis de varianza peso fresco radical

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	1,43	16	,089	1,282	,268
Error	2,15	31	,069		
Total	11,49	48			

Tabla 4. Análisis de varianza peso fresco foliar

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	0,28	16	0,018	1,386	0,212
Error	0,40	31	0,013		
Total	4,49	48			

Tabla 5. Análisis de varianza peso seco radical

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	,038	16	,002	1,797	,079
Error	,041	31	,001		
Total	,652	48			

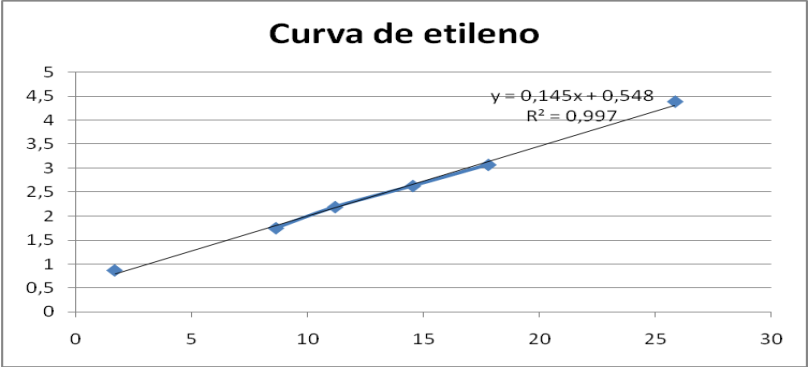
Tabla 6. Análisis de varianza peso seco foliar

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	0,05	16	0,60	1,866	0,067
Error	0,05	31	0,00		
Total	0,78	48	0,00		

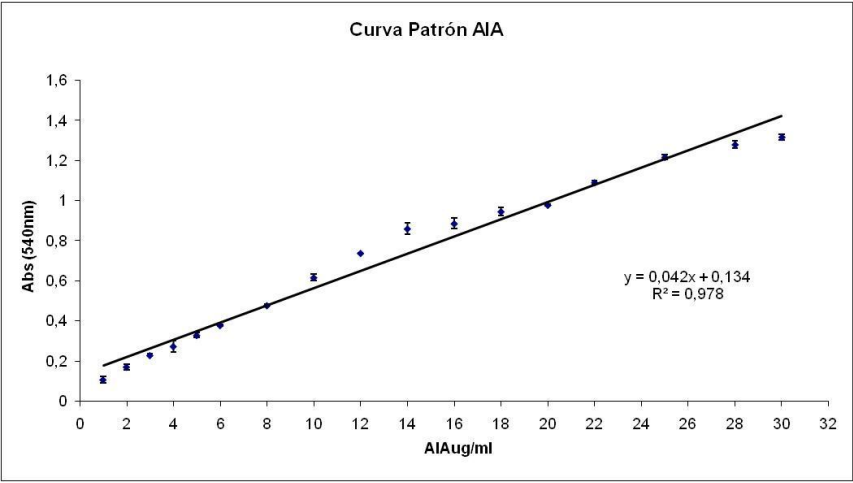
Tabla 7. Análisis de varianza número de nódulos

Origen	SC	GL	CM	F	P
Aislado	1269,65	16	79,35	2,300	*0,023
Error	1069,33	31	34,50		
Total	4277,00	48			

ANEXO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD REDUCTORA DE ACETILENO (ARA) EN BACTERIAS SIMBIÓTICAS



ANEXO 5. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA).



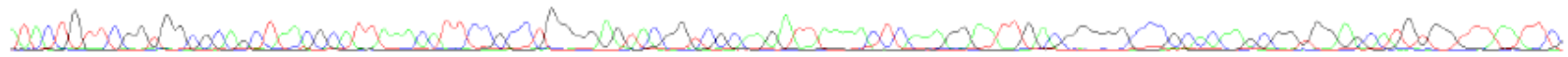
ANEXO 6. CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA CON EL PRIMER 27F DE LA CEPA RC02



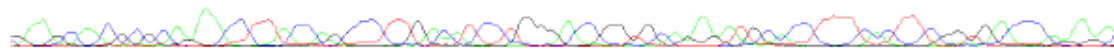
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
CA GTGGCGAAGGCGGC TCAC TGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGC GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG AATGTTAGCCGTCGGGCAGTA



