



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS. ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS DE
NÓDULOS DE LEGUMINOSAS NATIVAS DEL ESTADO GUÁRICO,
MEDIANTE TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES**

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Yeznaret Arzolay como
requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Biología.

Tutora I: Dra. Marcia Toro

Tutora II: Dra. Palmira Guevara

Caracas
Febrero de 2013

RESUMEN

La familia de las leguminosas (Fabaceae) está conformada por árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y hojas compuestas. Es de distribución cosmopolita, con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies. Su importancia radica en el alto interés comestible y forrajero de varios de sus géneros, y la capacidad de enriquecer de N al suelo, al asociarse endosimbióticamente con bacterias rizobios. Estas bacterias forman estructuras radicales conocidas como nódulos, y poseen la capacidad de fijar el N directamente de la atmósfera, el cual es posteriormente transformado en formas asimilables por la planta. Con la finalidad de caracterizar las bacterias endosimbióticas asociadas con leguminosas nativas de las sabanas de la Estación Experimental La Iguana, Edo. Guárico, se obtuvieron 15 aislados bacterianos provenientes de los nódulos de la leguminosa *Calopogonium sp.*, A fin de conocer la cuantía de estas bacterias en los suelos de sabana se cuantificó la población de rizobios asociado a *Calopogonium sp.*, mediante la técnica de Número más Probable, según Cochran (1950), obteniendo un valor de 0,6 rizobios/g suelo. Seguido se hizo la caracterización bioquímica de los aislados obteniendo que todos son bacilos Gram⁻, oxidasa positivos y no fermentadores de glucosa, que crecen con mucosidad abundante en medio LMA, escasamente en LB, con mucosidad moderada en LLA sin mucosidad en TL, y acidifican el medio LMA-ABT. Se realizó la caracterización molecular de 14 de los 15 aislados empleando la técnica genotípica TP-RAPD, obteniendo 10 perfiles de bandas distintos, donde 3 grupos de aislados presentaron perfiles comunes. Se realizaron pruebas de inoculación, obteniendo que 2 de los 15 aislados presentaron nodulación positiva, siendo identificados como bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*. Se evaluó el efecto de los 15 aislados en el crecimiento de las plantas inoculadas mediante la cuantificación del contenido de N total y biomasa seca del vástago, y la estimación de la eficiencia de fijación de N, los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas entre si ($p > 0,05$). Los aislados B11 y B22 obtuvieron una EFN inferior al 100%.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa

La entrada de nitrógeno molecular en la biosfera es posible, entre otros mecanismos, gracias a la acción de los microorganismos procariotas, los que son capaces de transformar la molécula de dinitrógeno en amoníaco. Este proceso ocurre gracias a que presentan la enzima nitrogenasa, que les permite captar el N₂ de la atmosfera para luego transformarlo en formas asimilables para los mismos microorganismos o las plantas. Los microorganismos participan en varias asociaciones, de las cuales resulta un mayor crecimiento en muchas plantas (González y Lluch, 1992). También se ha encontrado que los rizobios pueden estimular la germinación de semillas y promover el crecimiento de plantas no leguminosas, debido su habilidad para producir hormonas como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquininas y sustancias como la ACC diaminasa reguladoras del crecimiento (Santillana y col., 2005).

Las leguminosas presentan la característica particular de formar relaciones simbióticas con bacterias del orden *Rhizobiales* (Sicardi, 1992). El crecimiento de las leguminosas es directamente afectado por la simbiosis con bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales* (formadoras de nódulos en las raíces), hasta tal punto que su desarrollo tiene lugar independientemente del nitrógeno aportado por el suelo (González y Lluch, 1992).

La palabra simbiosis define la asociación de dos o mas especies organizadas estructural y fisiológicamente; lo cual les permite llevar una vida en común. Puede ser una relación estricta, cuando uno de los organismos implicados no puede llevar vida libre, o facultativa, si el desarrollo de los organismos no depende de la asociación (González y Lluch, 1992). En el caso de la simbiosis rizobio-Leguminosa, se trata de una simbiosis facultativa; debido a que, según Ledgard y Steele (1992), las bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* pueden

sobrevivir en el suelo en ausencia de leguminosas, aunque su población es siempre más alta cuando se encuentran presentes las plantas hospederas. Los exudados radicales estimulan la multiplicación de estas bacterias ya que suministran biotina y tiamina, homoserina y ácido glutámico, necesario para el desarrollo de estas especies; sin embargo, son necesarias determinadas condiciones del suelo para que puedan sobrevivir las bacterias. En el establecimiento de esta simbiosis se pueden diferenciar dos procesos complejos: a) una infección controlada, y b) la aparición de un nuevo órgano en la planta, el nódulo, en el cual se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (Valverde, 2003).

1.1.1 Invasión de la raíz por parte de *Rhizobium*

El preludeo a la infección de las raíces de leguminosas por rizobios es el crecimiento de la bacteria en la rizósfera debido a los exudados radicales; éstos son compuestos de bajo peso molecular, siendo principalmente una mezcla de flavonoides que activan un grupo de genes bacterianos específicos requeridos para la nodulación. Existen otros compuestos, como los isoflavonoides y flavonoides, excretados por la planta, que ejercen un efecto inhibitorio sobre el rizobio. La primera respuesta de la leguminosa tras el contacto con el rizobio es la deformación y curvatura del pelo radical. Análisis genéticos indican que es requerida la activación de genes bacterianos *nod*, *exo* y *nodV* para la producción de estos cambios en los pelos radicales (González y Lluch, 1992). La infección por rizobios ocurre a través de tres vías alternativas: a través del pelo radical, a través de heridas y a través de las células epidérmicas (Valverde, 2003). Luego de la infección se da inicio a una actividad mitótica del córtex de la raíz, dando origen al primordio nodular, el cual dará origen luego de un proceso de maduración, al nódulo (González y Lluch, 1992). Los nódulos formados (Figura 1) pueden ser determinados o indeterminados; siendo cada uno definido por el tipo de meristemo, determinado e indeterminado respectivamente (Valverde, 2003).

1.1.2 Especificidad de hospedador

En líneas generales puede decirse que la mayoría de las cepas de rizobios presentan un grado de promiscuidad bastante amplio. Mientras que por su parte, la capacidad de hospedadoras para entrar en simbiosis con diferentes rhizobia varía enormemente, encontrándose ambos extremos; capacidad de entrar en simbiosis con un número alto de cepas o el caso contrario. Por lo que se concluye que la promiscuidad en la simbiosis está ampliamente difundida en la naturaleza (Valverde, 2003).

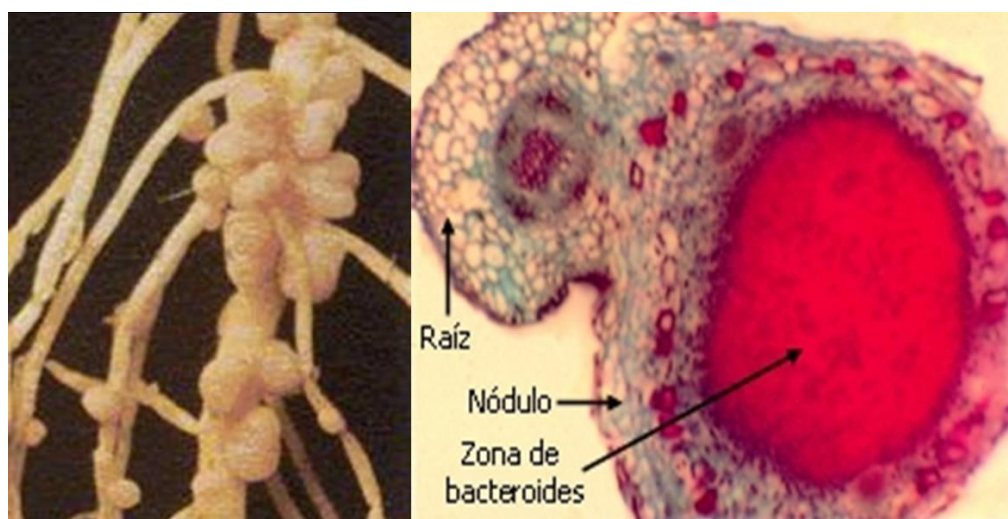
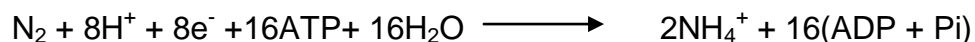


Figura 1. El nódulo. Izq.: Nódulos de *Rhizobium* en raíces de leguminosa. Tomado de: www.fq.uh.cu. Der.: Corte transversal de un nódulo de *Rhizobium* en la raíz de una leguminosa. Tomado de: www.hiperbotanica.net.

1.1.3 Fijación biológica de nitrógeno

La importancia del nuevo órgano formado, el nódulo, es que en él, ocurre la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2) a nitrógeno asimilable para la planta, por lo que es posible que sea incorporado a la cadena trófica (Valverde, 2003). La transformación de nitrógeno atmosférico o dinitrógeno (N_2) hasta amoníaco (NH_3), y finalmente hasta amonio (NH_4^+) mediante un proceso metabólico de reducción, recibe el nombre de “fijación biológica de nitrógeno”. La enzima responsable de dicho proceso de reducción es la nitrogenasa, la cual presenta dos componentes (I y

II) y en presencia de ATP y un sistema transportador es capaz de reducir el dinitrógeno hasta amoníaco (González y Lluch, 1992).



1.2 La familia *Fabaceae*

La familia *Fabaceae* (anteriormente llamada *Leguminosae*) es una de las más amplias del reino vegetal y su importancia económica es extraordinaria; puesto que incluye especies esenciales en la alimentación humana como lo son el garbanzo (*Cicer arietinum*), la caraota (*Phaseolus vulgaris*) y la lenteja (*Lens culinaris*) entre muchas otras, y plantas medicinales como el sen (*Cassia acutifolia*), usada como purgante, y la retama negra (*Cytisus scoparius*) usada en tónicos cardíacos.

Las plantas de esta familia pueden ser hierbas, arbustos o árboles, con una gran diversidad de hábitats, incluyendo plantas acuáticas, trepadoras y fuertemente xerofíticas (Valverde, 2003). Además, las especies de esta familia habitan en las más variadas regiones del mundo (Sicardi, 1992), por lo que pueden ser usadas ampliamente por el hombre.

Las hojas de estas plantas son normalmente compuestas y en algunos casos simples. Las flores son pentámeras. Existen tres subfamilias que se distinguen por la disposición de sus piezas florales. La subfamilia *Mimosoideae* presenta flores regulares con muchos estambres de largos filamentos.

La subfamilia *Caesalpinoideae* presenta flores irregulares, con pétalos laterales llamados alas, cubriendo el estandarte en el capullo. Y la subfamilia *Papilionoideae*, con flores irregulares y amariposadas, con el estandarte envolviendo a los otros pétalos en el capullo (Valverde, 2003). La planta empleada en el presente trabajo es *Calopogonium sp.*, la cual se describe a continuación.

1.2.1 *Calopogonium sp.*

Esta especie presenta la siguiente clasificación taxonómica (Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia; Herbario nacional de Venezuela), y la planta, su flor, fruto y hoja se muestran en la figura 2.

Nombre Científico: *Calopogonium sp.*

Reino: *Plantae*

Phylum: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae* (antigua *Leguminosae*)

Subfamilia: *Papilionoideae* (o *Faboideae*)

Género: *Calopogonium*

Epíteto Específico: *sp.*



Figura 2. *Calopogonium sp.* **Izq.:** Flor de *Calopogonium sp.* Tomada de: www.panoramio.com. **Centro.** Fruto Del género *Calopogonium*. Tomada de: blog.pindiscount.com. **Der.:** Hoja del género *Calopogonium*. Tomada de: flickrhivemind.net.

1.3 Los *Rhizobia*

Se conoce como *Rhizobia* a aquellas bacterias pertenecientes al orden *Rhizobiales*. A lo largo de las décadas la clasificación de los miembros de esta taxa ha sufrido multitud de cambios. La actual familia *Rhizobiaceae* contiene los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium*; y se incluye dentro del orden *Rhizobiales* (Figura 3). A continuación se muestra la clasificación expuesta en

la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, la cual esta en continua modificación, habiéndose descrito hasta la actualidad mas de cincuenta especies nuevas; por lo que se debe considerar abierta (Valverde, 2003).

Dominio Bacteria	
Phyllum BXII. Proteobacteria	
Clase I. α-Proteobacteria	
Orden VI. Rhizobiales	
Familia I. Rhizobiaceae	
Género I. <i>Rhizobium</i>	Frank 1889
Género II. <i>Agrobacterium</i>	Conn 1942
Género III. <i>Allorhizobium</i>	de Lajudie <i>et al.</i> 1998a
Género VII. <i>Sinorhizobium</i>	Chen <i>et al.</i> 1988
Familia IV. Phyllobacteriaceae	
Género I. <i>Phyllobacterium</i>	Knösel 1984
Género V. <i>Mesorhizobium</i>	Jarvis <i>et al.</i> 1997
Familia VII. Bradyrhizobiaceae	
Género I. <i>Bradyrhizobium</i>	Jordan 1982
Familia VIII. Hyphomicrobiaceae	
Género VI. <i>Azorhizobium</i>	Dreyfus <i>et al.</i> 1988

Figura 3. Clasificación de la Familia Rhizobeaceae

(2ª edición *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*). Tomada de: Valverde (2003).

1.3.1 El género *Rhizobium*

Son bacilos que miden 0.5-1.0x1.2-3.0 μm . Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en YMA. El crecimiento en medio de carbohidratos generalmente está acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de gelatina polisacárida extracelular. Son quimio-organotróficas, utilizando una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos. Algunas cepas requieren biotina, ácido nicotínico, pantotenato o tiamina como factores de crecimiento. Las cepas de este género son rizobios de rápido crecimiento productores de ácido en YMA (Tao y col., 2010).

La historia de estos organismos tiene sus inicios en el año 1888, cuando a partir de un nódulo de raíz de leguminosa, Beijerinck obtuvo por primera vez un cultivo bacteriano puro y llamó a la bacteria *Bacillus radicicola*. Posteriormente, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Debido a que los aislados bacterianos eran diferentes según el hospedero específico del que se obtenían, para 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. En esta clasificación, cada especie era un grupo que se componía de cepas que nodulaban a un conjunto de leguminosas huésped (Tao y col., 2010).

Trabajos posteriores desafiaron esta designación de especies que estaba basada en la especificidad del hospedero. En 1944 Wilson reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies. En 1964 Graham y en 1968 Moffett y Colwell sugirieron modificar la taxonomía y basarse en resultados de la taxonomía numérica. Más tarde, en 1974, Jordan y Allen dividieron las seis especies en dos grupos de acuerdo con sus tasas de crecimiento, flagelos y reacciones ácidos/alcalinas en medio YMA (Yeast Manitol Agar – Agar Manitol Levadura) (Tao y col., 2010).

Actualmente la taxonomía de los rizobios se desarrolla rápidamente y durante los últimos 20 años se han descrito muchas especies y géneros nuevos. La aplicación de los métodos de biología molecular en la taxonomía ha ayudado a definir los nuevos rizobios. La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras. El uso del enfoque polifásico ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable (Tao y col., 2010).

1.4 Técnicas usadas en la caracterización de rizobios

Actualmente se emplean, en líneas generales, dos grupos de métodos en las investigaciones taxonómicas y de identificación de microorganismos: Los métodos

genotípicos y los métodos fenotípicos. Los primeros son aquellos que van dirigidos hacia el estudio de las moléculas de ARN y ADN. Mientras que los segundos van dirigidos hacia el estudio del fenotipo (expresión del genotipo), el cual está sujeto a las condiciones ambientales. Los métodos fenotípicos comprenden estudios químicos, bioquímicos y estructurales, entre otros (Valverde, 2003). Ambos métodos son necesarios y brindan información importante para el estudio de los microorganismos, por lo que van de la mano en los estudios de diversidad y biología de microorganismos.

El estudio que se propone en el presente trabajo se basará en la caracterización microbiológica y molecular, y la estimación de la eficiencia de fijación de nitrógeno, de las bacterias nativas de suelos del estado Guárico provenientes de nódulos de la leguminosa *Calopogonium sp.* Se aplicará específicamente la técnica basada en la PCR (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), TP-RAPD (por sus siglas en inglés: Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA). La característica definitoria de la técnica TP-RAPD es que utiliza como cebadores dos oligonucleótidos de aproximadamente 20 nt, que hibridan en regiones conservadas del ADNr 16S (genes cromosómicos que codifican para las proteínas componentes del ribosoma), y una temperatura de annealing de 50°C (Rivas y col., 2001; Rivas y col., 2002).

La técnica TP-RAPD genera distintos grados de discriminación, dependiendo de la región de reconocimiento de los dos oligonucleótidos en la molécula de ADN, dando como resultado un patrón de bandas en el gel de electroforesis específico y conservado. Se ha reportado que estos perfiles están asociados a especies y a subespecies; por lo que son usados como huellas moleculares de identificación en estudios de diversidad de microorganismos (Rivas y col., 2002). Los perfiles de bandas presentan las siguientes propiedades: no dependen del contenido plasmídico, son estables durante el ciclo de crecimiento de los microorganismos, y se mantienen en las cepas de la misma subespecie (Valverde, 2003); ofreciendo una

herramienta confiable en la caracterización de diversidad genética en microorganismos.

1.5 Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa para el suelo

El suelo puede definirse desde dos enfoques principales, el pedológico y el edafológico. En la pedología, el suelo es considerado un cuerpo natural, originado a partir de la interacción de procesos climáticos, físicos y biológicos y está conformado por componentes gaseosos, acuosos, minerales y biológicos. Por otro lado, para la edafología, el concepto de suelo se maneja en relación al uso del mismo para el crecimiento de plantas aprovechadas por el humano como recurso (Casanova, 2005).

La fertilidad de suelo consiste en la capacidad de poder suministrar las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sánchez, 2007). La fertilidad de los suelos comprende cinco factores: composición química, estructura física, condiciones climáticas, prácticas de cultivo y microorganismos. Sin estos últimos se ha comprobado que el cultivo de las plantas se verifica con dificultad; siendo los suelos más fértiles aquellos que poseen floras microbiológicas elevadas (González y Lluch, 1992). La flora considerada como específicamente relacionada con la fertilidad de los suelos está representada principalmente por el grupo de las bacterias autótrofas quimiosintéticas (entre las que destacan géneros como el *Nitrobacter* y las *Siderobacterias*) y las heterótrofas fijadoras de nitrógeno tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, entre otras (González y Lluch, 1992).

En la actualidad, en Venezuela, cuyas sabanas se caracterizan por presentar suelos ácidos y de fertilidad moderada, se siembran cultivares con altos requerimientos nutricionales (Bravo y col., 2004), lo que ha generado un uso indiscriminado de insumos (fertilizantes, enmiendas y plaguicidas en general) para poder llevar el suelo a las exigencias de estos cultivos de poca adaptación a los

suelos ácidos venezolanos. Esto ha generado el deterioro del recurso suelo. En respuesta a estas deficiencias en el manejo de los suelos, se hace necesaria la implementación de biotecnologías amigables que mejoren la productividad de los cultivos sin perjudicar el ambiente; en pro de la sostenibilidad de estos sistemas (Toro, 2007). Por lo tanto, se hace imperativo investigar la efectividad de los microorganismos con capacidad biofertilizante autóctonos de los suelos tropicales (entre los cuales *Rhizobium* presenta un papel muy importante) y la formulación de biofertilizantes con dichos organismos nativos, para su uso en sistemas naturales, agroecosistemas y/o en recuperación de suelos degradados (Toro, 2007).

2. ANTECEDENTES

En 1992, Sicardi realizó un estudio sobre 40 especies de leguminosas nativas en una unidad de producción perteneciente a la Estación Experimental La Iguana, Edo. Guárico. En su trabajo analizaron la distribución de las especies en esa sabana según las características de los suelos; encontrando que un mayor número de especies de leguminosas se presentaba en suelos arenosos. De igual forma encontraron un efecto estacional inducido por las lluvias, cuya consecuencia fue un aumento en el número de especies de leguminosas, el número de individuos nodulados y el tamaño de las poblaciones nativas de *Rhizobium* en los diferentes horizontes de los suelos. También fue llevado a cabo un análisis comparativo del proceso de fijación simbiótica de N₂ entre especies nativas. Posteriormente, Sicardi e Izaguirre (1994) realizaron una descripción de 32 géneros de leguminosas nativas (40 especies), estimando un aporte significativo de nitrógeno por varias simbiosis y detectaron cepas de rizobios nativos eficientes para frijol (*Vigna unguiculata*), y cepas de *Bradyrhizobium* tolerantes a la acidez

Madrid (2007) realizó una caracterización e identificación de los rizobios asociados a la leguminosa *Centrosema macrocarpum*, nativa de sabanas venezolanas del Edo. Guárico, en la Estación Experimental La Iguana. La caracterización fue de tipo fisiológica y bioquímica, por lo que se evaluó entre

algunos aspectos de las cepas aisladas, como la fuente de carbono, el crecimiento a distintos intervalos de pH y en diferentes concentraciones de sales. En este trabajo se aislaron ocho cepas con características de rizobios y se encontró que algunas de ellas poseían capacidad de solubilizar fosfatos y de producir sideróforos. De todos los aislados, se observó que dos poseían alta eficiencia simbiótica y fueron recomendadas como posibles biofertilizantes.

Bravo y col., (2004), evaluaron la influencia de diferentes coberturas sobre las propiedades físicas de un suelo de sabana cultivado de maíz, localizado en la Estación experimental La Iguana, estado Guárico. El estudio se realizó utilizando siembra directa de maíz sobre cada una de las coberturas analizadas, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria dictyoneura*, *Centrosema macrocarpum*, y vegetación natural como testigo. Las propiedades físicas del suelo: densidad aparente, distribución de tamaño de poros, resistencia a la penetración, conductividad hidráulica saturada y capacidad de retención de humedad, se evaluaron a través de muestreo de parcelas grandes. Luego de dos años de evaluación, los índices estructurales fueron mantenidos o mejorados en todas las coberturas y se demostró la factibilidad de implantación de los sistemas de manejo evaluados.

Rivas y col. (2001), realizaron un amplio estudio del alcance de la técnica TP-RAPD, donde es propuesta como una técnica de huella molecular para el estudio de diversidad de microorganismos. Esta técnica consiste en el uso de dos oligonucleótidos que amplifican un fragmento único de ADN, correspondiente al ADNr 16S, usando una temperatura de annealing de 50°C, que genera una serie de amplicones que conforman un arreglo en particular para cada especie bacteriana. En este estudio analizaron varios géneros de bacterias, varias especies del mismo género, y varias cepas de la misma especie, algunas de ellas con diferentes perfiles de plásmidos, de crecimiento rápido y lento. En sus resultados encontraron que el patrón de bandas obtenido mediante la técnica TP-RAPD es diferente para cada especie. Los patrones son idénticos en PCR diferentes, con distintas extracciones de ADN, y para distintas etapas de crecimiento del cultivo bacteriano. En este estudio

demonstraron que los perfiles de bandas generadas por el TP-RAPD no muestran variaciones debido al contenido de ADN plasmídico.