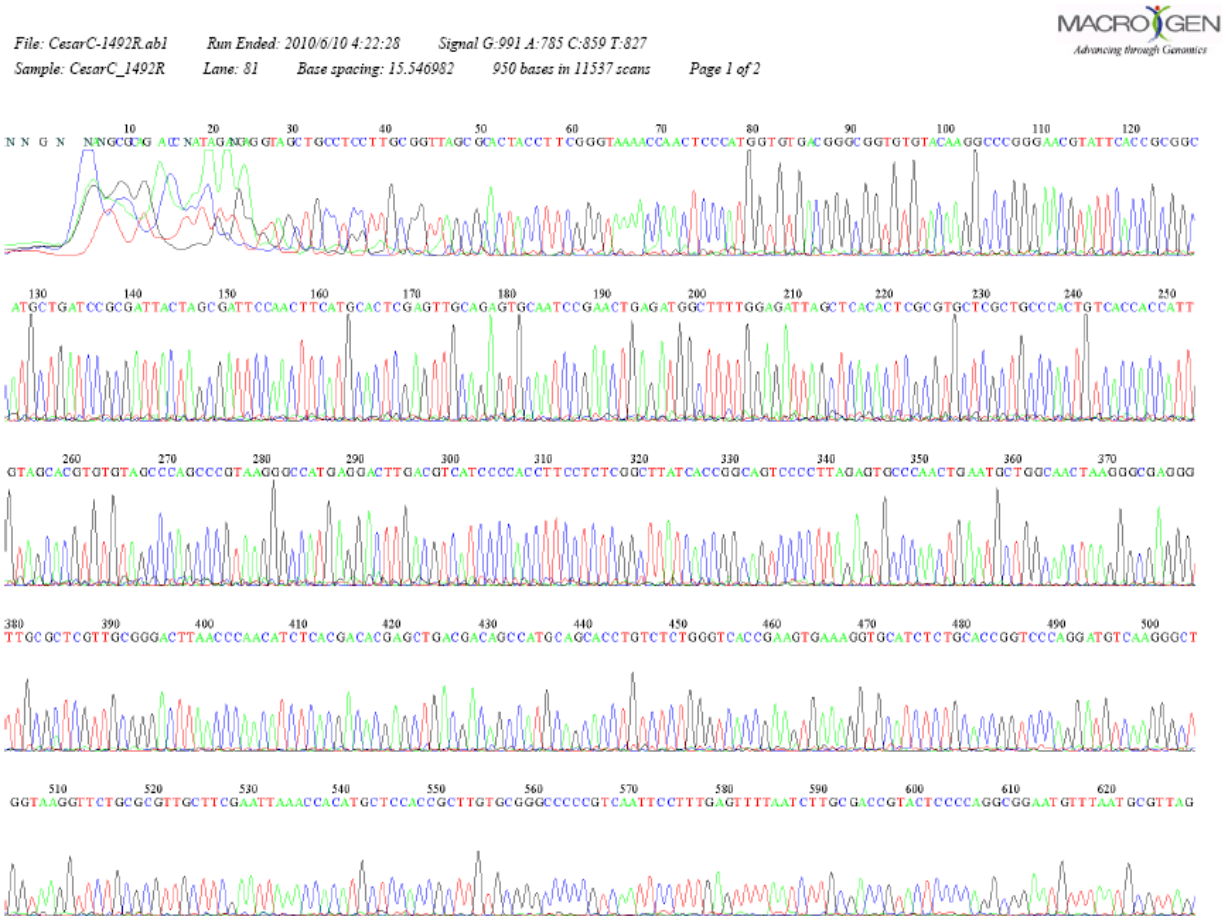
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
TACTGTTGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCGGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC



870 880 890 900 910 920 930 940 950
GAA GCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTT GACATCCTGGGACC GG TGCAGAGATGCACCTTTTCACTTCGGGTGACCCAGAG



ANEXO 7. CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA CON EL PRIMER 1492R DE LA CEPA RC02



File: CesarC-1492R.ab1 Run Ended: 2010/6/10 4:22:28 Signal G:991 A:785 C:859 T:827
Sample: CesarC_1492R Lane: 81 Base spacing: 15.546982 950 bases in 11537 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
CTGCGCCACCGAACAGTATACTGCCGACGGCTAACATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATGGACCAAG



760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
TGAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCCTCTTCCATACCTCCAGACACCCAGTATCAAAGGCAGTTCAGAGTTGA