Valverde (2003) realizó un estudio de los microorganismos endosimbiontes a partir de nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en suelos de montaña del Noroeste de Portugal, característicos por ser sometidos a técnicas de cultivo tradicional, sin abonos químicos durante generaciones. El estudio se abordó mediante la taxonomía polifásica de las cepas aisladas mediante la utilización de métodos fenotípicos y genotípicos. Dentro de los varios métodos genómicos basados en la PCR empleados en este trabajo se encuentra el TP-RAPD. La caracterización permitió la identificación de todas las 186 cepas de microorganismos aislados a nivel de especie y/o subespecie. De acuerdo con los resultados obtenidos el 97% de las cepas fueron identificadas como *Rhizobium* (*R. rhizogenes* con 82% y *R. tropici* con 15%). De acuerdo con los resultados de los perfiles de TP-RAPD dentro de la especie *R. rhizogenes* podía haber mas de una subespecie, sin embargo fueron recomendados estudios posteriores.

Marquina y col. (2011), hicieron una caracterización fenotípica, un análisis por PCR- RFLP del gen rDNA 16S y un perfil plasmídico de aislados rizobianos de diversas regiones de Venezuela (Estados Mérida, Lara, Miranda, Monagas y Bolívar), con el objetivo de generar un aporte al conocimiento de la diversidad rizobial del país. El trabajo fue realizado con 12 aislados rizobianos venezolanos y 10 cepas de referencia internacionales, evaluando la presencia de plásmidos grandes, análisis metabólicos en medios sólidos, resistencia a la salinidad, condiciones del crecimiento a diferentes valores de pH y temperatura, y la resistencia intrínseca a antibióticos. La evaluación de las cualidades fenotípicas y los resultados del PCR-RFLP permitieron diferenciar tres grupos. Los miembros del grupo A demostraron una estrecha relación con *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Sinorhizobium americanum* CFN-EI156, mientras que el grupo B se mostró estrechamente vinculado a *Bradyrhizobium* spp. El grupo C estuvo representado por solo un aislado. Una única cepa fue capaz de formar nódulos y no mostró relación con ninguna cepa de referencia. En este estudio se

obtuvieron evidencias de diversidad genética en las cepas rizobianas venezolanas. Los autores proponen que el origen geográfico diverso de estas cepas podría ser un factor importante que influye en la diversidad de los rizobios indígenas utilizados.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si en los suelos ácidos de sabana se desarrolla la leguminosa *Calopogonium sp.*, su presencia en dichos suelos estaría sustentada por la asociación simbiótica con bacterias rizobios. La asociación simbiótica de la especie *Calopogonium sp.* podría establecerse con una o varias cepas de rizobios autóctonas de suelos ácidos y éstas podrán mostrar diferencias en su genoma y en la eficiencia de fijación de nitrógeno.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar genéticamente mediante la técnica TP-RAPD a los rizobios asociados a la leguminosa nativa de sabanas venezolanas *Calopogonium sp.* y evaluar su efecto sobre el crecimiento de esta planta.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar cepas de rizobios a partir de nódulos de plantas de *Calopogonium sp.* provenientes de la Estación Experimental La Iguana, Estado Guárico.
2. Cuantificar mediante el método de Número Mas Probable (NMP) la diversidad de rizobios, capaces de formar una relación simbiótica con *Calopogonium sp.*, presentes en los suelos de la Estación Experimental La Iguana, Estado Guárico.
3. Caracterizar genéticamente mediante el ensayo TP-RAPD a los rizobios aislados a partir de muestras de suelo colectadas en campo.

- Realizar pruebas de nodulación y eficiencia de fijación de nitrógeno de plantas de *Calopogonium sp.* con los rizobios aislados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El planteamiento experimental diseñado para el logro de los objetivos inició con el aislamiento bacteriano de nódulos radicales de la especie *Calopogonium sp.*, a partir de plantas recolectadas en la Estación Experimental La Iguana y de plantas noduladas en condiciones de vivero a partir de muestras de suelo de la zona. Luego se realizó la caracterización bioquímica de los aislados bacterianos utilizando medios de cultivo para su identificación, seguido de la caracterización molecular mediante TP-RAPD para la evaluación de diversidad, y del análisis de la capacidad de formación de nódulos y de fijación de N. En la figura a 4 se muestra el esquema general de los materiales y métodos usados en la parte experimental del presente trabajo:



Figura 4. Esquema general metodológico de los pasos realizados en el trabajo experimental del proyecto.

4.1 Área de estudio

La zona de estudio se ubica al sureste del Estado Guárico; Municipio Santa María de Ipire ($8^{\circ} 25' N - 65^{\circ} 24' W$) (Figura 5), en una región de sabanas no inundables, de *Trachypogon spp.* comprendida dentro de los límites de la “Estación Experimental La Iguana” de la Universidad Simón Rodríguez (Sicardi, 1992).

A continuación se presenta la descripción ambiental del área de estudio (Tabla 1) (Madrid, 2007).

Tabla 1. Características ambientales de la Estación Experimental La Iguana.

<i>Clima</i>	Precipitación promedio anual: 1369 mm Temperatura promedio: 27.3 °C Evapotranspiración: 2300 mm Meses Secos: 6 (ver figura 2)
<i>Uso del Suelo</i>	Ensayo Sistema de Manejo Conservacionista (Maíz – Ganado)
<i>Ambiente</i>	Estructura Geológica: Cuenca Sedimentaria
<i>Geomorfológico</i>	Provincia Fisiográfica: Llanos Región Natural: Llanos Orientales Paisaje: Planicie de Denudación Relieve: Colinoso Forma de Terreno: Plana
<i>Pendiente</i>	Convexa, 3-5 %, E-O.
<i>Altitud msnm</i>	104 m
<i>Material Parental</i>	Formación Chaguaramas
<i>Drenaje</i>	Externo: Rápido Interno: Moderado
<i>Permeabilidad</i>	Moderada
<i>Clase de Drenaje</i>	Moderadamente Bien Drenado
<i>Erosión</i>	Laminar superficial

Tomado de: Madrid (2007).

En cuanto a las características del suelo del área de estudio, en líneas generales, el mismo presenta valores de pH bajos (alrededor de 5), disponibilidad de nutrientes reducida, fertilidad pobre, y bajo contenido de MO; lo cual es indicativo de una actividad biológica relativamente baja. La textura es del tipo aF (areno-Francosa), la cual aporta un buen drenaje, sin embargo, la retención de humedad es baja (Madrid, 2007).

En la figura 6 se muestra el climadiagrama correspondiente a la zona central del Estado Guárico (Pérez y Sanhueza, 1993).

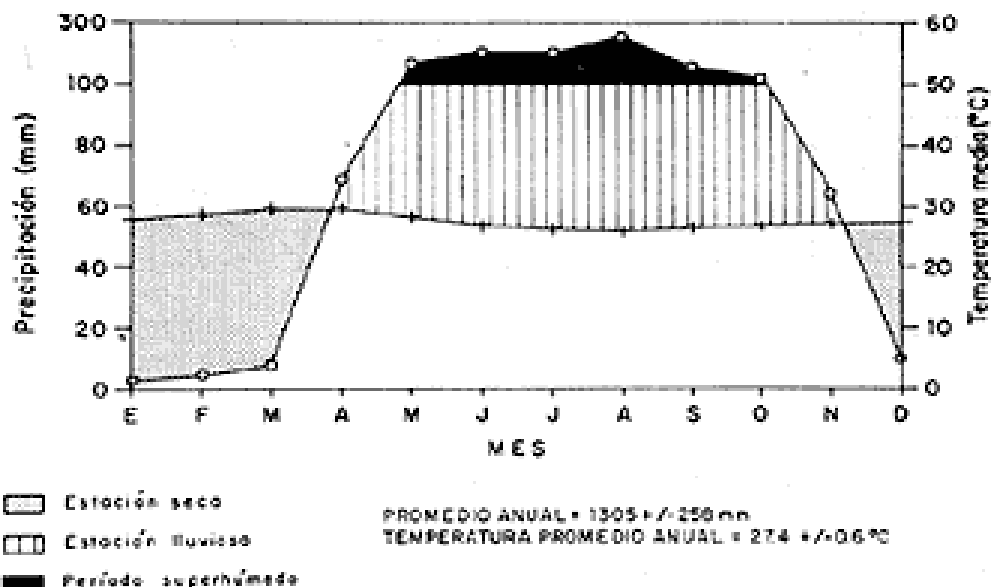


Figura 6. Climadiagrama de la zona del centro de Guárico.

Tomado de: Pérez y Sanhueza (1993).

El suelo de la zona está identificado como un Typic Plinthustult, Fg, caolinítico, isohipertérmico, caracterizado por una textura liviana hasta los 35 cm (aF, Fa), y por la presencia de una mesa de agua fluctuante (Madrid, 2007). La tabla 2 muestra los valores obtenidos para los parámetros fisicoquímicos del suelo de la Estación Experimental La Iguana en el 2005.

Respecto a la vegetación, la Estación Experimental La Iguana presenta una vegetación natural de sabanas de *Trachypogon* sp., acompañado de un componente leñoso conformado por las especies típicas de dichas sabanas: Chaparro (*Curatella americana*), Manteco (*Byrsonima crassifolia*) y Alcornoque (*Bowdichia virgilioides*) (Madrid, 2007).

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del suelo de las parcelas de la Estación Experimental La Iguala

P (cm)	Are %	L %	Arc %	T	pH	C. E mS.cm ⁻¹	Acidez I cmol ⁺ .kg ⁻¹	Al I cmol ⁺ .kg ⁻¹	CIC cmol ⁺ .kg	M.O g.kg ⁻¹	P mg/Kg	K mg/Kg	Ca mg/Kg	Mg mg/Kg	Na mg/Kg
0-14	85	12.5	2.5	aF	4.6 FAc	16.5 (NS)	1.15	0.39	3.92 (B)	14.9 (B)	7.43 (B)	44,0 (M)	61.6 (B)	28.4 (B)	15
14-25	85	12.5	2.5	aF	4.15 FAc	8.1 (NS)	1.34	0.56	4.22 (B)	14.4 (B)	4.86 (B)	30.8 (B)	57.2 (B)	37.2 (B)	20

Tomado de: Hernández y col. (2005).

Nomenclatura: P: profundidad, Are: arena, L: limo, Arc: arcilla, T: textura; CIC: capacidad de intercambio catiónico; M.O: materia orgánica; aF: areno-Francosa, Fa: Franco-arenosa; FAa: Franco-arcillo-arenoso; NS: No salino; EAc: Extremadamente ácido; FAc: Fuertemente ácido; A: Alto, M: Medio; B: Bajo; I: intercambiable.

4.2 Muestreo en campo

4.2.1 Recolección de plantas con raíces noduladas

Se recolectaron en el campo cuatro individuos pertenecientes a la especie *Calopogonium sp.* con nódulos presentes en sus raíces, ubicadas en puntos distantes unos de otros in extenso de la Estación Experimental La Iguana. Fueron transportadas al Laboratorio de Estudios Ambientales (LEA), perteneciente al Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), en bolsas plásticas con su respectivo suelo rizosférico; donde luego se procedió a realizar el tratamiento pertinente a los nódulos para el aislamiento de las bacterias.

4.2.2 Recolección de muestras de suelo

Se recolectaron muestras de suelo rizosférico proveniente de la parcela del ensayo agroecológico (del proyecto *Manejo de la diversidad biológica en un sistema agrosilvopastoril como alternativa para la producción cereal-ganado en los llanos centrales venezolanos*, financiado por el CDCH-UCV PG-03-7884-2009) en el área de estudio. Las muestras fueron tomadas de la porción del suelo ubicada a una profundidad de 10 cm; en la cual abundan raíces de plantas nativas de la zona. Posteriormente fueron llevadas al LEA del IZET, donde fueron empleadas en los ensayos de NMP y en los ensayos de nodulación.

4.3 Cuantificación de las poblaciones nativas de rizobios por Número Más Probable (NMP) (Cochran, 1950)

Para realizar el ensayo de NMP se tomaron 10 g de suelo y se mezclaron con 90 mL de medio líquido estéril de Norris y Date (1976) en un matraz; a partir de esta solución resultante se realizaron diluciones seriadas 1/10 en volúmenes finales de 10 mL hasta un factor de dilución de 10^{-5} . Se inocularon plántulas pertenecientes a la especie *Calopogonium sp.* con 2mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} de suelo.

Se realizó el ensayo a dos valores distintos de pH, 4,5 y 6,8; con la finalidad de observar si el cambio en este parámetro mostraba resultados diferentes en la nodulación. Se colocaron dos plántulas de una semana de crecimiento en cada tubo de ensayo de 30 x 2,5cm. Se trabajó con 4 tubos por cada dilución, dando un total de 16 tubos; cada tubo contenía 9 mL de medio nutritivo sólido Norris y Date (1976) libre de N (Tabla 3. Apéndice A) (CIAT 1988) al pH correspondiente en cada caso.

Posteriormente las plantas fueron llevadas al vivero del LEA del IZET por 6 semanas. Se evaluó la presencia de nódulos en la raíz cada siete días y se contó el número de plantas con nódulos. Para la cuantificación se utilizó la tabla de NMP según Zúñiga (2008); y los resultados fueron expresados como número de células rizobios/g suelo.

4.4 Obtención de aislados bacterianos a partir de nódulos radicales de *Calopogonium sp.*

Para la obtención de los aislados bacterianos se seleccionaron nódulos provenientes de raíces de plantas de *Calopogonium sp.*, las recolectadas en campo y las noduladas en el ensayo de NMP. El aislamiento bacteriano se realizó siguiendo una serie de procedimientos descritos a continuación. Todas las evaluaciones se realizaron a 28 °C.

4.4.1 Tratamiento de los nódulos

Se lavaron cuidadosamente las raíces de cada una de las plantas con agua corriente. Se cortaron con un bisturí los nódulos de las raíces de *Calopogonium sp.*, colocándolos en placas de Petri estériles. Luego se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio comercial al 0,35% por espacio de 5 min. Posteriormente se realizaron 5 lavados sucesivos con agua destilada estéril, de 2 min de duración c/u (Ferrera y col., 1993).

4.4.2 Aislamiento bacteriano a partir de los nódulos

Se procedió a macerar los nódulos desinfectados con una varilla de vidrio, en condiciones de esterilidad. El macerado se sembró en placas de Petri con medio LMA-RC (Levadura Manitol Agar - Rojo Congo) (Tabla 4. Apéndice A) por el método de estrías paralelas; disponiendo 4 macerados por placa. Se incubaron las placas a 28°C por un período de 4 días, realizando revisiones diarias. Las colonias visibles que mostraron las características morfológicas de las colonias de rizobios fueron aisladas en medio LMA-RC con siembras sucesivas, hasta obtener colonias libres de contaminaciones. Las colonias obtenidas fueron mantenidas en placas LMA-RC (Zúñiga, 2008).

4.5 Caracterización microbiológica de los cultivos bacterianos aislados

4.5.1 Tinción Gram

Se realizó la tinción Gram a cada uno de los aislados. Esta técnica se realiza mediante la aplicación de colorantes sobre un frotis bacteriano; se inicia añadiendo al frotis el colorante cristal violeta, seguido de lugol (disolución de yodo molecular I₂ y yoduro potásico KI en agua destilada) para la coloración de las bacterias Gram positivas, y por último se añade el colorante orgánico safranina para la coloración de las bacterias Gram negativas. En los pasos intermedios entre cada colorante y el lugol se lavó el frotis con el solvente indicado, en cada caso alcohol/acetona en proporción 3:1 respectivamente. Al realizar esta prueba se observa en el microscopio óptico el tipo de bacteria y la coloración de la pared celular.

Se considera un organismo Gram positivo cuando la bacteria muestra una coloración violeta, y se considera un Gram negativo cuando la bacteria muestra una coloración rosa.

Caracterización bioquímica de los aislados bacterianos mediante el crecimiento en medios de cultivo

4.5.2 Reacción en el medio Levadura Manitol Agar con Azul de BromoTimol (LMA-ABT)

Se evaluó la producción de acidez o alcalinidad en medio LMA con el indicador de pH azul de bromotimol o ABT (Tabla 5. Apéndice A). Este ensayo permite la diferenciación entre el género *Rhizobium* y los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. El primero produce la acidificación de este medio generando un viraje a color amarillo; mientras que los segundos producen la alcalinización del mismo generando un viraje a color azul intenso (Cuadrado y col., 2009).

4.5.3 Crecimiento en el medio Levadura Lactosa Agar (LLA)

Se sembraron los cultivos aislados en placas con medio LLA (Tabla 6. Apéndice A) por estrías paralelas. Se incubaron a 28°C por un período de 3 días, y se observó el crecimiento. En esta prueba es posible diferenciar entre los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, debido a que los segundos usan pocos disacáridos y por ende no crecen bien en este medio que tiene lactosa; mientras que los primeros si (Zúñiga, 2008).

4.5.4 Crecimiento en el medio agar Luria Bertani (LB)

Se sembraron los cultivos aislados en placas con medio LB (Tabla 7. Apéndice A) por agotamiento. Se incubaron a 28°C por un período de 3 días y se observó el crecimiento. Un buen crecimiento de la bacteria no corresponde a los rizobios, pues éstos en su gran mayoría no presentan un buen crecimiento en este medio (Zúñiga, 2008).

4.5.5 Crecimiento en el medio Triptona Levadura Agar (TLA)

Se sembraron los cultivos aislados en placas con medio TLA (Tabla 8. Apéndice A) por estrías paralelas. Se incubaron a 28°C por un período de 3 días y se observó el crecimiento (Rivilla y col., 2006). Los rizobios presentan un escaso crecimiento en este medio; siendo el empleado para cultivarlas previo a la extracción de ADN debido a que en este medio los cultivos muestran ausencia de la mucosa de polisacáridos característica de estos grupos, la cual es producida de forma muy abundante por los mismos en el medio LMA y ocasiona interferencia en el proceso de extracción de ADN.

4.5.6 Prueba de la oxidasa

Los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación final de agua. La siguiente prueba permite la detección de la citocromo c oxidasa.

Se tomó un cultivo de 48 horas de cada uno de los aislados, crecido en placas Petri con medio TLA para obtener las colonias translúcidas y sin mucosa. Con un palillo de madera estéril se tomó una colonia bacteriana y se trazó una línea sobre una tira de papel de filtro impregnada en solución acuosa al 1% de clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina (producto de color azul), colocada sobre una placa Petri limpia.

Se considera el ensayo como “positivo” cuando aparece un color azul profundo en un tiempo menor a 10 segundos. Se considera “positivo lento a confirmar” cuando el color aparece entre 10 y 60 segundos. Y se considera “negativo” cuando no hay desarrollo de color o cuando se produce en un tiempo mayor a 60 segundos (Guía Práctica de Microbiología, 1999).

4.5.7 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kligler (KIA)

El KIA es un medio sólido diferencial; cuyo fundamento se basa en la capacidad de fermentación de dos azúcares, glucosa y lactosa, en la producción de ácido sulfhídrico y en la producción de gas. Esta prueba se suele usar en la identificación inicial de bacilos Gram negativos. El ensayo consiste en inocular tubos de ensayo grandes con agar hierro Kligler inclinado usando un asa de siembra, tomando microorganismos de cada cultivo analizado y haciendo una picadura hasta el fondo del tubo, continuando la siembra por estría en la superficie. Se incubaron los tubos a 28°C (en este caso por ser la temperatura óptima para los rizobios) durante 24 horas y se observaron los resultados.

4.5.8 Preservación de los aislados bacterianos

Colonias tomadas de cada uno de los aislados bacterianos obtenidos fueron inoculadas en punciones de medio LMA, a temperatura ambiente (25-30 °C). Posteriormente, los aislados serán liofilizados para su preservación.

4.6 Caracterización molecular

Una vez obtenidos y caracterizados microbiológicamente los diferentes cultivos puros, se procedió a realizar la extracción de ADN para la realización de las pruebas de PCR.

4.6.1 Aislamiento de ADNg de cultivos bacterianos

Para la extracción de ADN se partió de colonias aisladas de cultivos puros provenientes de los nódulos, crecidos en medio TLA por 48 horas. Diez mL de medio TLA líquido fueron inoculados con una colonia y crecido a 28°C durante 48 horas sin agitación.

Partiendo del cultivo líquido se realizó una centrifugación para concentrar las células y posteriormente se resuspendieron en 200 μ L de tampón TAE 1X. El ADN genómico (ADNg) (a utilizar como templado en las reacciones de amplificación) fue extraído usando el estuche comercial “*Genomic DNA Extractin kit*”, de BIONEER corporation. Siguiendo las instrucciones/recomendaciones de la casa comercial; brevemente: a los 200 μ L de cultivo celular se le añadieron 20 μ L de Proteinasa K y 200 μ L de Buffer de unión; y se incubó a 60°C durante 10 minutos. En este proceso ocurre la lisis celular y el ADN es liberado a la solución. Posteriormente se añadieron 100 μ L de isopropanol para luego transferir la solución al reservorio del tubo de una columna de unión. Luego se centrifugó el tubo a 8000 g durante 1 minuto, provocando el descenso de la solución a través de la columna de unión. En la columna quedó retenido el ADN; la cual fue purificada centrifugando a 8000 rpm un primer buffer de lavado durante 1 minuto. El procedimiento se repitió usando un segundo buffer de lavado. Y finalmente se extrajo el ADN de la columna de unión centrifugando 200 μ L de un tampón de elución a 8000 rpm durante 1 minuto.

La integridad y concentración, en cada una de las muestras, del ADN purificado de los aislados fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En base a la intensidad de la señal en cada una de las muestras se hicieron diluciones dirigidas a nivelar las concentraciones para los 15 aislados; con la finalidad de proporcionar condiciones cualitativamente uniformes para el ensayo de amplificación por PCR. Como patrón de referencia de tamaños moleculares se incluyó en las corridas electroforéticas la escalera de 1 kb (Lavitrogen).

4.6.2 Ensayo de PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S (Lu y col., 2000)

Este ensayo de PCR es capaz de amplificar una región del gen del ARNr 16S bacteriano presente en todas las eubacterias. El producto obtenido presenta un tamaño de 996 pb; y en el presente trabajo fue utilizado como control del aislamiento de ADN bacteriano y en la evaluación de las concentraciones del ADN templado

previo a la evaluación con el TP-RAPD. Las condiciones del ensayo fueron las reportadas por Lu y colaboradores en el 2000 (Tablas 10 y 11. Apéndice B) brevemente; se utilizaron 5 μL de ADN purificado como templado y los oligonucleótidos forward U1 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' (ubicado en las posiciones 518-537 del ADNr 16S de *E.coli*) y el reverse U2 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3' (ubicado en las posiciones 1513-1491 del ADNr 16S de *E.coli*) (Figura 8). El producto de PCR se almacenó a 4°C. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador DNA Engine (PTC-200).

Ocho μL de la reacción de amplificación fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH: 7,4), a 50mV cm^{-1} . Finalizada la corrida se realizó la tinción del gel sumergiéndolo en una solución 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de bromuro de etidio ($5 \cdot 10^{-4}$ mg/mL) por 30 min; colocándolo posteriormente en una bandeja con agua destilada durante 60 min. La imagen del gel se obtuvo mediante la exposición sobre un transiluminador de luz UV (312 nm), utilizando el equipo de fotodocumentación para generar el registro del resultado. Como patrón de referencia de tamaños moleculares se incluyó en las corridas electroforéticas la escalera de 100 pb (Bioneer). Y como patrón de referencia se incluyó al ADN aislado de *Rhizobium phaseoli* (CVCM-1806 / R-99 CIAT); perteneciente a la colección de microorganismos del CVCM (Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos). Como control positivo de la amplificación se usó ADN de *E.coli* DH10 β .

4.6.3 Ensayo de TP-RAPD (Rivas y col., 2001)

Las condiciones del ensayo TP-RAPD descritas por Rivas y colaboradores en el 2002 (ver Tabla 12) fueron utilizadas para la evaluación de los aislados. Las reacciones fueron realizadas en 20 μL de volumen final, utilizando 5 μL de la dilución de ADN bacteriano e incluyendo el oligonucleótido forward 879F 5' GCC TGG GGA GTA CGG CCG CA 3' (ubicado en las posiciones 879-899 del ARNr 18S de *E.coli*) y el oligonucleótido reverse 1522R 5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'

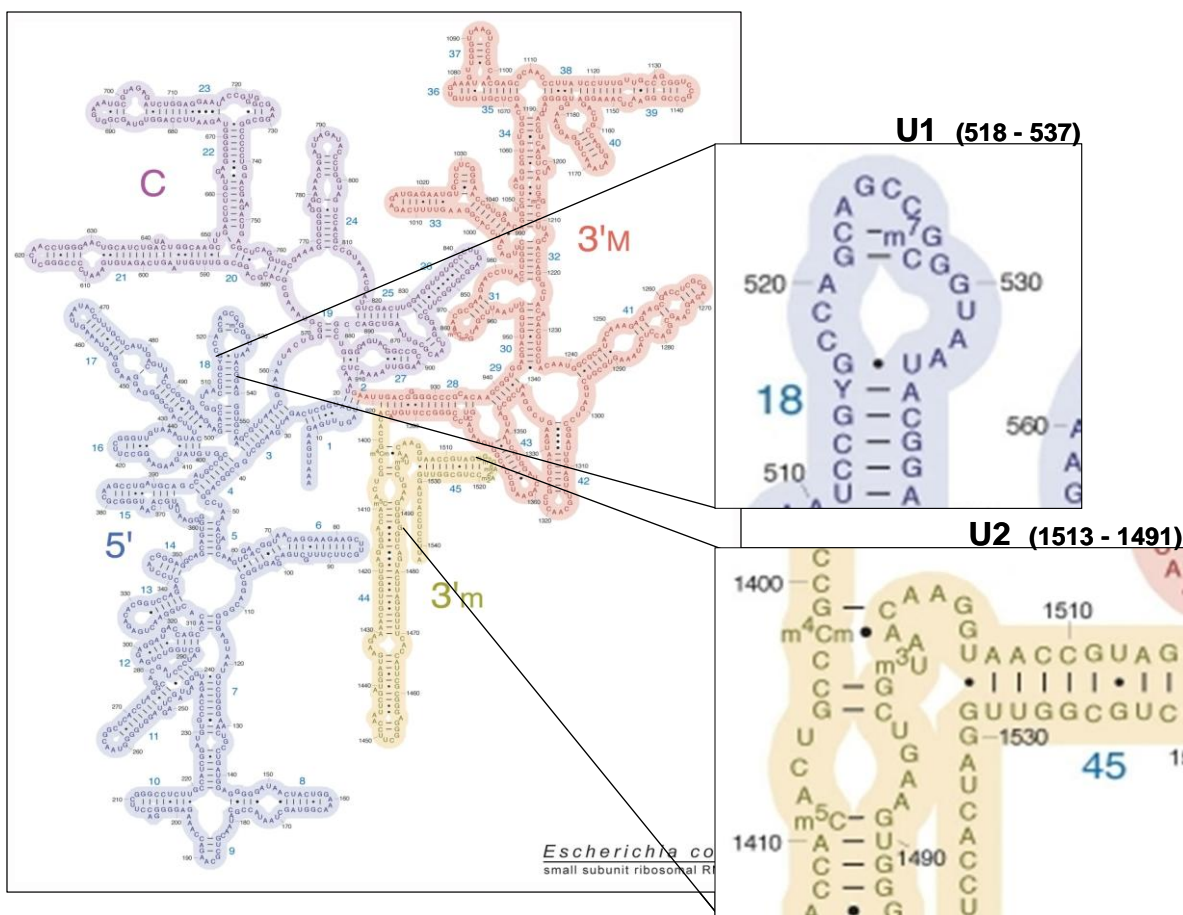


Figura 7. Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR del 16S en el ARNr 16S de *E.coli*.

Tomado de: www.educa.madrid.org

(ubicado en las posiciones 1509-1522 de *E.coli*) (Figura 8). Las condiciones de la mezcla de reacción se describen en la Tabla 12 (Apéndice B) y los tiempos, temperatura y número de ciclos se muestran en la Tabla 13 (Apéndice B).

Ocho μL de la reacción de amplificación del ensayo TP-RAPD fueron evaluados en una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH: 7,4), a 50mV cm^{-1} . Finalizada la corrida se realizó la tinción del gel sumergiéndolo en una solución $0,5 \mu\text{L mL}^{-1}$ de bromuro de etidio por 30 min; colocándolo posteriormente en una bandeja con agua destilada por 60min.

La imagen del gel se obtuvo mediante la exposición sobre un transiluminador de luz UV (312 nm), utilizando el equipo de fotodocumentación para generar el registro del resultado. Como patrón de referencia de tamaños moleculares se incluyó en las corridas electroforéticas la escalera de 100 pb (Bioneer). Como patrón de referencia se incluyó al ADN aislado de *Rhizobium phaseoli* (CVCM-1806 / R-99 CIAT.), y como control positivo de la amplificación se usó ADN perteneciente a *E.coli* DH10 β .

Una vez obtenidas las imágenes digitales de los geles de electroforesis, se hizo un análisis mediante una comparación de los patrones de bandas formados para cada aislado, discriminando así a cada uno por el perfil que se observó en el gel. El análisis de similitud de perfiles fue realizado con el programa Guefast Scan; el cual examina la intensidad de la densidad óptica de cada una de las bandas de los perfiles.

Los diferentes perfiles fueron enumerados del I al X y relacionados entre si por el porcentaje de similitud tomando en cuenta el número de bandas compartidas entre los mismos en una relación generada por el programa.

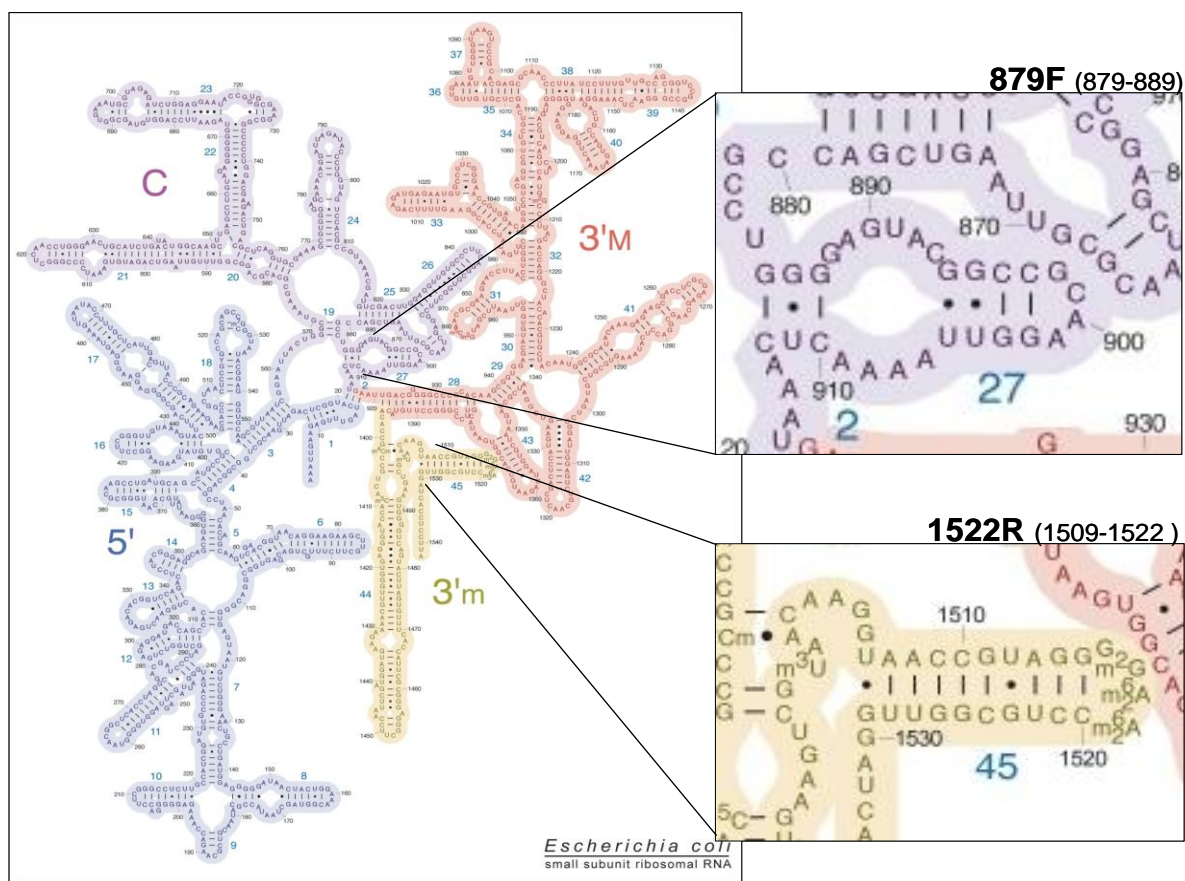


Figura 9. Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR TP-RAPD en el ARNr 16S de *E.coli*

Tomado de: www.educa.madrid.org

4.7 Evaluación del efecto de los 15 aislados obtenidos sobre la biomasa seca, contenido de N total y eficiencia de fijación de N de *Calopogonium* sp.

4.7.1 Pruebas de nodulación de los aislados bacterianos en *Calopogonium* sp.

La capacidad de nodulación y la eficiencia de fijación del Nitrógeno, de los aislados bacterianos fue evaluada mediante la inoculación de plántulas de una semana de crecimiento de *Calopogonium* sp. sembradas en vasos de 500mL con una mezcla de arena y suelo (de la Estación experimental la iguana) en proporción 3:2 como sustrato. La arena fue previamente lavada y la mezcla fue tamizada y esterilizada. El ensayo se desarrolló en el vivero del LEA.

Al inicio del ensayo cada vaso contenía 400g de sustrato y 10 plantas. Cumplida una semana de crecimiento de las plántulas de *Calopogonium* sp., se inocularon con 2 mL (por planta) de cada uno de los cultivos bacterianos puros crecidos en medio LMA líquido, a una concentración aproximada de 10^8 ufc/mL (medida usando el equipo Densimat, Biomerieux). Las condiciones de iluminación fueron de luz natural dentro del vivero. El riego se realizó cada 48 horas con solución nutritiva estéril sin N (Norris y Date, 1976).

Se emplearon como control negativo plantas sin inóculo bacteriano, como control nitrogenado se emplearon plantas sin inóculo con solución nutritiva con N (KNO_3 al 0,05%), y como control de nodulación positiva se emplearon plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium phaseoli* CVCM-1806 / R-99 CIAT. Los ensayos de nodulación se realizaron por triplicado. Se evaluó la presencia de nódulos después de 9 semanas de la siembra; verificando cuales de estas cepas inducen nodulación y cuales no.

4.7.2 Cuantificación de la biomasa seca del vástago de las plantas de *Calopogonium* sp.

Luego de terminado el ensayo de nodulación se cuantificó la biomasa seca de las plantas, para lo cual se cortó el vástago de cada planta, se introdujo en la estufa a 60°C hasta peso constante, y finalmente se midió su biomasa seca en una balanza.

4.7.3 Cuantificación del N total del vástago de las plantas de *Calopogonium* sp.

Con la finalidad de determinar el contenido de nitrógeno total de cada una de las plantas luego de finalizado el ensayo descrito arriba, se realizaron los siguientes pasos, siguiendo el método de micro Kjeldhal (Boddey y col., 1987). El material vegetal seco, proveniente del vástago, fue colocado en tubos de vidrio especiales para digestión, a los cuales se añadieron 3 mL de solución binaria (ácido perclórico al 60%, ácido sulfúrico al 98-99% y pentóxido de vanadio), y se colocaron en un digestor, llevándolos gradualmente a una temperatura de 200°C. Se mantuvieron allí por 5h; hasta observar las muestras transparentes. Luego se retiraron y dejaron reposar durante la noche a temperatura ambiente. Finalmente las muestras totalmente claras fueron diluidas en agua destilada llevándose a un volumen de 50 mL.

Se preparó un indicador a base de la mezcla de los indicadores Rojo de Metilo y Verde de Bromocresol, a 0,1% y a 0,5% respectivamente. Se disolvieron en 25 mL de etanol al 95%, y se ajustó a un pH de 4,7. La coloración final del indicador era violeta intenso. Se utilizó el Kjeldahl System (1002 Distilling Unit) como instrumento para la determinación de N. A cada uno de los tubos especiales para este instrumento se le añadieron 10 mL del extracto de la digestión y 5 mL de hidróxido de sodio al 40%. Paralelamente para cada tubo se añadieron 5 mL de ácido bórico más 5 gotas del indicador en fiolas de 125 mL. Una vez finalizado el proceso de destilación, se procedió a titular el producto depositado en la fiola por el Kjeldahl utilizando una bureta con 50 mL de HCl a 0,01N. Se observó un viraje de verde

turquesa a rojo matiz violeta. La determinación del N Total se realizó usando la ecuación: $\%N = (T-B) \times N \times 1,4 / S$. Donde **T**: mL de ácido gastado en la titulación; **N**: Normalidad del ácido; **B**: Blanco; **S**: Peso seco de la muestra; **1,4**: $10^{-3} \times 1,4 \text{ g / eq} \times 100$. A partir del % de N se calcularon los mg de N presentes en cada muestra, expresando los resultados en mg N/ g BS (Biomasa Seca).

4.7.4 Estimación de la eficiencia de fijación de N en las plantas de *Calopogonium* sp. inoculadas.

La eficiencia de fijación de N expresa cuán eficiente es una cepa rizobiana en fijar N, en relación a la planta bajo crecimiento óptimo sin rizobio, en este caso la planta no inoculada creciendo en solución nutritiva con N, correspondiente al 100% de efectividad. Sin embargo en nuestro ensayo, las tres réplicas de plantas sin inocular, regadas con solución nutritiva nitrogenada, murieron; por lo cual se consideró el 100% de efectividad a la planta control inoculada con *Rhizobium phaseoli*. Este control también permitió confirmar que las condiciones del ensayo fueron apropiadas para la nodulación y que la bacteria control usada se encuentra efectiva.

La eficiencia de fijación de N se calcula al dividir la concentración de N de la planta inoculada con cada aislado bacteriano entre la concentración de N de la planta control. La ecuación que define la efectividad de fijación de N en porcentaje es:

$$ES = [N]_{\text{cepa } x} \times 100 / [N]_{\text{SI} + N} .$$

4.7.5 Análisis estadístico

Los datos de biomasa seca, contenido de N total en el vástago de la planta y de eficiencia de fijación de N fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de una vía ($p < 0,05$); usando el programa Statistics (7.0). Se propuso evaluar los datos mediante pruebas a posteriori en caso de hallarse diferencias significativas entre los tratamientos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cuantificación de las poblaciones nativas de rizobios por Número Más Probable (NMP) (Cochran, 1950)

Se realizó la inoculación de plántulas de *Calopogonium sp.*, de una semana de crecimiento, con diluciones seriadas de suelo nativo de la Estación Experimental La Iguana. Después de 12 semanas se observó la formación de nódulos en las raíces de las plantas encontrándose que, tanto para condiciones de pH 4,5 como para condiciones de pH 6,8 se obtuvo un único individuo nodulado, en diluciones diferentes para cada caso (Tablas 15 y 16).

El Número Mas Probable (NMP) de bacterias por gramo de suelo se consigue al sustituir los valores correspondientes en la siguiente fórmula: **$NMP = md / Vn$** donde: m = índice NMP con un factor de 95% de los límites de confianza para 4 repeticiones ($n = 4$) y 4 diluciones ($s = 4$), d = mínima dilución considerada, V = volumen en mililitros (mL) de cultivo inoculado en cada tubo, n = gramos de suelo nativo en la solución inicial. Al sustituir los valores correspondientes en la fórmula de NMP se obtiene que: **$NMP = (0,6 \times 10^3 \text{ cel}) (10^{-2}) / (1) (10g) = 0,6 \text{ células/g suelo}$** . Los resultados están expresados en células del microorganismo por gramo de suelo, sin embargo, por tratarse en este caso de organismos rizobios se reportará el resultado como rizobios por gramo de suelo, **rizobios/g suelo**. Este resultado indica que la cuantificación de las poblaciones rizobianas en el suelo rizosférico de la Estación Experimental La Iguana, mostró un número más probable de 0,6 r/g suelo; para los dos valores de pH (4,5 y 6,8) a los cuales se realizó el ensayo.

Según la escala utilizada por Sicardi (1992) se considera una cantidad de rizobios *baja* a menos de 100 r/g suelo; *media* de 100 a 1000 r/g suelo; y *alta* a mas de 1000 r/g suelo. El resultado obtenido en este caso, 0,6 r/g suelo representa una baja concentración de rizobios en el suelo del área muestreada.

En las tablas 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de NMP a pH 6,8 y 4,5 respectivamente. Cada tabla muestra la matriz formada por la combinación de cada una de las diluciones con sus réplicas correspondientes, indicando en cuales se obtuvo una respuesta positiva de nodulación.

Dilución \ Replica	-1	-2	-3	-4	-5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	+	-	-
4	-	-	-	-	-

Tabla 15. Nódulos obtenidos en el ensayo de NMP pH 6,8

Dilución \ Réplica	-1	-2	-3	-4	-5
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-

Tabla 16. Nódulos obtenidos en el ensayo de NMP pH 4,5

+ : Se observó la presencia de nódulos; **-** : No se observó la presencia de nódulos

La figura 10 muestra las raíces con nódulos en los individuos dispuestos en sus tubos con solución nutritiva sólida sin N (Norris y Date, 1976).



Figura 10. Raíces noduladas en el ensayo de NMP

Tubo correspondiente a la dilución 10^{-3} , pH 6.8. **Izq.:** Sistema usado para el ensayo de NMP, conformado por el tubo con solución nutritiva sólida y la planta. **Der.:** Acercamiento de la imagen ubicada a la izquierda, donde se observan los nódulos formados.

Para bacterias se ha reportado una cantidad en el suelo en número/gramo de suelo del orden de 10^8 - 10^9 células/g suelo en condiciones neutro-alcalinas; en condiciones extremas, ya sean ácidas o alcalinas, está cantidad tiende a ser mas baja (Casanova, 2005). En líneas generales el número de organismos del suelo esta influenciado principalmente por la cantidad y calidad de nutrientes disponibles, factores físicos (humedad, temperatura, etc) (Bravo y col., 2004), factores bióticos (competencia), y las características químicas del suelo (acidez, salinidad, materia orgánica, etc) (Brady y Weil, 2004), por lo que es de esperarse que este estudio muestre un NMP bajo, considerando que el suelo de la Estación Experimental la Iguana en general presenta valores de pH ácidos, reducida disponibilidad de nutrientes, fertilidad pobre, bajo contenido de materia orgánica y baja retención de humedad (Hernández y col., 2012; Madrid, 2007), los resultados obtenidos mostrando un NMP bajo están acordes con las condiciones conocidas del suelo.

Lo antes expuesto concuerda con los resultados obtenidos por Sicardi (1992) quien realizó una serie de cuantificaciones del NMP de las poblaciones rizobianas presentes en cuatro zonas de la Estación Experimental La Iguana, y encontró una correlación positiva del número de rizobios por gramo de suelo con el pH del suelo, tanto en la estación de lluvia como en la de sequía. Conforme a esto, encontró también las mayores poblaciones de rizobios nativos en el área de suelo denominada por la autora "zona B", la cual presentó los mayores valores de fertilidad y pH (pH 5,9 de 0-15 cm de profundidad) y un mayor número y diversidad de especies de leguminosas. En las parcelas de investigación en la Estación Experimental la Iguana donde se realizó el presente trabajo se reporta un valor de pH 4,6 de 0-15 cm de profundidad (Tabla 2), que podría corresponderse con un bajo número de rizobios por gramos de suelo como fue el obtenido en este estudio.

Se ha comprobado el efecto positivo de la presencia de diversas especies de leguminosas en el mantenimiento de las poblaciones rizobianas en el ambiente natural, lo que se ha atribuido a la acción inductiva de los exudados radicales sobre los rizobios de vida libre y a las características más favorables producidas por la

raíces de estas plantas en la rizósfera (Sicardi e Izaguirre, 1994). Las muestras de suelo recolectadas para el presente trabajo provinieron de parcelas con pocas especies leguminosas, siendo posiblemente un factor que influyó en el valor de NMP obtenido.

Por otra parte, algunas características de la sabana influyen en el número de las poblaciones rizobianas, como el caso de la concentración de los elementos Ca y K en el suelo. La disponibilidad de Ca se relaciona con la formación de los nódulos en las raíces de las leguminosas; reportándose que la baja disponibilidad del mismo en horizontes tanto superficiales como profundos de los suelos de la sabana, afecta negativamente la capacidad de nodulación de diferentes leguminosas por la falta de inducción de los genes *nod* en los rizobios. En cuanto al K, numerosos informes lo han señalado como un elemento importante en la estimulación en la nodulación y fijación simbiótica de N en las leguminosas en general (Sicardi, 1992). Para las parcelas de investigación donde se realizó el presente trabajo, se reporta un valor Ca de 61,6 mg/kg (ppm) y un valor de K de 44 mg/kg, para una profundidad del suelo de 0-15 cm (Tabla 2), congruentemente con la reducida disponibilidad de nutrientes descrita para la zona (Madrid, 2007). Considerando lo antes explicado, es posible que bajos niveles de estos elementos en los suelos de sabana afecten el establecimiento de la asociación simbiótica (Sicardi, 1992; Sicardi e Izaguirre, 1994) generando bajos valores de NMP, como el obtenido en el presente trabajo.