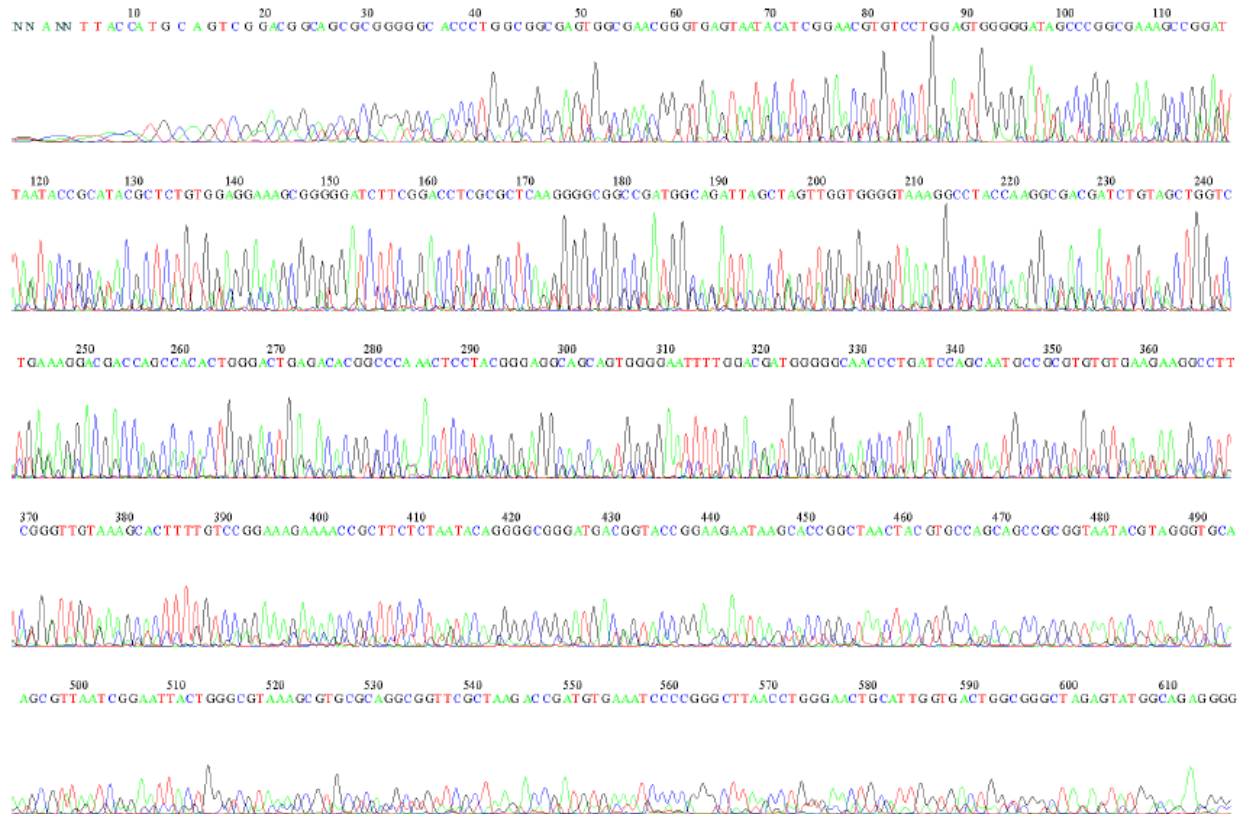


880 890 900 910 920 930 940 950
GCTCTGGGATTTCAACCCCTGACTTAAATGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAAATCCGAACAAAGCTAGCCCCC



ANEXO 8.CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA CON EL PRIMER 27F DE LA CEPA RG02

File: GuajiraE-27F.ab1 Run Ended: 2010/6/10 6:11:2 Signal G:3669 A:6087 C:5595 T:5860
Sample: GuajiraE_27F Lane: 81 Base spacing: 15.390669 950 bases in 11673 scans Page 1 of 2



File: GuajiraE-27F.ab1 Run Ended: 2010/6/10 6:11:2 Signal G:3669 A:6087 C:5595 T:5860
Sample: GuajiraE_27F Lane: 81 Base spacing: 15.390669 950 bases in 11673 scans Page 2 of 2

620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730
GGTAGAATTCCACGTGTAGCAAGGAAATGCGTACAGATGTGGAGGAATACC GATG GC GAAN GCAGCC CCC TGGGCCAAT ACTGACGC TCATGCAC GAAAGCGTGGGAGCAAA CAGGATT



740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850
AGATACCC TGTAGTCCACGCC TAAACGATGTCAAC TAGTTG TCGGGTCTT CATTGACTTGGTAACGAA GCTAAC GC GTG AAGTTGACCGCCTGGGGAGTAC GGTCGCAAG AT TAAAA