Los valores de NMP reportados por Sicardi (1992) se encontraron entre 1,6 rizobios/g suelo y $2,39 \times 10^3$ rizobios/g suelo, correspondiendo las mas altas concentraciones a la estación de lluvia (agosto, octubre) y las más bajas a la estación de sequía (febrero, mayo); según lo cual se detectó el efecto de la estacionalidad climática sobre el tamaño de las poblaciones de rizobios nativos. Este efecto puede ser atribuido a la disminución registrada en la temperatura del suelo unida a un aumento en la humedad del mismo. En cuanto a la distribución vertical de las poblaciones rizobianas se reportaron las de mayor número en los horizontes más superficiales de los suelos, en comparación con el horizonte más profundo, tanto en

la estación de lluvia como en la de sequía; lo cual puede deberse a la presencia de un mayor volumen de raíces en los extractos más superficiales (Sicardi,1992). Para los ensayos de NMP del presente trabajo se realizó la recolección de muestras de suelo durante el mes de agosto, y se tomó únicamente del horizonte más superficial (0-20 cm). Según las tendencias encontradas por Sicardi (1992) éstas son las condiciones en las que se encuentran las concentraciones más altas de rizobios nativos; sin embargo el resultado obtenido de 0,6 rizobios/g suelo es mas bajo que los reportados para la época seca. Esta marcada diferencia puede atribuirse a la diferencia en las plantas usadas como hospedadoras en cada investigación.

La planta hospedadora usada en el sistema de inoculación es considerada un factor importante en la obtención del NMP. Los ensayos de Sicardi (1992) fueron realizados usando a *Macropitilium atropurpureum* la cual ha sido descrita como una hospedadora de alta promiscuidad (capacidad de formar simbiosis con múltiples rizobios), utilizada frecuentemente como planta testigo en ensayos con rizobios no caracterizados; (Perret y col., 2000. citado en Valverde, 2003).

Sobre las características del establecimiento de la simbiosis entre las diversas especies de rizobios y distintas especies de plantas existen varios estudios; entre los que resaltan los de Nobbe y col., (1891), quienes demostraron que bacterias aisladas de nódulos de *Pisum sativum* eran incapaces de nodular plantas de las tribus *Genisteeae* y *Hedysareae*. Por otro lado, Wilson (1939) analizó las diferentes asociaciones simbióticas y determinó el intervalo de hospedador de rizobios aislados de 31 géneros de leguminosas inoculándolos sobre 160 especies de esta familia. El trabajo mostró que todas las cepas nodularon leguminosas de diferentes tribus y que algunas plantas formaban nódulos con al menos el 90% de las cepas aisladas, mientras que otras formaban nódulos con sólo una de las cepas. Este tipo de ensayo confirma que la promiscuidad en la simbiosis está ampliamente difundida en la naturaleza y que no está asociada a un grupo taxonómico de plantas o rizobios en particular, al mismo tiempo que hay también cierta especificidad entre plantas y poblaciones rizobianas. En general puede decirse que la mayoría de las cepas

rizobianas presenta un grado de promiscuidad alto; sin embargo hay excepciones que presentan un intervalo de hospedador restringido. En consecuencia; la capacidad de los hospedadores de entrar en simbiosis con diferentes rizobios varía grandemente (Valverde, 2003). En base a esto, se entiende que la cuantificación del NMP de las poblaciones rizobianas presentes en un suelo determinado, usando plantas hospedadoras distintas, está sujeta a las diferentes capacidades de los rizobios nativos de establecer simbiosis con la planta usada como testigo.

En síntesis se puede decir que el presente trabajo permitió obtener el valor de NMP de 0,6 rizobios/g suelo proveniente de los ensayos agroecológicos de la Estación Experimental La Iguana, correspondiente a las poblaciones de rizobios nativos capaces de inducir nodulación en plantas de la especie *Calopogonium sp.* Esta población es considerada baja en relación a los valores de NMP reportados en las investigaciones previas en el área de estudio consultadas en el presente trabajo.

5.2 Obtención de aislados bacterianos a partir de nódulos radicales de *Calopogonium sp.*

Siguiendo los pasos descritos en el sección 4.4 se obtuvieron 15 aislados bacterianos (Tabla 17), 12 de ellos provenientes de los nódulos de las plantas colectadas en campo, y los 3 restantes provenientes de los nódulos de las plantas noduladas en el laboratorio, en el ensayo de NMP. Los primeros 12 aislados presentan una nomenclatura numérica, y los 3 siguientes una nomenclatura alfabética.

Tabla 17. Aislados bacterianos obtenidos a partir de nódulos de *Calopogonium sp*

Procedencia	Aislados												
Nódulos campo	B3	B7	B8	B9	B10	B11	B14	B15	B17	B21	B22	B24	
Nódulos NMP	BC	BD	BF										

Una vez obtenidos los 15 aislados bacterianos se procedió a realizar una caracterización microbiológica y genética de los mismos, para luego evaluar su efecto sobre la especie *Calopogonium sp.*

5.3 Caracterización microbiológica de los cultivos bacterianos aislados

A continuación se presentan los resultados de los diferentes ensayos microbiológicos aplicados a los aislados bacterianos (ver tabla 18). En términos generales se evaluaron características de tipo morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y metabólicas observadas mediante el crecimiento en distintos medios de cultivo.

5.3.1 Tinción Gram

Se realizó la tinción Gram a cada uno de los 15 aislados y al cultivo control. Esta técnica es una tinción diferencial basada en la estructura de las paredes celulares bacterianas, que da origen a la discriminación de dos grandes grupos de bacterias: las Gram positivas (Gram⁺) y las Gram negativas (Gram⁻) (Madigan, 2003).

Usando un microscopio óptico se hizo la observación de los cultivos aislados en un frotis teñido con el procedimiento de la tinción de Gram y se comprobó que todos los aislados son bacilos Gram⁻, adquiriendo una coloración rosa durante el teñido. Este resultado coincide con las características de los rizobios reportadas por Vincent (1970), y constituye una prueba básica y primaria en la identificación de rizobios en base a la estructura de la célula.

Tabla 18. Características microbiológicas de los aislados

Aislado	Forma	Gram	Oxi	KIA	LMA-RC	LB	LLA	TLA	LMA-ABT
B03	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B07	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B08	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B09	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B10	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B11	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B14	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B15	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B17	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B21	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B22	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
B24	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
BC	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
BD	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
BF	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>
1806	Bacilo	-	+	-	<i>m-a</i>	<i>m-e</i>	<i>m-m</i>	<i>m-e</i>	<i>ac</i>

Donde: Gram: tinción Gram; Oxi: prueba de la oxidasa; KIA: agar hierro Kliger; LMA-RC: agar levadura manitol con rojo congo; LB: Luria Bertani; LLA: agar levadura lactosa; TLA: triptona levadura agar; LMA-ABT: agar levadura manitol con azul de bromotimol. / *m-a*: mucosidad abundante; *m-e*: mucosidad escasa; *m-m*: mucosidad moderada; *ac*: acidificación. + : positivo, - : negativo.

Caracterización bioquímica de los aislados bacterianos mediante el crecimiento en medios de cultivo

5.3.2 Crecimiento en el Medio LMA-RC

Los rizobios no crecen bien en los medios de peptona usados rutinariamente para muchas bacterias, pero sí lo hacen en varios extractos complejos, la levadura es generalmente la fuente más adecuada para su crecimiento (Vincent, 1970). El manitol es la fuente de carbono más comúnmente usada para el crecimiento de rizobios, sin embargo puede ser substituido por algunas azúcares como la glucosa o sacarosa. Por otra parte, algunos rizobios de crecimiento lento presentan un mejor desarrollo usando otros carbohidratos como fuente de carbono; como la galactosa y la arabinosa, (Vincent, 1970).

El medio de cultivo usado por excelencia para el crecimiento de rizobios es el LMA-RC, el cual contiene una combinación de extracto de levadura, manitol y rojo congo. El extracto de levadura proporciona a las bacterias productos de degradación de las proteínas, sustratos para la respiración, vitaminas y elementos como los aminoácidos, mientras que el manitol funciona como fuente de carbono. Por su parte el rojo congo ayuda a diferenciar los rizobios de otras bacterias, debido a que en general las colonias de rizobios presentan tensión débil con este colorante en tanto que las colonias de muchas otras bacterias adquieren un color más intenso; sin embargo, ésta no es una característica definitiva ya que su expresión varía con la concentración de reactivos, la edad del cultivo, la exposición de la placa a la luz y no es lo suficientemente selectivo (Contreras y col., 2007).

La temperatura óptima de crecimiento de los rizobios en condiciones de laboratorio es de 28°C y su tolerancia de pH entra en un intervalo de 5,00 a 8,00 (Cuadrado y col., 2009; Contreras y col., 2007). Los ensayos descritos en el presente trabajo fueron realizados en un valor de pH cercano a la neutralidad, de 6,8.

Los 15 aislados bacterianos obtenidos, junto a la bacteria *Rhizobium phaseoli*, presentaron crecimiento a las 48 horas a una temperatura de 28°C en medio LMA, generando siempre una mucosidad abundante. En cuanto a las evaluaciones morfológicas de los aislados se consideró el tamaño de las colonias, forma, textura y color. Todos los aislados y *Rhizobium phaseoli*, el cultivo control, presentaron características uniformes: colonias redondas y convexas, gomosas, muy suaves y acuosas, grandes (de 4 a 5 mm) y translúcidas a las 72 horas de crecimiento. Debido a la presencia del colorante rojo congo (RC) en el medio de cultivo, se observaron las colonias con una tonalidad rosa claro. Estas características se corresponden con las descritas para los rizobios pertenecientes al género *Rhizobium* (Cuadrado y col., 2009). Por otra parte, se evaluó la velocidad de crecimiento; donde todos los aislados y el cultivo control presentaron crecimiento en un intervalo de 2 días, lo que es considerado un crecimiento rápido (Vincent, 1970). Estas características son distintas de las mostradas por los rizobios de crecimiento lento; los cuales muestran crecimiento en un intervalo de 5 a 7 días, desarrollan colonias pequeñas (1mm), opacas en su gran mayoría y menos gomosas (Cuadrado y col., 2009).

5.3.3 Reacción en el medio Levadura Manitol Agar con Azul de BromoTimol (LMA-ABT)

Se evaluó la producción de acidez o alcalinidad en medio LMA-ABT a través del cambio de la coloración del mismo, observando la producción de acidez (cambio de color azul a color amarillo) en todos los aislados y en *Rhizobium phaseoli*. Estas características difieren de las mostradas por los rizobios de crecimiento lento; los cuales son productores de alcalinidad en medio LMA-ABT (Cuadrado y col., 2009).

Los géneros bacterianos *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*, conocidos colectivamente como rizobios, son bacterias Gram⁻, fijadoras de nitrógeno, que forman nódulos en la planta hospedadora y pertenecen a diferentes familias dentro de la clase Alpha Rizobiales. El género *Mesorhizobium*, que significa intermediario entre *Rhizobium* y

Bradyrhizobium, presenta crecimiento lento o moderado y produce acidificación en el medio LMA-ABT; mientras que, el género *Azorhizobium* crece tan rápido como *Rhizobium* y produce alcalinidad en el medio LMA-ABT, como *Bradyrhizobium* (Cuadrado y col., 2009). Considerando esto, podemos afirmar que ninguna de los 15 aislados bacterianos analizados pertenece a los géneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* o *Azorhizobium*.

Considerando las descripciones realizadas sobre la morfología de las colonias, la velocidad de crecimiento y la producción de acidificación en el medio LMA-ABT, se puede afirmar que los 15 aislados bacterianos obtenidos de nódulos de *Calopogonium sp.* en el presente estudio muestran las características generales del género *Rhizobium*.

5.3.4 Crecimiento en el medio Levadura Lactosa Agar (LLA)

En este medio de cultivo los 15 aislados bacterianos y *Rhizobium phaseoli* presentaron un buen crecimiento, mostrando una mucosidad moderada y colonias de igual tamaño a las obtenidas en el medio LMA-RC. Esta prueba fue usada para discriminar a los cultivos pertenecientes al grupo de los bradyrizobios (rizobios de crecimiento lento), debido a que éstos en su mayoría, usan pocos disacáridos y por ende no crecen bien en este medio que tiene lactosa; a diferencia de otros rizobios (Zúñiga, 2008). Este resultado indica que los 15 aislados obtenidos de *Calopogonium sp.* presentan las características de los organismos pertenecientes al género *Rhizobium*.

5.3.5 Crecimiento en el medio agar Luria Bertani (LB)

Se evaluó el crecimiento de los aislados bacterianos en el medio de cultivo LB, tomando en cuenta que los rizobios en general presentan un crecimiento deficiente en este medio (Zúñiga, 2008); permitiendo descartar como rizobios a los aislados que presentasen un buen crecimiento en este medio. Los 15 aislados bacterianos, en

conjunto con *Rhizobium phaseoli*, tuvieron un crecimiento pobre en el medio LB, mostrando una mucosidad escasa y un tamaño de las colonias menor al comparar su crecimiento con el obtenido en el medio LMA-RC.

El medio de cultivo LB contiene 5 g/L de NaCl; lo que equivale a 85,5 mM (0,5%); esta concentración puede influir en el crecimiento de los rizobios, debido a que se ha reportado que el crecimiento de algunas cepas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* ha sido inhibido por concentraciones de 100 mM (0,6%) de NaCl (Ghittoni, 1996). Esta susceptibilidad de los rizobios al NaCl puede deberse a un incremento del contenido de Na⁺ en las células bacterianas, el cual actúa sobre los grupos sulfídricos de las proteínas activas, provocando desórdenes metabólicos a nivel de las enzimas deshidratas, hidrolasas, amilasas y proteasas, o al efecto osmótico que se crea en el medio de cultivo (López y col., 1998).

Por otra parte, algunas especies de rizobios muestran tolerancia a altas concentraciones; como *R. meliloti* la cual tolera concentraciones entre 300 (1,8%) y 700 mM (4,2%) de NaCl (Yelton, 1983). Cepas del género *Rhizobium* aisladas de *V. unguiculata* presentan tolerancia a concentraciones por encima de 917 mM (5,5%) de NaCl (Mpeperekí y col., 1997).

En líneas generales se considera que los rizobios muestran una marcada variación en la tolerancia a la sal (López y col., 1998). Los resultados de la evaluación de los 15 aislados bacterianos en LB, señalan que la concentración de NaCl 0,5% en el medio podría influir en el pobre crecimiento obtenido, sugiriendo una posible baja tolerancia a las concentraciones de NaCl.

Por otro lado, el LB es un medio que contiene como fuentes nutritivas extracto de levadura y triptona, proveyendo principalmente proteínas, glucosa y otras fuentes de carbono, por lo que es considerado un medio rico. Por tanto, es probable que este medio de cultivo no contenga la fuente de carbono apropiada para el óptimo crecimiento de los rizobios.

5.3.6 Crecimiento en el medio Triptona Levadura Agar (TLA)

El medio TLA es comúnmente usado para el crecimiento de rizobios que serán estudiados mediante técnicas moleculares (Rivilla y col., 2006; Cuadrado y col., 2009) debido a que en éste los rizobios crecen con mínima producción de polisacárido, compuesto que causa interferencia en el aislamiento de ADN. En este estudio los 15 aislados y *Rhizobium phaseoli* mostraron un crecimiento pobre; con una mucosidad escasa y colonias de tamaño más pequeño respecto al mostrado en medio LMA. Esta característica concuerda con lo esperado para rizobios.

Este medio de cultivo contiene trazas de CaCl_2 como aporte de calcio, el cual ayuda al transporte a través de la membrana, al crecimiento de la bacteria (Norris, 1959), y al fortalecimiento de las paredes celulares (Lancheros y col., 2001).

5.3.7 Prueba de la oxidasa

Los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación final de agua. En este ensayo se evaluó la producción de la enzima citocromo c oxidasa para los aislados bacterianos en estudio; obteniéndose un resultado positivo para los 15 aislados y para *Rhizobium phaseoli*. De acuerdo con lo reportado, los rizobios producen una respuesta positiva a la prueba de la oxidasa (Guía Práctica de Microbiología, 1999), por lo que el presente resultado señala la posibilidad de que los 15 aislados pertenezcan al grupo de los rizobios.

5.3.8 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kliger (KIA)

En cuanto a las características metabólicas, se evaluó la capacidad de fermentación de la glucosa mediante el crecimiento en medio KIA; donde se obtuvo un resultado negativo para todos los aislados, registrado como la ausencia de cambio de color en el medio. Este resultado nos indica que los 15 aislados

bacterianos analizados en este estudio, pertenecen al grupo de los BGNNF (Bacilos Gram Negativos No Fermentadores). Este resultado coincide con lo reportado para la familia *Rhizobiaceae*, la cual pertenece a este grupo (Callejo y col., 2010), mostrando la posible pertenencia de los 15 aislados a este grupo taxonómico.

En esta prueba, la fermentación de la glucosa se aprecia en el viraje a amarillo del indicador de pH (rojo de fenol) únicamente en la parte inferior del tubo. Esto es debido a la pequeña proporción de glucosa que existe en el medio (0,1%) (Tabla 9), que al ser fermentada en el fondo del tubo, donde existen condiciones de anaerobiosis, produce suficiente ácido para que vire el indicador, pero no a medida que nos aproximamos a la superficie, donde las condiciones son más aeróbicas, allí la bacteria respira y la producción de ácido es menor, permaneciendo esa zona de color rojo. Si el microorganismo sembrado no fermenta la glucosa con producción de ácidos, todo el tubo toma una coloración roja. Incluso una vez que la glucosa ha sido degradada, la bacteria comienza a usar los aminoácidos liberándose aminas que elevan el pH, por lo que el color rojo puede ser más intenso (Guía Práctica de Microbiología, 1999). Cuando se evalúa el crecimiento de rizobios en este medio se obtiene una coloración roja tanto en el fondo como en la superficie del tubo, indicando que no hubo fermentación de la glucosa; tal y como se observó para los 15 aislados analizados.

A través de la realización de los ensayos microbiológicos, se encontró que los 15 cultivos bacterianos aislados de nódulos de plantas de la especie *Calopogonium sp.*, nativas de la Estación Experimental La Iguana, Edo. Guárico, presentaron las características descritas para organismos rizobios. Se comprobó que se tienen bacilos Gram⁻, no fermentadores de glucosa, con un abundante crecimiento en medio LMA-RC y pobre crecimiento en los medios LB y TLA. Por otra parte, el tamaño de las colonias, la cantidad de mucosidad producida, la velocidad de crecimiento, el buen crecimiento en el medio LLA, y la acidificación del medio LMA-ABT, son características que se corresponden con las mostradas por el género *Rhizobium*, por lo cual, los 15 aislados obtenidos son potencialmente bacterias

pertenecientes a este género. En base a estos resultados se procedió a realizar los ensayos de PCR, las pruebas de nodulación y las de eficiencia de fijación de N. La prueba de nodulación es considerada aquella que confirma de forma definitiva si un aislado bacteriano es o no un rizobio.

5.4 Caracterización molecular

5.4.1 Aislamiento de ADNg de cultivos bacterianos

Una vez obtenido el ADN genómico de los 15 aislados bacterianos en conjunto con el de *Rhizobium phaseoli* (cepa 1806), mediante un proceso de extracción y purificación usando el estuche comercial “*Genomic DNA Extractin kit*” de BIONEER corporation, se procedió a realizar la evaluación cualitativa de la integridad y concentración mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para cada una de las muestras. La imagen del gel de agarosa teñida con bromuro de etidio (BrEt) registró los resultados y permitió evaluar la integridad del ADN aislado de cada muestra. La presencia de una banda mayor a 23 Kb en el gel comprueba que el ADN aislado es de alto peso molecular. Por el contrario, cuando se observa un barrido, se comprueba que el ADN se encuentra fragmentado producto de la degradación por nucleasas. La integridad del ADN es importante en el presente estudio, debido a que éste factor podría influir en el resultado de la amplificación por TP-RAPD y en consecuencia generar variabilidad en el perfil de bandas formado para cada aislado.

La figura 11 muestra los resultados para las muestras de ADN extraídas de los 15 aislados obtenidos, de *Rhizobium phaseoli* y de diferentes cultivos puros usados como controles de amplificación de la bacteria *E.coli* DH10 β (a una dilución 1/10, con las cuales se obtuvieron previamente buenas amplificaciones por PCR, y de las cuales una fue seleccionada para ser usada como control en los posteriores ensayos de PCR de la subunidad ribosomal pequeña ARNr 16S, y de TP-RAPD).

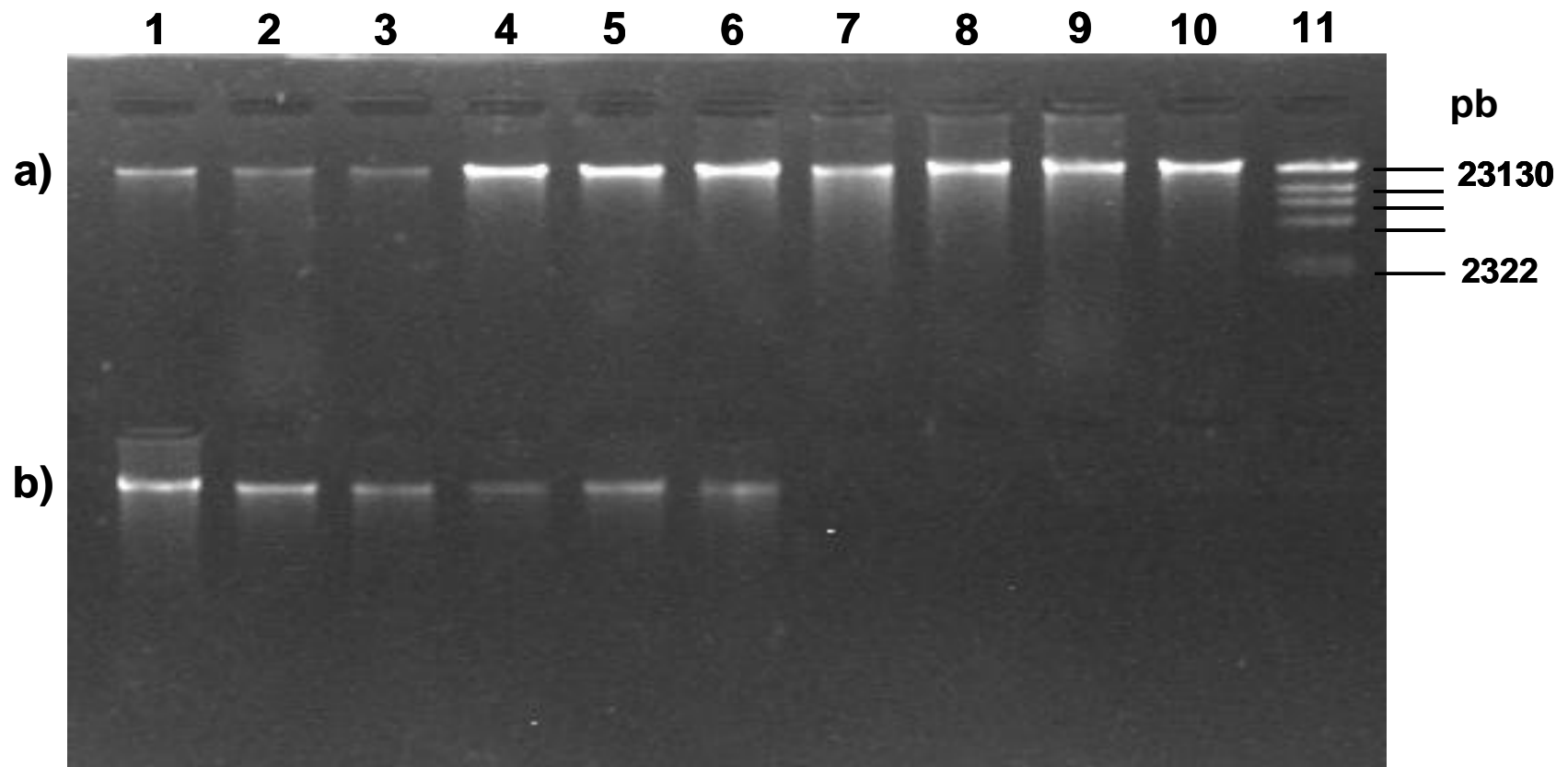


Figura 11. Evaluación de la Integridad y Concentración inicial del ADN de las muestras

Fila a) Carril: 1 ADN3; 2 ADN7; 3 ADN8; 4 ADN9; 5 ADN10; 6 ADN11; 7 ADN14; 8 ADN15; 9 ADN17; 10 ADN21; 11 MPM λ Hind III;

Fila b) Carril: 1 ADN22; 2 ADN24; 3 ADN1806; 4 ADNC; 5 ADND; 6 ADNF; 7 ADNEc3 (1/10); 8 ADNEc4 (1/10); 8 ADNEc3 (1/10); 10 ADNEc4 (1/10); 11 ADNEc5 (1/10).

En la figura 11 se observó que las muestras de ADN de todos los aislados presentaron una migración en el gel que corresponde a un peso molecular superior a 23 KB, formando una banda al inicio del gel y ningún barrido. Sin embargo, si se observaron diferencias en la concentración de las muestras, indicadas por la presencia de bandas con mayor intensidad que otras.

Finalmente, fue necesario hacer una estimación cualitativa de la concentración de cada muestra de ADN_g purificado, considerando las bajas concentraciones y los volúmenes disponibles de algunos aislados. La estimación se hizo a partir de la comparación de la intensidad de la señal de cada muestra en geles de agarosa al 1%, realizando luego las diluciones pertinentes que proporcionaron concentraciones uniformes de ADN en todas las muestras para los posteriores ensayos de amplificación por PCR.

5.4.2 Ensayo de PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S (Lu y col., 2000)

Como primer ensayo se realizó la PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S (Lu y col., 2000), la cual es capaz de amplificar una región del gen del ARNr 16S bacteriano presente en todas las eubacterias. El producto obtenido presenta un tamaño de 996 pb y puede ser sometido a diversos tipos de análisis, entre ellos la secuenciación, con el fin de identificar el género y especie correspondiente al origen del ADN templado. En el presente trabajo, este ensayo fue utilizado como control del aislamiento de ADN bacteriano y en la evaluación de las concentraciones del ADN templado, previo a la evaluación mediante TP-RAPD.

La figura 12 muestra los resultados en la imagen del gel de agarosa al 2% en cual se realizó la corrida electroforética de los productos obtenidos en el ensayo de PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S, para cada una de las 15 muestras. Se incluyó ADN de *E.coli* DH10 β como control positivo, y una muestra de la mezcla de PCR sin ADN como control negativo de la amplificación.

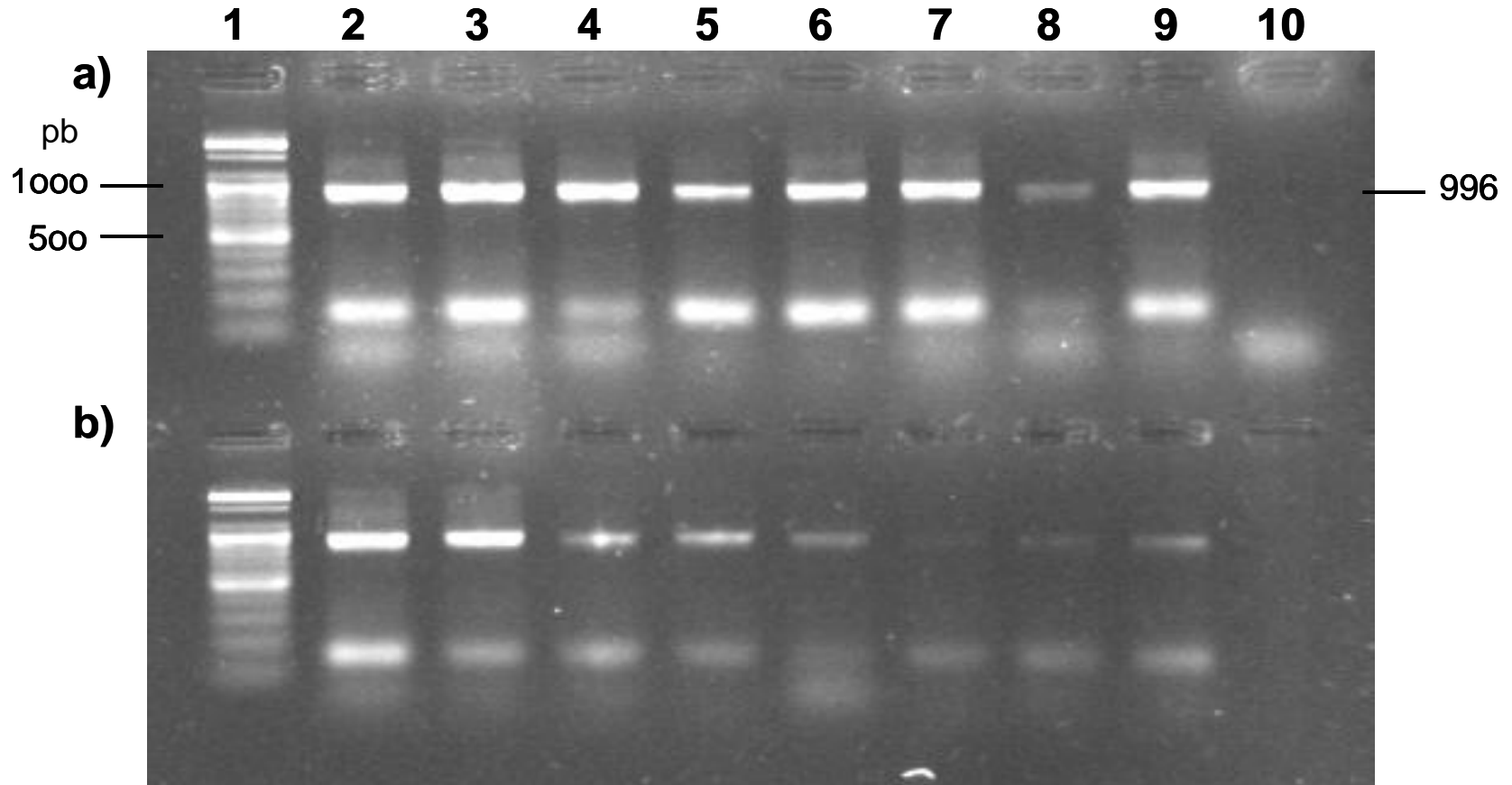


Figura 12. Amplificación del ARNr 16S

Fila a) Carril: 1. MPM 100 pb; 2. A3; 3. A7; 4. A8; 5. A9; 6. A10; 7. A11; 8. A14; 9. A15; 10. Control negativo H₂O.

Fila b) Carril: 1. MPM 100 pb; 2. A17; 3. A21; 4. A22; 5. A24; 6. AC; 7. AD; 8. AF; 9. *E.coli* DH10 β

En todas las muestras se pudo observar la banda de 996 pb, la cual corresponde al producto amplificado esperado por los oligonucleótidos U1 y U2 en la PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S. La formación del producto de 996 pb, indica que efectivamente se cuenta con ADN bacteriano, y que las concentraciones de ADN usadas como templado son eficientes para la amplificación por PCR.

5.4.3 Ensayo de TP-RAPD (Rivas y col., 2001)

Una vez realizado el ensayo de PCR de la subunidad ARNr 16S, se procedió a realizar la amplificación TP-RAPD de acuerdo a las condiciones descritas por Rivas y col., (2001), de los 15 aislados bacterianos en conjunto con *Rhizobium phaseoli* (cepa 1806). Se incluyó ADN de *E.coli* DH10 β como control positivo, y una muestra de la mezcla de PCR sin ADN como control negativo de la amplificación. El perfil de amplicones fue separado en geles de agarosa al 2% en TAE 1X y visualizado luego de la tinción con bromuro de etidio y la exposición sobre un transiluminador de luz UV, registrando en un equipo de fotodocumentación las imágenes que se muestran a continuación (Figura 13).

El ensayo TP-RAPD mostró perfiles de bandas para cada una de las muestras, a excepción del aislado 3 (Figura 13 a, carril 5), para el cual no se obtuvo productos de amplificación. El resto de los 14 aislados mostraron perfiles específicos de bandas con patrones conformados por un número de una a cuatro bandas, distribuidas en un intervalo entre 150pb y 643pb. El producto de 643 pb presente en todas las muestras, corresponde al segmento completo amplificado por los oligonucleótidos 879F y 1522R. El resto de las bandas observadas se encuentran por debajo de este tamaño.

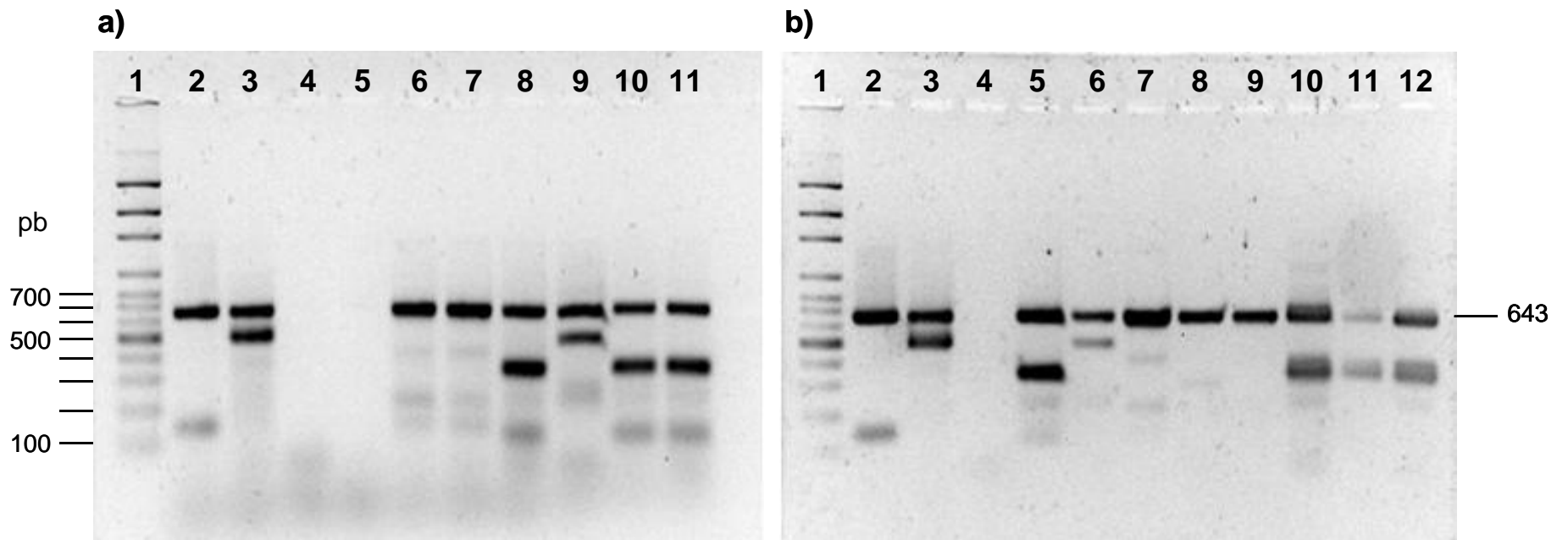


Figura 13. Amplificación por TP-RAPD

a) Carriles: 1. MPM 100 pb BIONEER; 2. *Escherichia coli* (*Ec*); 3. *Rhizobium phaseolus*; 4. Control negativo H₂O; 5. A (Aislado)3; 6. A7; 7. A8; 8. A9; 9. A10; 10. A11; 11. A14.

b) Carriles: 1. MPM 100 pb BIONEER; 2. *Ec*; 3. *Rhizobium phaseolus*; 4. Control neg; 5. A15; 6. A17; 7. A21; 8. A22; 9. A24; 10. AC; 11. AD; 12. AF

La electroforesis directa de productos de PCR permite el análisis de un arreglo de amplicones generados con cebadores universales revelados como un patrón o perfil de bandas en el gel de agarosa. El arreglo obtenido para cada microorganismo es llamado huella dactilar, ampliamente conocido por su nombre en inglés, PCR fingerprints, ya que representa una huella genética única capaz de identificar a distintos grupos de organismos. La técnica TP-RAPD pertenece a esta categoría, y consiste en el uso de dos iniciadores universales que amplifican el ADN ribosomal 16S, para obtener huellas genéticas (PCR fingerprints) en diferentes especies de bacterias (Rivas y col., 2001). La obtención de los perfiles para 14 aislados bacterianos obtenidos en el presente trabajo confirma que la técnica TP-RAPD es efectiva para análisis de diversidad genética en bacterias.

Rivas y col. (2001), realizaron un amplio estudio del alcance de la técnica TP-RAPD, en el cual analizaron varios géneros de bacterias, varias especies del mismo género, y varias cepas de la misma especie, algunas de ellas con diferentes perfiles de plásmidos. En este estudio se incluyeron rizobios de crecimiento rápido y lento. En sus resultados encontraron que, para las cepas pertenecientes a distintas especies, ya sean de igual o distinto género, el patrón de bandas es diferente, mientras que para las cepas pertenecientes a una misma especie el patrón de bandas es el mismo. De igual forma, los patrones son idénticos en diferentes experimentos de PCR, con diferentes extracciones de ADN, y para distintas etapas de crecimiento del cultivo bacteriano.

También fue demostrado en este estudio, que los perfiles de bandas generadas por el TP-RAPD no muestran variaciones debido al contenido de ADN plasmídico, mientras que algunos autores han encontrado diferencias en otros patrones RAPD relacionadas con éste. Este resultado indica que los patrones obtenidos por el TP-RAPD muestran amplificaciones aleatorias de ADN cromosómico exclusivamente. Debido a que los iniciadores usados amplifican una región específica del ADN ribosomal 16S, es muy posible que los amplicones correspondan

a secuencias que estén dentro de esta región o cercanas a ella; por lo cual no interviene el ADN plasmídico presente.

La técnica de PCR ha sido ampliamente usada en el reconocimiento y caracterización de bacterias. Los ensayos usados hasta ahora para identificación taxonómica están basados en tres métodos: la determinación de la secuencia de genes de interés a partir de un fragmento amplificado por PCR, el análisis de los fragmentos producidos en la digestión de un segmento amplificado por PCR con enzimas endonucleasas de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism [Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción], su variante específica ARDRA, por sus siglas en inglés: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis [Análisis de Restricción de la Amplificación del ADN Ribosomal]) y la electroforesis directa de productos de PCR obtenidos al azar (RAPD por su siglas en inglés Random Amplification DNA). Existen también otros análisis basados en secuencias repetitivas (ej: BOX-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR, etc.) que han sido aplicados a un amplio número de bacterias para obtener huellas genéticas por PCR, sin embargo para estos ensayos se ha reportado que pueden mostrar variaciones intraespecíficas (Rivas y col., 2001).

Los 14 perfiles obtenidos en el presente trabajo fueron analizados usando el programa Guefast Scan, con el cual se examina la densidad óptica de cada una de las bandas en la imagen del gel. A cada banda le es asignada un densidad óptica y aquellas bandas que presentan un mismo valor de densidad óptica son consideradas la misma una vez discriminados los patrones para cada muestra (Figura 14). Se hizo un análisis de similitud entre perfiles de distintas muestras en base al número de bandas compartidas. Los diferentes perfiles fueron relacionados por el porcentaje de similitud, tomando como 100% de similitud al total de bandas compartidas. A partir de este análisis se encontró que de los 14 aislados solo hay 10 perfiles diferentes (enumerados del I al X), debido a que hay aislados que comparten el mismo perfil. Este resultado indica heterogeneidad en las poblaciones rizobianas estudiadas.

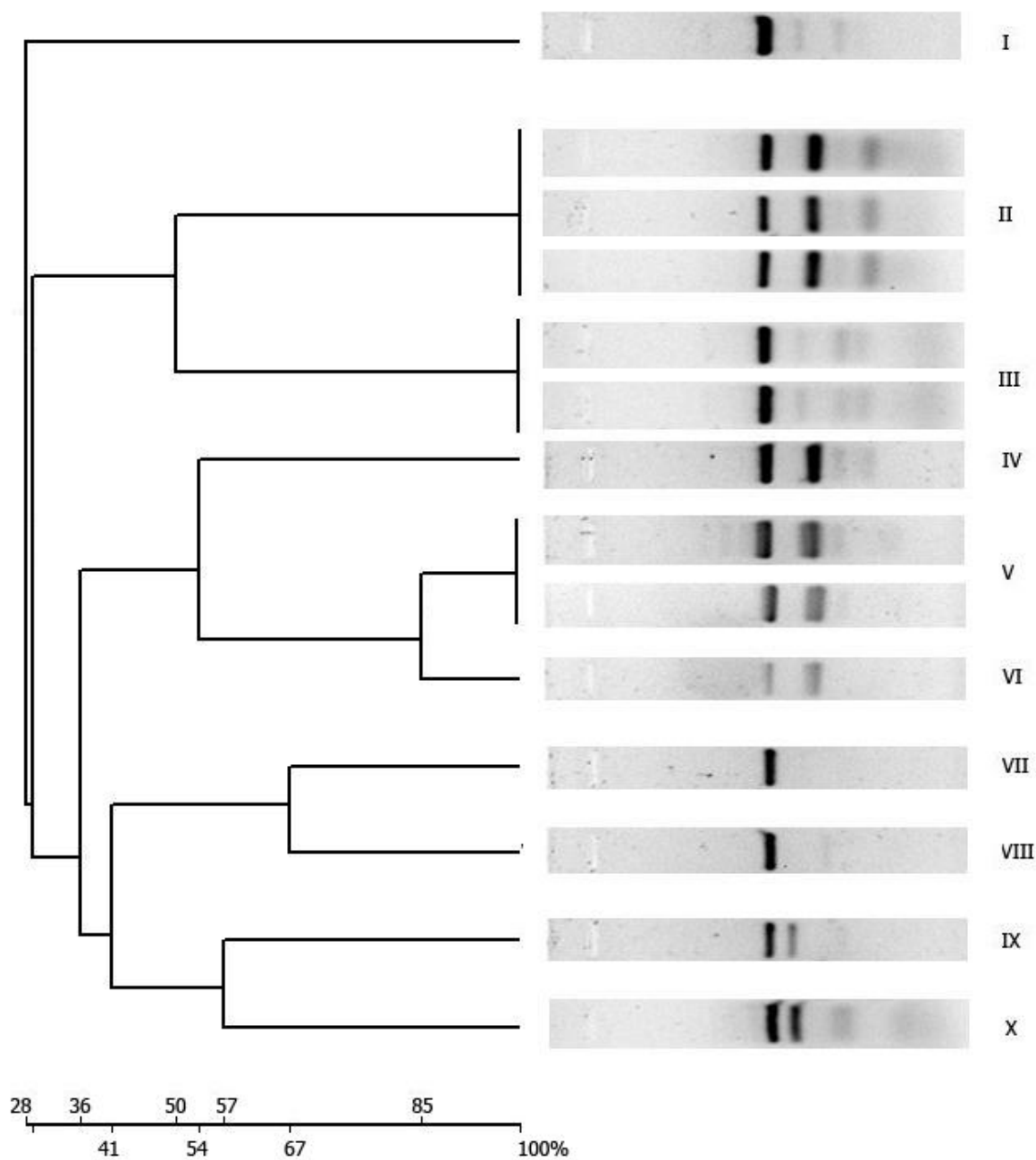


Figura 14. Árbol de correlación de similitud entre los perfiles obtenidos.

I (A21); II (A9, A11 y A14); III (A7 y A8); IV (A15); V (AC y AF); VI (AD); VII (A24); VIII (A22); IX (A17) y X (A10). La escala ubicada en la parte inferior izquierda representa el porcentaje de similitud entre los perfiles según el número de bandas compartidas.

En el dendrograma mostrado en la figura 14 se observa la correlación de los diez patrones obtenidos. En base a lo reportado por Rivas y col. (2001); se puede considerar que en el presente trabajo se identificaron 10 potenciales especies o variedades bacterianas diferentes, correspondiendo cada especie a un perfil de bandas en particular, siendo necesaria la posterior verificación de las especies obtenidas mediante la secuenciación de la subunidad ribosomal ARNr 16S.

En el árbol de correlación (Figura 14) se observan los 10 tipos de perfiles enumerados del I al X; donde los aislados 9,11 y 14 comparten el perfil II, los aislados 7 y 8 comparten el perfil III, los aislados C y F comparten el perfil V, y el resto de los aislados presenta un perfil único que no es compartido con ningún otro. Este resultado brinda la discriminación que las pruebas bioquímicas no alcanzan en los estudios de rizobios, demostrando que 14 aislados bacterianos que comparten iguales características morfológicas y microbiológicas presentan diferentes características genéticas, siendo organismos posiblemente diferentes.