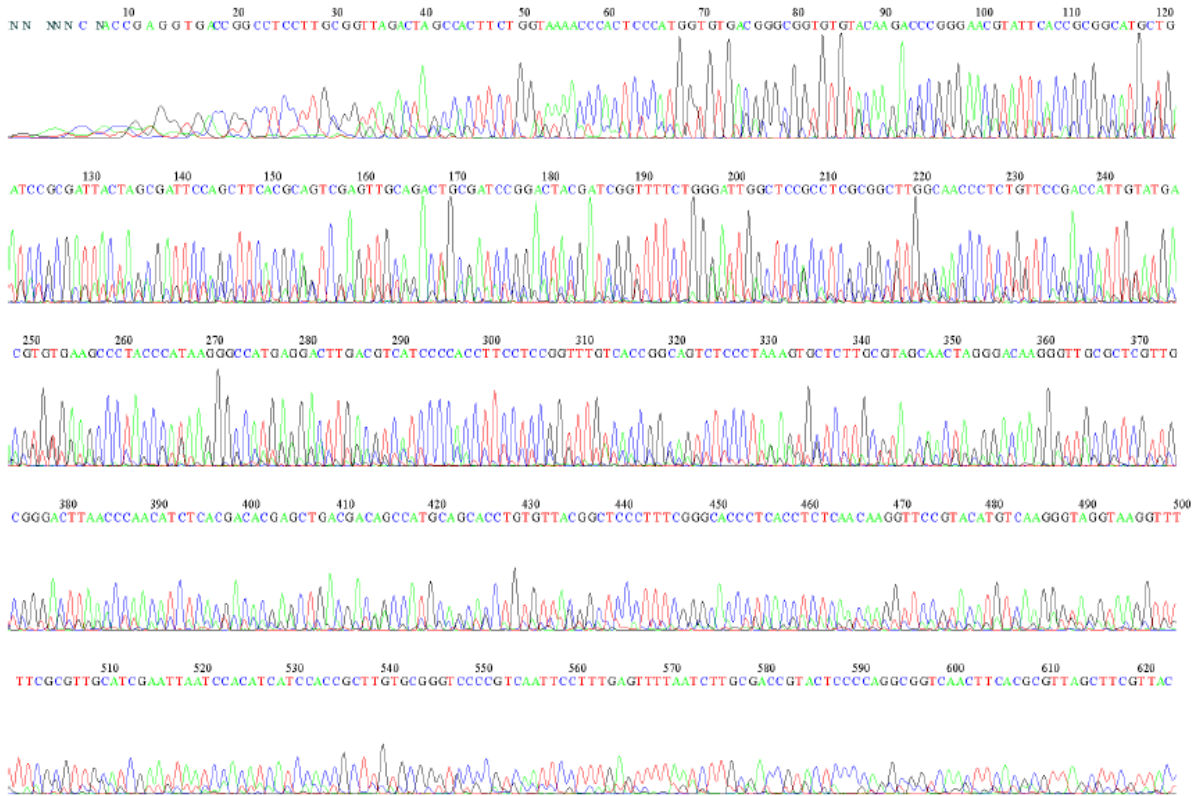


860 870 880 890 900 910 920 930 940 950
CTCAAAGGAATTGACGGG ACCCTACACAA GC GTGGGATGATGTGGATT AATT C GATGCAA CGCGTACAAA CCTTACC TACTCGTTGACATGT



ANEXO 9. CROMATOGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA CON EL PRIMER 1492R DE LA CEPA RG02

File: GuajiraE-1492R.ab1 Run Ended: 2010/6/10 2:33:28 Signal G:4074 A:4132 C:5414 T:5184
 Sample: GuajiraE_1492R Lane: 87 Base spacing: 15.421121 950 bases in 11621 scans Page 1 of 2



File: GuajiraE-1492R.ab1 Run Ended: 2010/6/10 2:33:28 Signal G:4074 A:4132 C:5414 T:5184
Sample: GuajiraE_1492R Lane: 87 Base spacing: 15.421121 950 bases in 11621 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
CAAGTCAATGAA GACCCGACA ACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTG GACTACCAAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGCCCCAGGGGGCTGCC



750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
TTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACACATTTCACTGCTACACGTGGAATTTACCCECCCTTGCCATACTCTAGCCCGCCAGTCACCAATGCAGTTCCAGGTTAA GCCCGGGG



870 880 890 900 910 920 930 940 950
ATTTACACATCTGTCTTAGCGACC GCCTGCCGACGCTTTACGCCAGTAA TTC GATTAAAGCTTGCACCTACGTATCAACC GCC