Según Rivas y col. (2001) cada perfil de bandas es considerado una huella genética bacteriana, en base a esto, encontramos que en el presente ensayo se identificaron 10 huellas genéticas diferentes de un total de 15 bacterias aisladas, lo que constituye un aporte para el conocimiento de la diversidad genética de las bacterias nativas del suelo de la Estación Experimental la Iguana, que se encuentran asociadas a los nódulos de *Calopogonium sp.* y disponibles para las leguminosas de la zona. De igual manera, debe tenerse en cuenta que el presente resultado es preliminar, considerando que no discrimina las especies de bacterias, ni que las mismas sean rizobios o no.

En cuanto a la diversidad de patrones o huellas genéticas obtenidas, se encontró que los aislados provenientes de nódulos del campo presentaron una diversidad de perfiles mayor a la de los aislados provenientes de nódulos del ensayo de NMP. Los perfiles de los aislados provenientes del campo presentaron desde un 28% hasta un 100% de similitud de bandas, mientras que los aislados provenientes del ensayo de NMP presentaron desde un 85% hasta un 100% de similitud de

bandas (Figura 14, perfiles V y VI). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el número de aislados provenientes del NMP es mas baja (tres aislados) que el número de aislados provenientes de nódulos del campo (doce aislados). Por otra parte, los aislados del campo provienen de diferentes zonas en una extensión amplia del área de estudio donde se encontraban las plantas de *Calopogonium sp.* noduladas, mientras que los aislados del NMP provienen de una zona específica del área de estudio en la cual se recolecto la muestra de suelo con la que se realizaron los ensayos de laboratorio, por lo tanto, el resultado obtenido es acorde con obtener una mayor diversidad genética en un área mas grande de suelo.

La técnica original de RAPD consiste en el uso de un solo oligonucleótido de pequeño tamaño (aproximadamente 10 nt); lo que causa alta variabilidad en las zonas de anclaje en el ADN usado como templado, generando segmentos amplificados de forma aleatoria. En cambio, la Técnica TP-RAPD consiste en el uso de dos oligonucleótidos de mayor tamaño (aproximadamente 20 nt) que amplifican un fragmento único de ADN, correspondiente al ADNr 16S. Los oligonucleótidos usados tienen una temperatura de hibridación (annealing) de 65°C; sin embargo, cuando la amplificación es realizada a temperaturas más bajas (55°C o 50°C) se aumenta la variabilidad en las zonas de anclaje en el ADN, generando una serie de amplicones que conforman un arreglo en particular para cada muestra. Según Rivas y col. (2001), la temperatura de hibridación de 50°C es relativamente alta, lo cual evita problemas de reproducibilidad como se ha descrito por otros autores. En base a las diferencias que hay entre estas dos técnicas, en estudios de biodiversidad pueden combinarse según el interés del caso. Valverde (2003), realizó un estudio de biodiversidad de rizobios en el que uso las técnicas TP-RAPD y RAPD. Los TP-RAPD le permitieron obtener perfiles característicos de las distintas especies microbianas, por lo que fue usada como técnica para obtener los agrupamientos iniciales. Posteriormente, una vez identificadas las especies, usó la técnica RAPD con el propósito de generar una mayor variabilidad en los perfiles, y estudiar la biodiversidad por debajo del nivel de especie. Este tipo de estudio podría realizarse en investigaciones posteriores con los 15 aislados analizados en el presente trabajo,

a fin de aumentar el conocimiento de la diversidad genética presente en las bacterias rizosféricas de los llanos venezolanos.

5.5 Evaluación del efecto de los 15 aislados obtenidos sobre la biomasa seca, contenido de N total y eficiencia de fijación de N de *Calopogonium* sp.

La capacidad de nodulación de los aislados bacterianos y el efecto de los mismos sobre la producción de biomasa seca y el contenido de N total del vástago, fue evaluada mediante la inoculación de plántulas de la especie *Calopogonium* sp. en condiciones de vivero.

En la tabla 19 se muestran los valores de diferentes parámetros evaluados luego de la cosecha de las plantas inoculadas con los 17 tratamientos, de los cuales 15 corresponden a los aislados bacterianos, el tratamiento 16 corresponde a riego con solución nutritiva Norris y Date sin N, representando un control negativo, y finalmente el tratamiento 17 corresponde a la inoculación con la cepa 1806 de *R. phaseoli*, representando un control positivo. La designación de la nomenclatura de los aislados fue asignada según el orden de placas de origen, no correspondiendo a ninguna colección preexistente.

Los resultados de la evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre la nodulación, biomasa seca del vástago (BS), contenido de N total del vástago y eficiencia de fijación de N (EFN) en *Calopogonium* sp. se presentan en la tabla 19.

5.5.1 Pruebas de nodulación de los aislados bacterianos en *Calopogonium* sp.

Luego de 9 semanas de iniciado el ensayo, se procedió a evaluar la respuesta de nodulación en las plantas. Para la evaluación de la nodulación se tomó en cuenta únicamente la presencia o ausencia de nódulos en las raíces.

Tabla 19. Propiedades medidas en el vástago de las plantas de *Calopogonium* sp. inoculadas en los ensayos de vivero.

Donde: BS: Biomasa Seca, N: Nitrógeno, EFN: Eficiencia de Fijación de Nitrógeno, Nod: Nodulación.

Tratamiento (\bar{X} ; n=3)	BS \pm ES (g)	N \pm ES (mgN/gBS)	EFN (%)	Nod	Perfil TP-RAPD
B03	0,14 \pm 0,04	3,61 \pm 0,45	81,20 \pm 10,11	-	----
B07	0,21 \pm 0,03	4,55 \pm 0,56	102,39 \pm 12,57	-	III
B08	0,24 \pm 0,02	3,40 \pm 0,92	76,59 \pm 20,74	-	III
B09	0,11 \pm 0,01	4,36 \pm 0,20	98,22 \pm 4,58	-	II
B10	0,12 \pm 0,02	3,95 \pm 0,09	88,86 \pm 2,03	-	X
B11	0,19 \pm 0,06	3,37 \pm 0,32	75,83 \pm 7,15	+	II
B14	0,14 \pm 0,04	4,45 \pm 0,96	100,20 \pm 21,61	-	II
B15	----	----	----	----	IV
B17	0,23 \pm 0,02	3,64 \pm 0,54	82,02 \pm 12,09	-	IX
B21	0,15 \pm 0,03	4,87 \pm 0,93	109,77 \pm 20,96	-	I
B22	0,19 \pm 0,02	3,77 \pm 0,33	84,80 \pm 7,39	+	VIII
B24	0,22 \pm 0,00	2,81 \pm 0,14	63,36 \pm 3,12	-	VII
BC	0,15 \pm 0,02	3,81 \pm 0,15	85,88 \pm 3,29	-	V
BD	0,12 \pm 0,03	4,65 \pm 0,58	104,82 \pm 13,02	-	VI
BF	0,20 \pm 0,04	3,73 \pm 0,59	83,94 \pm 13,39	-	V
BCO	0,18 \pm 0,03	4,66 \pm 0,45	105,05 \pm 10,22	-	----
1806	0,19 \pm 0,02	4,44 \pm 0,50	100,00 \pm 11,36	+	----

Los resultados son el promedio de 3 réplicas por tratamiento. Se reportan más/menos el error estándar.

Las plantas inoculadas con los aislados B11 y B22 dieron respuesta positiva a la nodulación (Tabla 19), induciendo la formación de 3 a 7 nódulos por planta. El resto de los 13 aislados bacterianos, B3, B7, B8, B9, B10, B14, B17, B21, BC, BD y BF, no indujeron la formación de nódulos en las plantas. Las plantas inoculadas con el aislado B15 murieron durante el ensayo, por lo que no se cuenta con resultados sobre este tratamiento. Por su parte, las plantas inoculadas con la cepa control 1806 *R. phaseoli* dieron respuesta positiva a la nodulación, formando de 20 a 30 nódulos por planta. Los nódulos formados fueron pequeños, de 1mm de diámetro, y se encontraban dispuestos a lo largo de todo el sistema radical. No fue posible realizar la evaluación visual de la coloración interna de los nódulos, la cual es indicativa de su viabilidad, debido al pequeño tamaño de los mismos. En la figura 15 se muestran las imágenes de los nódulos obtenidos en los ensayos de inoculación.

Barrientos y col., (2002) indican que la infectividad se evalúa mediante el número de nódulos y su distribución en la raíz. Sicardi (1992) describe como algunas características generales de infectividad inefectiva la formación de nódulos pequeños, de 1-2 mm de diámetro, la distribución de los mismos en todo el sistema radical y la presencia de color interno blanco. Las dos primeras características se corresponden con los resultados obtenidos en el presente ensayo; lo que indica que puede tratarse de una nodulación inefectiva en todos los casos.

Como resultado de los ensayos de inoculación se obtuvo que 2 de los 15 aislados bacterianos evaluados indujeron la formación de nódulos, lo que corresponde a 13,3% del total. Por otra parte, los aislados BC, BD y BF, los cuales fueron extraídos de nódulos provenientes de las plantas inoculadas en el ensayo de NMP, ninguno indujo la formación de nódulos en el presente ensayo. Resultados similares fueron obtenidos por Madrid (2007), quien realizó un estudio de aislados bacterianos provenientes de nódulos de la especie *Centrosema macrocarpum*, nativos del suelo de la Estación Experimental La Iguana, y encontró que 4 de 8 aislados, lo que corresponde a 50% del total, fueron capaces de inducir nodulación en plantas de *Centrosema macrocarpum*, mientras que los 4 restantes no indujeron la formación de nódulos.

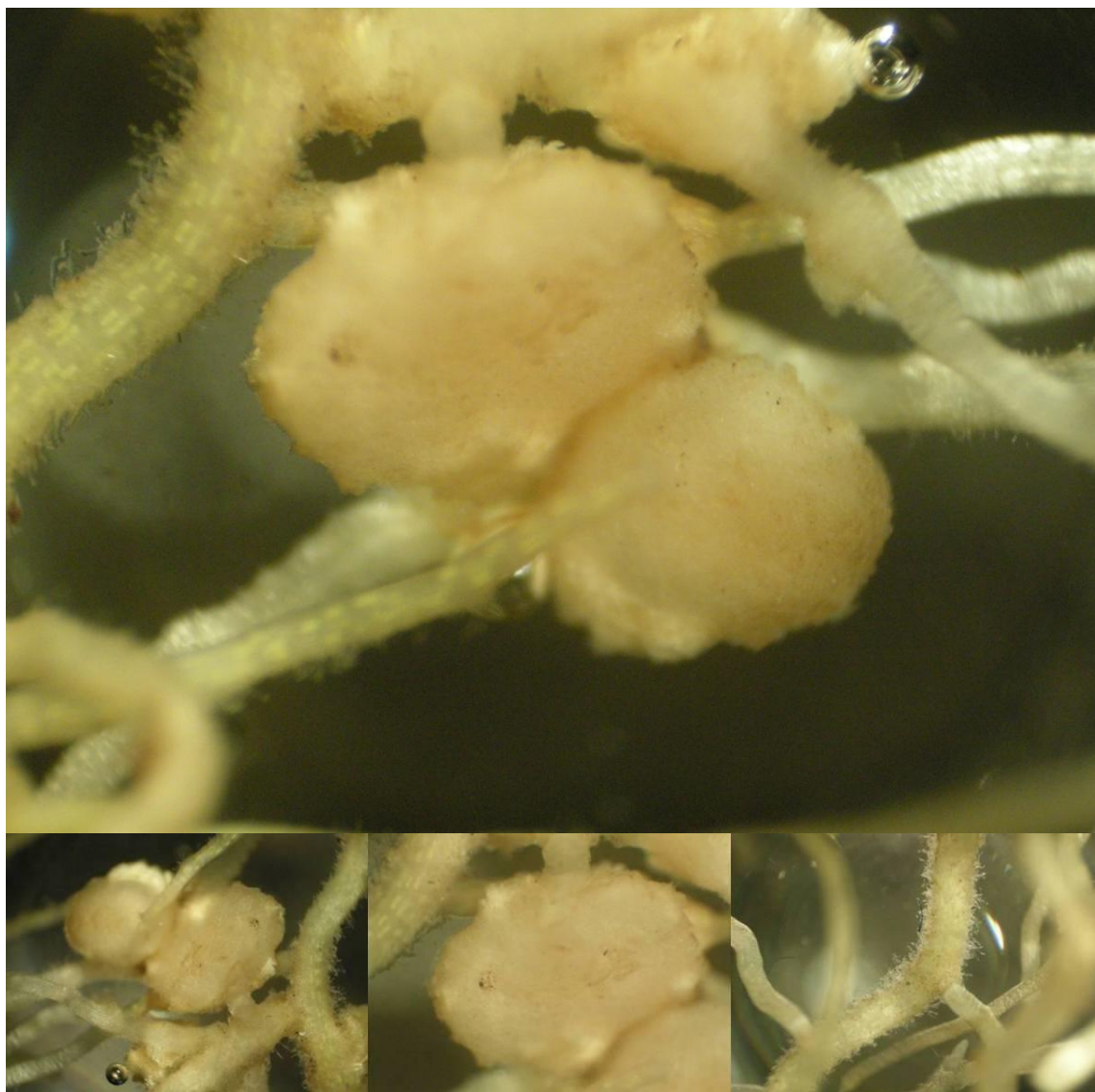


Figura 15. Nódulos obtenidos en los ensayos de inoculación de los aislados bacterianos en plantas de *Calopogonium sp.* Arriba; Abajo izq. y Abajo centro: nódulos en las raíces de las plantas. Abajo der.: raíces sin nódulos.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por Barrientos y col., (2002); en los distintos ambientes naturales no siempre se encuentran cepas efectivas de rizobios, donde ocurre la formación del nódulo más no se realiza la fijación de nitrógeno. Por otra parte, los aislados bacterianos no infectivos sobrevivieron a la esterilización de la superficie del nódulo (Brunet y col., 1999) previamente al aislamiento, por lo que se asume que ellos estaban dentro de los nódulos. La presencia de estas bacterias dentro de los nódulos se debe a que la planta constituye un nicho extremadamente diverso para microorganismos (Ibañez y col., 2009).

Los tejidos internos de las plantas, tanto tejido nodular como de otros órganos, son colonizados por una amplia diversidad de microorganismos endófitos que encuentran en dichos tejidos protección de los factores externos bióticos y abióticos (Ibañez y col., 2009). Diferentes investigadores han encontrado asociaciones bacterianas en nódulos de leguminosas; conocidas como “nodule-associated bacteria” (Chen y col., 2001; Chen y col., 2005; Moulin y col., 2001 y Valverde y col., 2003). En relación a estas asociaciones se han hecho reportes que proveen información de *Gammaproteobacteria* (géneros – *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Pantoea*, y *Enterobacter*) asociadas a nódulos en leguminosas, estudios que se han profundizado con análisis genéticos, amplificando los genes 16S y *nifH* entre otros (Bai y col., 2002).

Ibañez y col., (2009) realizaron un estudio con siete aislados nativos de rápido crecimiento obtenidos de nódulos de plantas de maní, provenientes del área productora de Córdoba, Argentina, que luego no fueron capaces de inducir la formación de nódulos en esta leguminosa. A través de estudios genéticos encontraron que dichos aislados pertenecen a las *Gammaproteobacteria*, relacionados específicamente con los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Mediante ensayos de co-inoculación en plantas de maní con el simbionte *Bradyrhizobium sp.*, encontraron que estos aislados son capaces de colonizar los nódulos de las raíces durante o después de su formación. Estas

bacterias que invaden el nódulo son mejor descritas como bacterias oportunistas y no simbioses genuinos, que cuentan con la cooperación del rizobio, que es necesario para la ocupación del nódulo.

Al analizar los perfiles de TP-RAPD correspondientes a los aislados que indujeron nodulación positiva (Tabla 19), se observa que el aislado B22 presenta el perfil VIII, el cual no es compartido con ninguno del resto. Mientras que el aislado B11 presenta el perfil II, que es compartido con los aislados B9 y B14, los cuales no indujeron nodulación. Según Rivas y col., (2001) cada perfil obtenido por TP-RAPD se corresponde potencialmente a una especie bacteriana diferente, lo que indica que de confirmarse que los aislados B9, B11 y B14 pertenezcan a una misma especie, las diferencias mostradas en la capacidad infectiva podrían deberse a variaciones genéticas intraespecíficas. Los genes de las plantas que participan específicamente en la formación de nódulos son llamados genes *Nod*, "Nodulin (*Nod*) genes". Mientras que los genes de los rizobios que participan en la señalización que induce la formación del nódulo son llamados genes *nod*, "nodulation (*nod*) genes". (Taiz y Zeiger, 2006). Por lo que diferencias intraespecíficas en los genes *nod* podrían generar diferencias en la capacidad infectiva de dos cepas distintas de la misma especie. Por otro lado, Young (1996) reporta que en muchos de los rizobios de crecimiento rápido los genes de nodulación y fijación de nitrógeno están determinados en plásmidos, por lo que éstos podrían perderse en los procesos de intercambio genético.

Distinguir entre la inestabilidad genética inherente o inducida por el medio ambiente en una cepa de rizobio es difícil, sin embargo, se ha demostrado que una colonia aislada de cultivos parentales mantenidos en condiciones de laboratorio posteriormente mostraron disminución en el número de nódulos formados, efectividad simbiótica variable e incluso pérdida de invasividad; en base a lo cual se presume que existen factores del mantenimiento en laboratorio que posiblemente podrían ocasionar pérdida de la infectividad y la efectividad de los rizobios (Barrientos y col., 2002).

Las investigaciones sobre la capacidad infectiva de los rizobios continúan, y hasta el presente, la capacidad de inducir la formación de nódulos en las plantas es considerada la característica definitiva que permite identificar a una bacteria como perteneciente al grupo de los rizobios. Los resultados de la prueba de nodulación del presente trabajo, en conjunto con las características microbiológicas obtenidas previamente, permiten identificar a los aislados B11 y B22 como bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, ya que presentan todas las características generales de este género y la capacidad de inducir nódulos en las raíces de la leguminosa *Calopogonium sp.* Este resultado permite reconocerlos como rizobios nativos que conforman un recurso microbiano potencial de los suelos del estado Guárico.

5.5.2 Cuantificación de la biomasa seca del vástago de las plantas de *Calopogonium sp.* inoculadas.

Se evaluó el efecto de los 17 tratamientos sobre la producción de biomasa seca del vástago en las plantas, para ello se recolectó la parte aérea de las mismas, se sometió a secado en la estufa hasta peso constante, y se midió su masa en gramos (Tabla 19). Las plantas inoculadas con los aislados bacterianos presentaron valores de biomasa seca entre 0,11 y 0,24 gramos por maceta. El tratamiento control 1806 (*R. phaseoli*) produjo 0,19 gramos por maceta y el tratamiento control BCO (sin inóculo) produjo 0,18 gramos por maceta. En cada maceta crecieron 3 plantas en promedio, y se analizaron en conjunto debido a la pequeña cantidad obtenida de material vegetal.

En el gráfico mostrado en la figura 16 se pueden observar los valores de biomasa seca obtenidos en cada uno de los tratamientos, el valor más alto corresponde al tratamiento B8, y el más bajo al tratamiento B9. Los tratamientos B7, B8, B17, B24 y BF obtuvieron valores mayores al tratamiento 1806, el cual corresponde al inóculo de *R. phaseoli*.

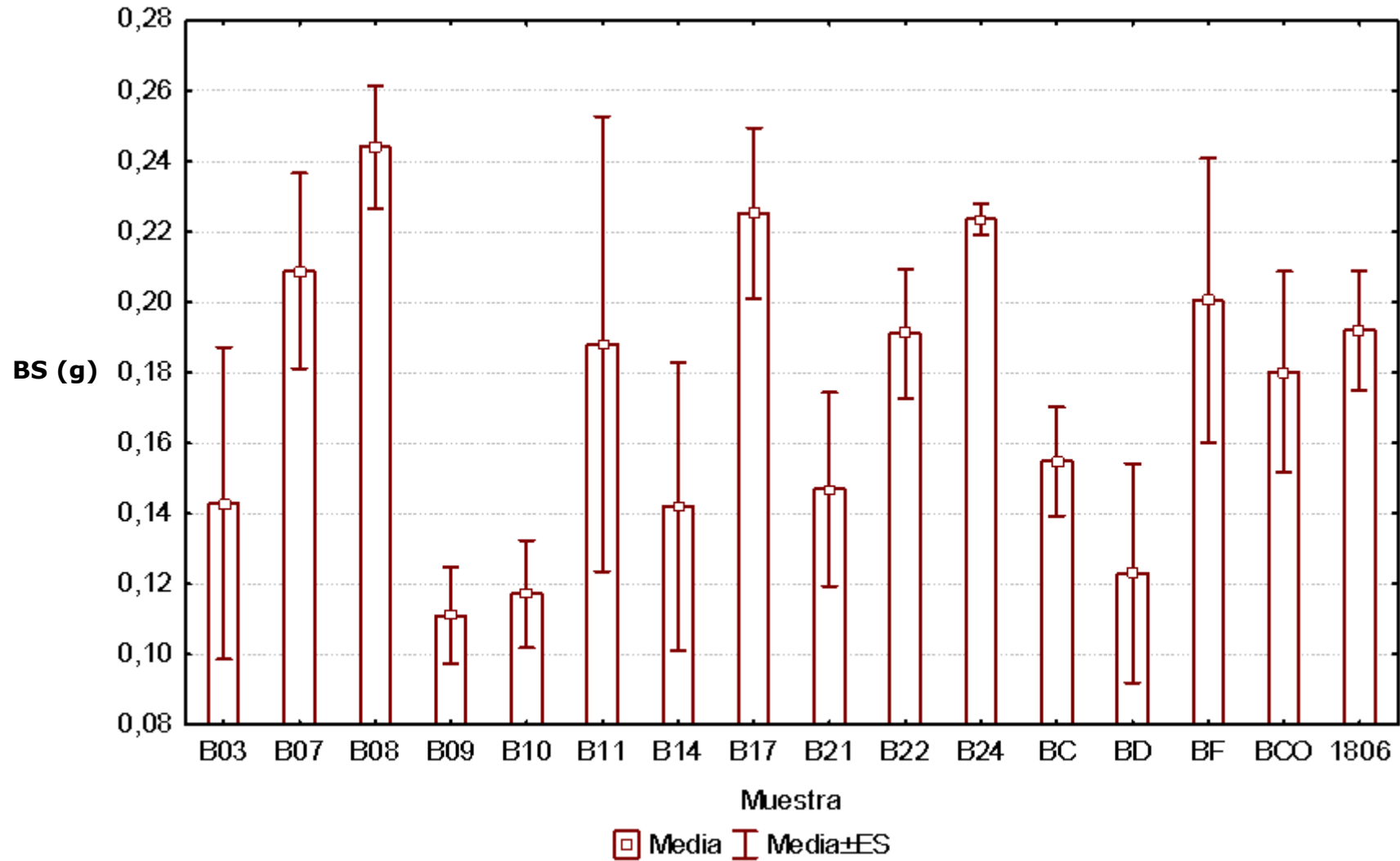


Figura 16. Biomasa seca obtenida en cada tratamiento.

Por otra parte, el valor obtenido para el tratamiento control BCO, sin inóculo bacteriano, mostró un valor más alto que el alcanzado por más de la mitad de los tratamientos con inóculos. Sin embargo, al evaluar los datos mediante un análisis de varianza de una vía, usando el programa Statistics (7.0), se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los distintos valores de biomasa seca generados en cada uno de los tratamientos, tampoco entre los aislados que presentan el mismo perfil TP-RAPD.

Puertas y col., (2008) evaluaron el establecimiento de cinco cultivos de cobertura, entre los cuales se encontraba *Calopogonium mucunoides* (L.), la segunda en producir mayor cantidad de materia seca, con una producción de 5.93 t/ha (toneladas por hectárea). Este reporte indica que las plantas de este género pueden presentar una alta producción de biomasa. Widiastuti (2007) hizo un estudio sobre el efecto de la inoculación combinada de *Bradyrhizobium sp.*, *Aeromonas punctata* (bacteria solubilizadora de fosfato) y *Acaulospora tuberculata* (hongo micorrízico) sobre el crecimiento de las leguminosas *Calopogonium caeruleum* y *Centrosema pubescens.*, usando como sustrato un suelo ácido con bajo nivel de nutrición. Luego de 3 meses de duración del ensayo, los resultados mostraron que la inoculación de *C. caeruleum* con *Bradyrhizobium sp.*, *A. punctata* y *A. tuberculata* produjo un efecto significativamente positivo en la altura, número de hojas y número de nódulos en las plantas. Sin embargo, el tratamiento no mostró un aumento significativo de la biomasa, la absorción de N, P, y K de la planta; obteniendo un valor de peso seco del vástago de 0,2 g/pl (gramos por planta) para el tratamiento control sin inóculo, y de 1,79 g/pl para el tratamiento con inóculo combinado. En contraste, los valores de biomasa seca obtenidos para *Calopogonium sp.* en el presente trabajo fueron más bajos, siendo el más alto 0,24 gramos por maceta.

Sicardi (1992) seleccionó 11 cepas de rizobios nativos de la Estación Experimental La Iguana, e hizo inoculaciones en plantas de frijol, donde observó su efecto en un ensayo de 45 días. Los valores de biomasa aérea de las plantas inoculadas con los aislados nativos se encontraron de 0,13 a 0,98 g/pl, mientras que

el control positivo correspondiente a *Bradyrhizobium sp.* obtuvo 2,14 g/pl. Por otra parte Madrid (2007) en su estudio de 8 aislados bacterianos nativos de la misma área de estudio, extraídos de *Centrosema macrocarpum*, hizo inoculaciones en plantas de esta misma especie usando para ello Jarras Leonard en un ensayo de 120 días. *Centrosema macrocarpum* es una leguminosa trepadora de porte similar a *Calopogonium sp.*, perteneciendo ambas a la subfamilia *Papilionoideae*. Los valores de biomasa seca obtenidos para *Centrosema macrocarpum* se encontraron entre 0,25 a 2,85 gramos totales cosechados en cada jarra. En ambas investigaciones se obtuvieron valores de biomasa seca superiores a los obtenidos en el presente trabajo.

Brunet y col., (1999) en su estudio sobre la efectividad de 3 cepas de *Rhizobium phaseoli* en plantas de frijol, obtuvieron un valor promedio de biomasa seca de 94,5 g/pl a los 28 días de crecimiento, este valor es mas alto que el obtenido en el presente trabajo, donde el tratamiento control 1806 produjo un valor promedio de 0,19 gramos por maceta.

En investigaciones realizadas en Chile, en trébol rosado (*Trifolium pratense*), Urzúa y Torres (1985) señalaron que las bajas mediciones obtenidas en peso seco de la parte aérea y radical son el resultado de nódulos inefectivos (Citado en Barrientos y col., 2002). En este ensayo la gran parte de los tratamientos no indujeron nodulación, y aquellos que dieron respuesta positiva presentaron características similares a las observadas en nodulaciones inefectivas (Sicardi, 1992), lo que podría ser causa de los bajos valores obtenidos en biomasa seca.

En general, los valores de BS obtenidos en el presente trabajo no permiten realizar conclusiones sobre las características de los 15 aislados bacterianos, sin embargo conforman una base de datos para estudios posteriores.

5.5.3 Cuantificación del N total del vástago de las plantas de *Calopogonium* sp. inoculadas.

Seguido de las mediciones de biomasa seca se realizó la evaluación del efecto de los 17 tratamientos sobre el contenido de N total presente en el vástago de las plantas (Tabla 19), siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.8. Las plantas inoculadas con los aislados bacterianos presentaron valores de N entre 2,81 y 4,87 mgN/gBS (miligramos por gramo de Biomasa Seca). El tratamiento control positivo 1806 (*R. phaseoli*) produjo un contenido de N de 4,44 mgN/gBS, mientras que el tratamiento control negativo BCO (sin inóculo) produjo 4,66 mgN/gBS. Los tratamientos B11 y B22 presentaron valores de 3,37 y 3,77 mgN/gBS respectivamente.

En el gráfico mostrado en la figura 17 se puede observar de forma cualitativa los valores de N obtenidos en cada uno de los tratamientos, el valor más alto corresponde al tratamiento B21, y el más bajo al tratamiento B24. Los tratamientos B7, B9, B14, B21, BD y BCO obtuvieron valores mayores al tratamiento 1806, mientras que los tratamientos B11 y B22 presentaron valores similares entre sí y menores al tratamiento 1806. Por su parte, el contenido de N para el tratamiento BCO, al igual que en el análisis de producción de biomasa seca, mostró un valor más alto que el alcanzado por más de la mitad de los tratamientos con inóculos bacterianos. Al evaluar los datos mediante un análisis de varianza de una vía se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los distintos valores de N de cada uno de los tratamientos, tampoco entre los aislados que presentan el mismo perfil TP-RAPD.

Los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre si, lo que podría deberse a la alta variabilidad de este particular sistema, sin embargo proporcionan una referencia para estudios posteriores.

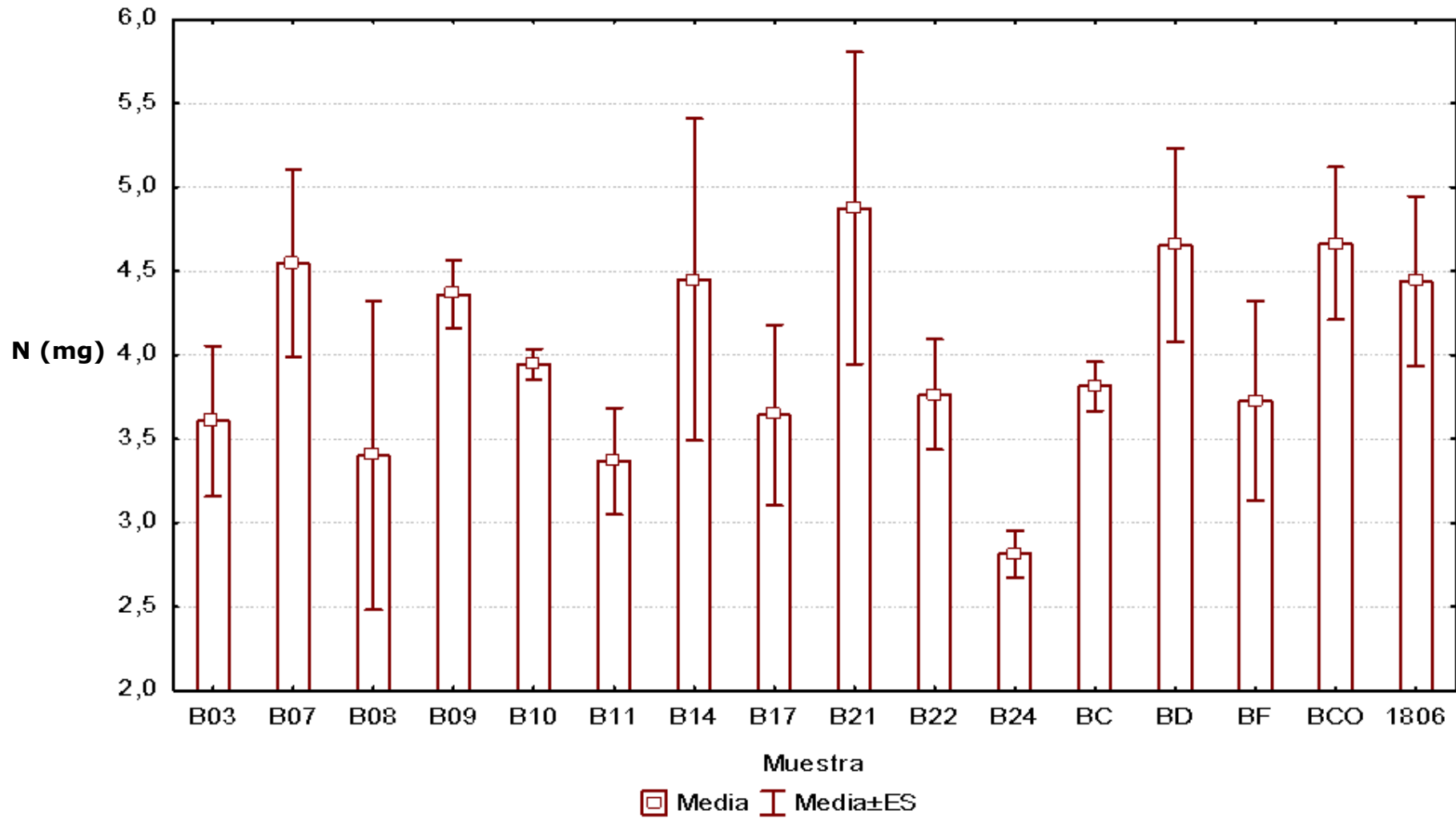


Figura 17. N total obtenido para cada tratamiento.

Los tratamientos B11 y B22, de nodulación positiva, no presentaron diferencia significativa respecto al resto de los tratamientos, probablemente a causa de tratarse de nodulaciones inefectivas en las cuales ocurre la formación de nódulos más no ocurre de manera eficiente la fijación de N en el interior de los mismos, como en el estudio realizado por Barrientos y col., (2001) en el que encontraron algunas cepas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), que poseen solamente capacidad infectiva pero no efectiva sobre *L. glaber*. Sicardi (1992), en su estudio de 11 cepas de rizobios nativos de La Estación Experimental La Iguana inoculadas en plantas de *Vigna unguiculata*, obtuvo valores de N entre 3,83 y 27,88 mgN/g p. seco, y 36, 73 mgN/g p. seco para el control positivo correspondiente a *Bradyrhizobium* sp., encontrando diferencias significativas entre algunos de ellos.

Por otra parte Madrid (2007) en su estudio de 8 aislados bacterianos nativos de La Estación Experimental La Iguana, extraídos de *Centrosema macrocarpum*, encontró que 4 del total de los aislados indujeron nodulación positiva y obtuvo valores de N entre 4,86 y 12,64 mgN/g p. seco., sin embargo no observó diferencia significativa entre los valores obtenidos para los aislados que indujeron nodulación positiva y los que no. En el presente estudio se obtuvieron valores de N más bajos, 3,37 y 3,77 mgN/gBS para los tratamientos B11 y B22 (nodulación positiva). Las diferencias observadas en los distintos trabajos reportados pueden deberse a múltiples factores, entre ellos se encuentra la planta usada en cada caso, la cual podría determinar una diferencia importante debido a que cada una presenta un desarrollo particular tanto en el campo como en el vivero. De acuerdo con Brunet y col., (1999), la cantidad de nitrógeno fijada varía ampliamente según la leguminosa, la cepa de bacteria nodulante y el suelo. La principal razón de lo antes expuesto es que la señalización que interviene en el proceso de nodulación y el desarrollo de la fijación de nitrógeno en el nódulo involucra genes específicos tanto en el hospedador como en el simbiote (Taiz y Zeiger, 2006), como los genes responsables de la fijación de N (genes *nif*) necesarios para la síntesis de los integrantes del sistema enzimático y los genes reguladores (Pérez, 1990).

Calopogonium mucunoides (L.) en el estudio realizado por Puertas y col., (2008), del establecimiento de cinco cultivos de cobertura en un suelo de trópico húmedo en la amazonía peruana, fue la segunda en alcanzar un mayor contenido de N total, con un valor de 189,16 Kg/ha. Este reporte indica que las plantas de este género pueden llegar a asimilar altas cantidades de N, permitiendo una posterior incorporación de este elemento en el suelo.

En el estudio realizado por Widiastuti (2007) sobre el efecto de la combinación de *Bradyrhizobium* sp., *Aeromonas punctata* y *Acaulospora tuberculata* sobre el crecimiento de las leguminosas *Calopogonium caeruleum* y *Centrosema pubescens*., encontraron que la inoculación de *C. caeruleum* no mostró un aumento significativo de la absorción de nitrógeno, obteniendo un valor de N de 0,87 g/pl para el control sin inóculo, y de 5,67 g/pl para el tratamiento con inóculo combinado. En contraste, los valores de N obtenidos para *Calopogonium* sp. en el presente trabajo fueron mas bajos, siendo el mas alto 4,87 mg/gBS.

En cuanto a la inoculación con *Rhizobium phaseoli*, Brunet y col., (1999) hicieron un estudio sobre la efectividad de 3 cepas de dicha especie en plantas de *Phaseolus vulgaris*, en el que obtuvieron valores entre 1,75 y 3,52 %N a los 28 días de crecimiento. En el presente trabajo el tratamiento 1806, correspondiente al inóculo de *Rhizobium phaseoli*, produjo un valor de N de 4,4 mgN/gBS que corresponde a 0,4 %N al cabo de 63 días (9 semanas) de crecimiento. Este valor podría sugerir que el %N generado por *Rhizobium phaseoli* en plantas de *Calopogonium* sp. tiende a ser mas bajo al obtenido en plantas de *Phaseolus vulgaris*.

En un análisis general, los valores de N obtenidos en el presente trabajo no permiten realizar conclusiones sobre la capacidad de fijación de N de los 15 aislados bacterianos, sin embargo conforman una base de datos para estudios posteriores de los mismos.

5.5.4 Estimación de la eficiencia de fijación de N en las plantas de *Calopogonium* sp. inoculadas.

Se realizó la evaluación de la eficiencia de fijación de N para cada uno de los 17 tratamientos (Tabla 19), siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.7.4 Este análisis permite evaluar la capacidad de incorporar N de las plantas que fueron sometidas a los diferentes tratamientos con respecto a las plantas inoculadas con el tratamiento 1806, el cual constituye el control positivo de nodulación. Para el tratamiento 1806 se consideró una EFN de 100%. Las plantas inoculadas con los aislados bacterianos presentaron una EFN entre 63,36 y 109,77%, mientras que el tratamiento control negativo BCO produjo 105,05%. Los tratamientos B11 y B22 presentaron una EFN de 75,83 y 84,80% respectivamente. En el gráfico mostrado en la figura 18 se puede observar de forma cualitativa los valores de EFN obtenidos en cada uno de los tratamientos. El valor más alto corresponde al tratamiento B21, y el más bajo al tratamiento B24. Los tratamientos B07, B14, B21, BD y BCO obtuvieron valores más altos que el del tratamiento 1806. Por su parte, el tratamiento B11 presentó un valor menor al tratamiento B22, y ambos valores son más bajos que el del tratamiento 1806. Al evaluar los datos mediante un análisis de varianza de una vía se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los distintos valores de EFN de cada uno de los tratamientos, tampoco entre los aislados que presentan el mismo perfil TP-RAPD.

Para evaluar a las cepas de rizobios se han considerado a lo largo del tiempo las diferencias en la acumulación de N total o el rendimiento de biomasa seca de las plantas inoculadas. La biomasa es usada como un criterio adecuado en el estudio de la efectividad de cepas de rizobios debido a su estrecha relación con el contenido de N total de las plantas (Vincent 1962, Vincent, 1982). Se debe tener en cuenta que estos métodos solo proveen una medida indirecta del N₂ fijado, ya que son incapaces de distinguir entre el nitrógeno proveniente de la fijación simbiótica y el proveniente del suelo o cualquier otra fuente (Barrientos y col., 1995), lo cual si es posible empleando metodologías isotópicas.

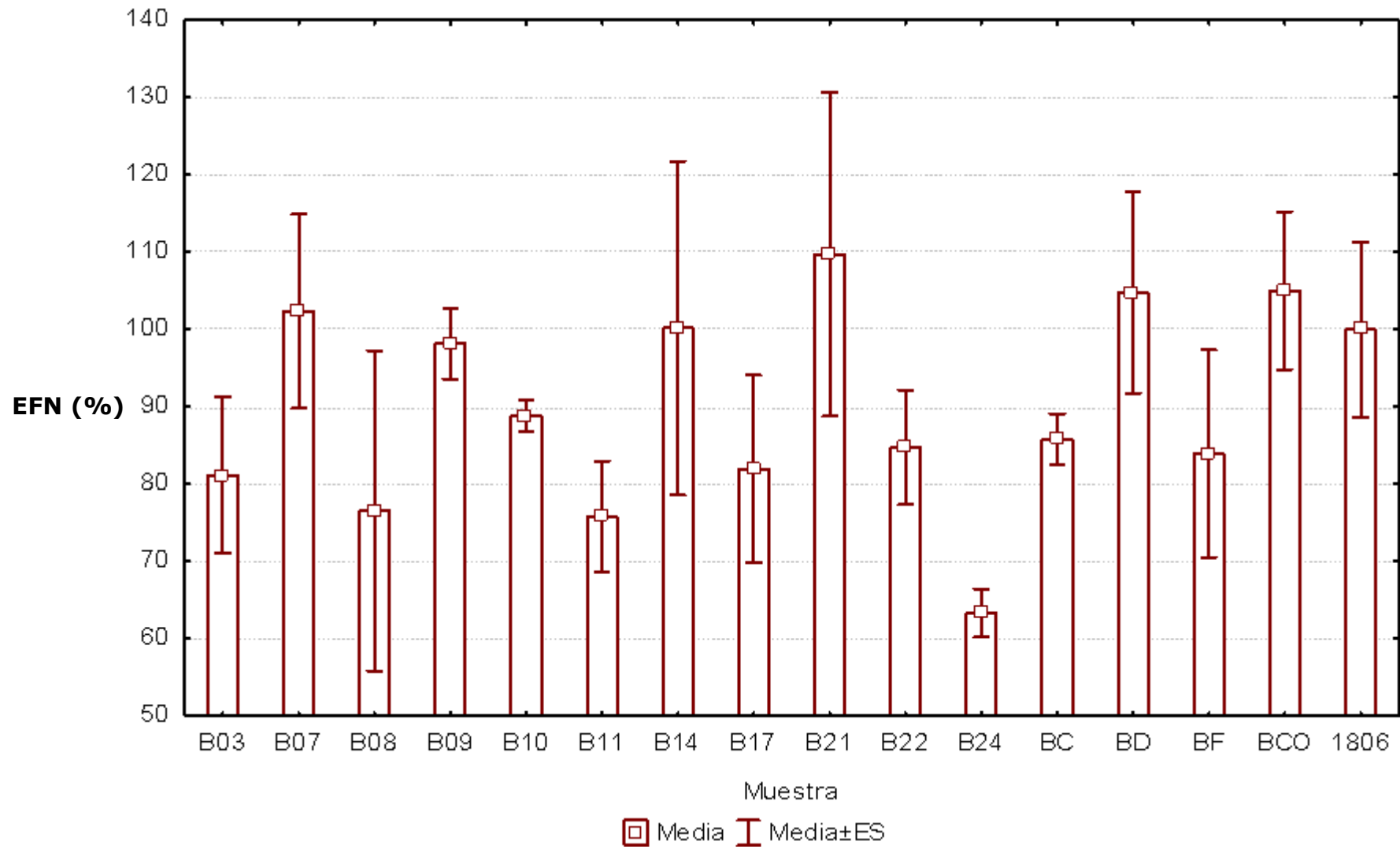


Figura 18. EFN obtenida para cada tratamiento.

Sicardi (1992) evaluó la eficiencia de fijación de nitrógeno mediante su estudio de 11 cepas de rizobios nativos de La Estación Experimental La Iguana inoculadas en plantas de *Vigna unguiculata*, usando como control la cepa I-700 de *Bradyrhizobium sp.* recomendada para ese hospedero por su alta eficiencia en fijación de nitrógeno. En dicho estudio se encontraron valores de N total para los distintos aislados considerablemente más bajos respecto al control, hallando diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. Madrid (2007) en su estudio de 8 aislados de *C. macrocarpum* provenientes de suelo de La Estación Experimental La Iguana, encontró que todos los aislados nodulantes presentaron valores por encima del 100%, siendo el más alto una eficiencia de 260%, con un contenido de nitrógeno 2,5 veces mayor que el control nitrogenado (100%). En el presente trabajo no se hallaron diferencias significativas entre los valores de EFN de los distintos tratamientos; pero en líneas generales se observa que los 2 aislados de nodulación positiva, B11 y B22, presentaron valores de EFN de 75,83 y 84,80% respectivamente, los cuales expresan una eficiencia inferior a la obtenida por el control positivo.

Distintos autores han observado un alto grado de variabilidad en la efectividad en pruebas realizadas con cepas aisladas de poblaciones nativas. Los autores sugieren que la proporción de los genotipos presentes en una población de rizobios pueden estar cambiando constantemente (Lowe y Holding, 1970; Sherwood y Masterson, 1974). En consecuencia, es posible que la población de rizobios presentes en una misma zona, como puede ser la Estación Experimental La Iguana, cambie en el transcurso de un período de tiempo y con ello la eficiencia de fijación de algunos de sus integrantes.

Mediante el empleo de metodologías isotópicas en la medición de N fijado, se han encontrado cepas rizobianas muy eficientes que logran obtener prácticamente la totalidad (87%) del N de la atmósfera después de un número de cosechas; lo que favorece que en el sistema de cultivo el nitrógeno provenga de la atmósfera y no del fertilizante. Sin embargo la eficiencia de fijación de N varía en el campo debido múltiples factores, entre los cuales se encuentra el alto contenido de N mineral en

algunos suelos que comúnmente inhibe la nodulación y la fijación de N_2 (Danso y col., 1990. citado en Barrientos y col., 1995). De igual forma hay reportes de una correlación negativa del pH del suelo y una correlación positiva del porcentaje de saturación de bases del suelo con la eficiencia de fijación de N (Herrera y col., 1996). En base a lo antes expuesto, es necesario el estudio de la eficiencia de fijación de N en campo para poder llegar a conclusiones acertadas, aún sobre cepas efectivas en condiciones controladas de laboratorio.

Por su parte, los 13 aislados que no indujeron nodulación constituyen un potencial a estudiar, ya que los mismos podrían pertenecer al grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) (Kloepper y col., 1986), el cual incluye a los rizobios. Las bacterias PGPR se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación indirecta incluye una variedad de mecanismos que inhiben la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, de enzimas, de sideróforos y solubilización de fosfatos (Santillana y col., 2005). En relación, Sullivan y col. (1995) presentaron evidencia indirecta de que rizobios no simbióticos juegan un papel significativo en la dinámica de las poblaciones de rizobios en los suelos. Y además, Sullivan y col. (1996) señalaron que las propiedades simbióticas de algunos rizobios son genéticamente inestables, surgiendo la posibilidad de que rizobios no simbióticos sean un componente significativo de las poblaciones rizobianas de los suelos.

Madrid (2007) encontró que 4 de sus aislados no indujeron nodulación, sin embargo, presentaron características resaltantes como la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio, hierro y aluminio, y de formar sideróforos. Esto indica que en los suelos de sabana del Estado Guarico existen grandes potencialidades en la microbiota, por lo que se recomienda realizar evaluaciones posteriores de los 15 aislados obtenidos en el presente trabajo.

Ibañez y col., (2009), realizaron el estudio de un conjunto de bacterias extraídas de nódulos de plantas de maní que son incapaces de inducir nodulación. El estudio comprendió la evaluación del efecto de dichas bacterias, tanto individualmente como en ensayos de co-inoculación combinada con el simbiote *Bradyrhizobium sp.*, sobre el crecimiento de plantas de maní. En sus resultados encontraron que las bacterias no nodulantes poseen la habilidad de promover crecimiento de las plantas, así como de incrementar significativamente el número de nódulos formados en plantas co-inoculadas. En este estudio se demostró que las bacterias no nodulantes extraídas de nódulos, no solo podrían ser organismos PGPR sino que además, podrían actuar de forma sinérgica con los simbioses rizobios aumentando la eficiencia simbiótica de los mismos.

En base a lo antes expuesto, es apreciable que los 15 aislados obtenidos en el presente trabajo constituyen un importante potencial de los suelos de sabanas venezolanas, que vale profundizar en estudios posteriores.

6. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 15 aislados bacterianos a partir de nódulos de plantas de *Calopogonium sp.*, los cuales presentan características generales descritas para bacterias del género *Rhizobium*.
2. La cuantificación mediante el método de NMP permitió obtener el número de rizobios por gramo de suelo capaces de formar una relación simbiótica con *Calopogonium sp.* presentes en los suelos de la Estación Experimental La Iguana, Estado Guárico, obteniendo un valor de 0,6 rizobios/g suelo, el cual se considera un número bajo.
3. La caracterización genética mediante el ensayo TP-RAPD de 14 de los 15 aislados obtenidos, permitió identificar 10 perfiles de bandas distintos, posiblemente representando igual número de variedades de especies a

corroborar por secuenciación del ARNr 16S. Este resultado confirma la eficiencia de la técnica TP-RAPD en estudios de diversidad bacteriana.

4. Los aislados B11 y B22, presentaron nodulación positiva en las plantas confirmando que dichos aislados pertenecen al género *Rhizobium*. Sin embargo, al presentar una EFN inferior al control se consideran aislados nodulantes inefectivos.
5. Los aislados no nodulantes B07, B14, B21 y BD presentaron una EFN superior al tratamiento control 1806, sugiriendo una potencial capacidad de ser bacterias promotoras del crecimiento vegetal, lo cual debe corroborarse con análisis posteriores.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BAI, Y., D'AOUST, F., SMITH, D., DRISCOLL, B. 2002. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can. J. Microbiol.* 48: 230-238.
- BARRIENTOS, L., HIGUERA, M., ACUÑA, H., GUERRERO, J., ORTEGA, F., SEGUEL, I. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. *Agricultura Técnica (Chile)*. Vol. 62 (2): 226-236.
- BARRIENTOS, L., PINO, I., MÉNDEZ, E. 1995. Efectividad y competitividad de cepas nativas de *Rhizobium* evaluadas en suelos de la IX región. *Agricultura Técnica (Chile)*. Vol. 55 (3-4): 226-232.
- BRADY, N., WEIL, R. 2004. *The Nature and Properties of Soil*. 12th.Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey.

- BRAVO, C., LOZANO, Z., HERNÁNDEZ, R., PIÑANGO, L., MORENO, B. 2004. Efecto de diferentes especies de coberturas sobre las propiedades físicas del suelo de sabana con siembra directa de maíz. *Bioagro*. 16(3): 163-172.
- BRUNET, E., LUIS, M., ALMAGUER, J., ESPINOZA, W., SUÁREZ, Y. 1999. Comportamiento de cepas de *Rhizobium phaseoli* asociada al cultivo del frijol. I. Peso seco, número, % N y crecimiento de los nódulos. *Centro Agrícola*, Año 26, No. 4. Cuba.
- CALLEJO, R., PRIETO, M., ROCCA, F., CIPOLLA, L., AGUERRE, L., MARTÍNEZ, C. 2010. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores. Curso teórico y práctico. Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas ANLIS – “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, Argentina.
- CASANOVA, E. 2005. Introducción a la ciencia del suelo. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), UCV, Segunda Edición, Caracas, Venezuela.
- CHEN, W., DE FARIA, S., STRALIOTTO, R. 2005. Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7461–7471.
- CHEN, W., LAEVENS, S., LEE, T., COENYE, T., DEVOS, P., MERGEAY, M., VANDAMME, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodule of Mimosa species and sputum of acysticfibrosispatient. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 51: 1729–1735.
- CONTRERAS, C., IRIARTE, J., MUÑOZ, A. 2007. Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. asociados a la leguminosa *Cajanus cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sampués, departamento de Sucre. Tesis de pregrado. Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia.

- CUADRADO, B., RUBIO, G., SANTOS, W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1): 78-104.
- DANSO, S., ALEXANDER, M. 1974. Survival of two Straits of *Rhizobium* in soil. Soil Science Society of American Proceedings. 38: 86-89.
- FERRERA, R., GONZALEZ, M., RODRÍGUEZ, M. 1993. Manual de agromicrobiología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- GHITTONI, N., BUENO, M. 1996. Changes in the cellular content of trehalose in four peanut rhizobia strains cultured under hypersalinity. Simbiosis, 20: 117.
- GONZÁLEZ, J., LLUNCH, C. 1992. Biología del nitrógeno. Editorial Rueda, Madrid, España. Tesis Doctoral. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.
- HERNÁNDEZ, R., LOZANO, Z., BRAVO, C., MORALES, J., TORO, M., RAMÍREZ, E., CASTRO, I., RIVERO, C., OJEDA, A. 2012. Manejo agroecológico de suelos de sabanas bien drenadas con unidades de producción cereal-ganado. Mimeografiado del XIX Congreso Latinoamericano de Ciencias del Suelo, Mar del Plata, Argentina.
- HERNÁNDEZ, R., LOZANO, Z., RIVERO, C., TORO, M., SALAZAR, J., TORRES, A., OJEDA, A., MORALES, J., REY, J. 2005. Primer informe de avance del proyecto "Manejo agroecológico de suelos de sabanas bien drenadas con unidades de producción cereal – ganado". 125 p.

- HERRERA, A., LONGERI, L., OVALLE, C. 1996. Estudio de la efectividad de cepas chilenas de *Rhizobium meliloti* en simbiosis con *Medicago polymorpha*. Agricultura Técnica (Chile). Vol. 56 (1): 36-42.
- IBÁÑEZ, F., ANGELINI, J., TAURIAN, T., TONELLI, M., FABRA, A. 2009. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 32: 49-55.
- KLOEPPER J., ZABLOTOWICZ R., TIPPING E., LIFSHITZ R. 1986. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: Swinburne TR ed. Iron, Siderophores and Plant Diseases. New York: Plenum Press, 155-164.
- LEDGARD, S., STEELE, K. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. Plant and Soil, 141: 137-153.
- LANCHEROS, R., CAICEDO, L., NAVARRO, Y. 2001. Efecto de los nutrientes y condiciones ambientales sobre la producción de polisacáridos por la bacteria *Rhizobium leguminosarum* Cepa B. Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.
- LÓPEZ, R., GONZÁLEZ, L., GARCÍA, D. 1998. Tolerancia a diferentes tenores de NaCl en cepas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Bayamo, Granma, Cuba.
- LOWE, j., HOLDING, A. 1970. Influence of clover source and nutrient manganese concentrations on the *Rhizobium*/White clover association. British Grassland Society. Occasional Symposium N° 6. In J. Lowe (ed.) White Clover Research. p. 70-89.
- LU, J., PERNG, C., LEE, S., WAN, C. 2000. Use of PCR with universal primer and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common

- bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (6): 2076-2080.
- MADIGAN. M., MARTINKO, J., PARKER, J. 2003. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición.
- MADRID, F. 2007. Eficiencia simbiótica y características fisiológicas y bioquímicas de rizobios asociados a *centrosema macrocarpum* en sabanas del Edo. Guárico, Venezuela. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- MARQUINA, M., GONZÁLEZ, N., CASTRO, Y. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 59 (3): 1017-1036.
- MPEPEREKI, S., MAKONESE, F., WOLLUM, A. 1997. Physiological characterization of indigenous *rhizobia* nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*, 22, 275.
- MOULIN, L., MUNIVE, A., DREYFUS, B., BOIVIN-MASSON, C. 2001. Nodulation of legumes by members of b-class of *Proteobacteria*. *Nature* 411: 948–950.
- NOBBE, F., SCHMID, E., HILTNER, L., HOTTER, E. 1981. Versuche über die Stickstoff – Assimilation der Leguminosen. *Landwirtsch. Versuchstat. Dresden*. 39: 327–359.
- NORRIS, D. 1959. The role of calcium and magnesium in the nitrition of *Rhizobium*. *Aust. J. Agric. Res.* 10: 651-698.
- PÉREZ, G. 1990. Fijación simbiótica de Nitrógeno: estado actual y perspectiva. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* Vol. 17 (66): 477-487.

- PUERTAS, F., ARÉVALO, E., ZÚÑIGA, L., ALEGRE, J., LOLI, O., SOPLIN, H., BALIGAR, V. 2008. Establecimiento de cultivos de cobertura y extracción total de nutrientes en un suelo de trópico húmedo en la amazonía peruana. *Ecología Aplicada*, 7(1,2). Lima, Perú.
- RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., VALVERDE, A., MATEOS, P., MARTÍNEZ, E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*. 22: 1086-1089.
- RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., PALOMO, J., MATEOS, P., GARCÍA, P., MARTÍNEZ, E. 2002. Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Europa Journal of Plant Pathology*. 108: 179-184.
- RIVILLA, R., BOLAÑOS, L., MARTÍN, M. 2006. Laboratorio avanzado de fisiología. Fijación simbiótica de nitrógeno y estrés salino. Universidad Autónoma de Madrid.
- SÁNCHEZ, J. 2007. Fertilidad del suelo y nutrición mineral de plantas. Conceptos básicos. Parte I: Fertilidad del suelo.
- SANTILLANA, N., ARELLANO, C., ZÚÑIGA, D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*. Vol. 4 (Nº 1 y 2): 47-51.
- SHERWOOD, M., MASTERSON, C. 1974. Importance of using the correct test host in assessing the effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium Trifolii*. *Ireland Journal of Agricultural Research*. 13: 101-110.

- SICARDI, M. 1992. Aspectos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la fijación simbiótica de nitrógeno en distintas especies de leguminosas nativas y comerciales. Tesis Doctoral. Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), Caracas, Venezuela.
- SICARDI, M., IZAGUIRRE, M. 1994. Seasonal dynamic, host range and symbiotic efficiency of native rhizobial populations in three soil horizons of four contrasting savanna sites. *Symbiosis*. 17:43-63.
- SULLIVAN, J., EARDLY, B., VAN BERKUM, P., RONSON, C. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic *rhizobia* isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2818-2825.
- SULLIVAN, J., PATRICK, W., LOWTHER, W., SCOTT, D., RONSON, C. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:8985-8989.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 2006. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 764 pages.
- TORO, M. 2007. Biofertilizantes microbianos en Venezuela: investigaciones recientes. pp: 79-81. En: IZAGUIRRE, M., LABANDERA, C., SANJUAN, J (eds), *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Primera Edición. Montevideo, Uruguay.
- UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. FACULTAD DE FARMACIA. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II. Guía de Prácticas de Microbiología. Complementos de Formación. Ciencia y tecnología de los Alimentos. 1999
- URZÚA, M., TORRES, M. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la Zona Sur de Chile. II. Respuesta del trébol blanco y rosado a la inoculación

- con cepas efectivas de *R. trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Ciencias e Investigación Agraria*. 12: 15-21.
- VALVERDE, A. 2003. Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca, España.
- VALVERDE, A., VELAZQUEZ, E., GUTIERREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A., IGUAL, J. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Micro-biol.* 53: 1979–1983.
- VINCENT, J. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press Sidney. Australian. 288 p.
- VINCENT, J. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. *Black Scientific Publications Oxford and Edinburgh*. IBP Handbook No. 15.
- VINCENT, J. 1962. Australian studies of the root-nodule bacteria. *Proceeding of the Linnean Society N.S.W.* 87: 8-38.
- WIDIASTUTI, H. 2007. Growth response of *Calopogonium caeruleum* and *Centrosema pubescens* ground cover crops toward inoculation of *Bradyrhizobium*, *Aeromonas punctata*, and *Acaulospora tuberculata*. *Buletin Plasma Nutfah* Vol.13 No.1.
- WILSON, J. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell University Agricultural Experiment Station memoir 221. Cornell University Press. Ithaca. N. Y.
- YELTON, M., YANG, S., EDIE, S., LIM, S. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1537.

YOUNG, J., W, P. 1996. Phylogeny and taxonomy of *rhizobia*. Plant Soil. 186: 45-52.

ZÚÑIGA, D. 2008. Manual de microbiología agrícola. Rhizobium, PGPR, indicadores de fertilidad e inocuidad. Universidad Nacional Agrícola La Molina, Lima, Perú.

CONSULTAS EN LÍNEA

AVENDAÑO, N. Fabaceae de Venezuela. Herbario Nacional de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. sites.google.com/site/fabaceaedevenezuela/home.

EN TAO, W., MARTÍNEZ, J., LÓPEZ, I. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. [En línea]. [Consulta: 10 de abril de 2010]. Disponible en: www.biblioweb.unam.mx.

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Taxonomía de *Calopogonium* sp. www.icn.unal.edu.co.

APÉNDICE A

Tabla 3. Composición del medio nutritivo sólido Norris y Date (1976)

Solución	Reactivos	(g/L)	Solución Stock (mL/L)
A	KCl	29,8	2,5
B	K ₂ HPO ₄	69,6	2,5
C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	98,6	2,5
D			0,5
	Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0,078	
	Zn SO ₄ · 7H ₂ O	0,220	
	Mn SO ₄ · 4H ₂ O	2,030	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,010	
	H ₃ BO ₃	1,430	
E	Citrato férrico	1,795	1,0
---	Ca SO ₄ · 2H ₂ O	0,344	---
---	Agar	8,0	---

Tabla 4. Composición del medio Levadura Manitol Agar (LMA-RC)

Compuesto	g/L
Manitol	1,0g
Extracto de levadura	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,2 g
Rojo Congo (0,25%)	10,0 mL
Agar	15,0 g
pH	6,8

Tabla 5. Composición del medio Levadura Manitol Agar (LMA-ABT)

Compuesto	g/L
Manitol	1,0g
Extracto de levadura	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,2 g
Azul de Bromotimol (0,5% en etanol al 70%)	5,0 mL
Agar	15,0 g
pH	6,8

Tabla 6. Composición del medio Levadura Lactosa (LLA)

Compuesto	g/L
Lactosa	10,0g
Extracto de levadura	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,2 g
Agar	15,0 g
Lactosa	10,0g
pH	6,8

Tabla 7. Composición del medio Agar Luria Bertani (LB)

Compuesto	g/L
Triptona	10,0g
Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
pH	6,8 – 7,0

Tabla 8. Composición del medio Triptona Levadura Agar (TLA)

Compuesto	g/L
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂	0,4 g
Agar	15,0 g
pH	6,8 – 7,0

Tabla 9. Composición del medio Agar Hierro de Kligler KIA

Compuesto	g/L
Péptidos de tejido animal digerido	15,0g
Extracto de Carne	3,00
Proteose peptone	5,00
Lactosa	10,00
Dextrosa	1,00
Sulfato ferroso	0,20
Cloruro de Sodio	5,00
Thiosulfato de Sodio	0,30
Rojo Fenol	0,024
Agar	15,00
pH	6,80

APÉNDICE B

Tabla 10. Condiciones de la reacción de PCR ARNr 16S

Reactivos	Concentraciones finales
H ₂ O	---
Tampón	1 X
Oligonucleótido U1	0,8 µM
Oligonucleótido U2	0,8 µM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Tag. Polimerasa	1,25 U/reacción
Templado	---
Volumen final de reacción	20,0 µL

Tabla 11. Parámetros de ciclaje del PCR ARNr 16S

Etapas	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	45
Hibridación	60	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	10 min	1

Tabla 12. Composición de la mezcla de PCR-TPRAPD

Reactivos	Concentraciones finales
H ₂ O	---
Tampón	1 X
Oligo 1	2 µM
Oligo2	2 µM
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	200 µM
Tag. Polimerasa	2 U/reacción
Templado	---
Volumen final de reacción	25,0 µL

Tabla 13. Parámetros de ciclaje del ensayo PCR-TPRAPD

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	9	1
Desnaturalización	95	1	35
Hibridación	50	1	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	1

Tabla 14. Composición de la solución nutritiva sin N (Norris y Date, 1976)

Solución	Reactivos	(g/L)	Solución Stock (mL/L)
A	KCl	29,8	2,5
B	K ₂ HPO ₄	69,6	2,5
C	MgSO ₄ · 7H ₂ O	98,6	2,5
D			0,5
	Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0,078	
	Zn SO ₄ · 7H ₂ O	0,220	
	Mn SO ₄ · 4H ₂ O	2,030	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,010	
	H ₃ BO ₃	1,430	
E	Citrato férrico	1,795	1,0
---	Ca SO ₄ · 2H ₂ O	0,344	---

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento ante todo a HaShem, mi Creador, por concederme el regalo y bendición de realizar y culminar con éxito mis estudios profesionales de pregrado.

A mi hermosa madre y amiga Edelmira Arzolay por su incondicional apoyo durante toda mi vida, siendo un pilar fundamental que me permitió llegar a la realización de mis estudios profesionales. Gracias mami, te amo.

A mis tutoras Marcia Toro y Palmira Guevara por su guía, instrucción y apoyo incondicional, lleno de aprecio, comprensión, gran cariño, solidaridad, bondad, respeto y colaboración. Mil Gracias mis grandes Maestras, mi amor y respeto para ustedes.

A mi gran familia; Abraham Guerrero y Freddy Guerrero, por ser mi apoyo permanente y fiel en el transcurso de todo este hermoso camino profesional. Denys Arzolay, Marielena Vergara, Betsy Arzolay, Carol Masías, Evayeska Piñate, Yesenia Arzolay, Irma Arzolay, Felipe y Nora Arzolay. Gracias por su apoyo y amor.

A mis grandes amigos Mariana Vásquez, Jesús Torres, Carolina Pérez, Oscar Párraga, Eliana Blanco, Eliecer Centeno, Yarcelys Rodríguez, Ismael Godoy, Adolfo Nouel, Michelle Alcalá, María de los Ángeles Montilla. A mis amigas Mariandreína, Anayancy y Roxana. Gracias por su amistad, experiencias y aprendizajes vividos. Mi gran cariño para ustedes.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular; Nohelí, Ángela, Andrea, Alejandro, Enrique, Ricardo, Alicia, Pedro, la señora Mery y Adriana, por su ayuda, solidaridad y compañerismo. Gracias por los grandes aprendizajes y por el maravilloso trabajo e equipo.

A la Universidad Central de Venezuela por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en sus aulas, por la calidad humana que me ha brindado una educación completa y de gran calidad, y por proporcionar todos los recursos materiales para hacer posibles mis estudios.

A Indira Pérez, Beatríz y a la Profesora Juana Vitelli por su instrucción, enseñanzas, guía y apoyo sobre el manejo de muestras microbiológicas. Gracias por su paciencia, comprensión y colaboración de buena voluntad.

A mis compañeras e instructoras, Jesmari y Edith por su instrucción en la implementación de diversas técnicas de laboratorio.

A los profesores Rubén Torres, Hermes Piñango, Fernando y Cristian, por su amplia colaboración en el suministro de agua destilada, y el préstamo de equipos para la realización de los experimentos de mi trabajo especial de grado.

Al Licenciado Fidel Corrales Ferro por su gran colaboración e instrucción sobre el uso del programa Guefast Scan y en la elaboración de las imágenes digitales de los resultados obtenidos en el área de genética molecular.

A mis amigos del centro de copiado de la facultad de Ciencias; Luis, Gabriel, José y Gabriel, por su apoyo constante en la reproducción y copiado de material de estudio, por su buena voluntad y bondad para conmigo de forma permanente.

A mi estimada amiga, la Señora Ana, quien con gran calidez me apoyó con sus ricas comidas y un tibio cafecito lleno de cariño, alegría y bondad. Gracias también a la Señora Marta por sus ricas comidas, buen ánimo y solidaridad alegre. Ambas me reconfortaron con su servicio.

Al Profesor Blas Dorta y la Profesora Roxi por su fraterna colaboración y apertura.

Al profesor Ismael Hernández por su apoyo constante y amplia disposición a la enseñanza, guía y compartir del material de laboratorio. A la profesora Laurin por su cariño, apoyo, guía y enseñanzas a lo largo de toda mi carrera.

Agradecimiento a los profesores Eliecer Cabrales y Carlos Bravo por su apoyo y ayuda en los trabajos de campo realizados para la elaboración de este trabajo.

A todos mis profesores porque cada uno formó una parte de mi aprendizaje y dejó una huella en mí, siendo todos de gran responsabilidad y fuerte compromiso con la enseñanza. Gracias a todos.

A mi Maestra espiritual y gran amiga Evelys Olivares, por su guía, formación, apoyo y gran amor a lo largo de mi carrera. A mis compañeras Joyce Linares y Eva Agüero por su incondicional apoyo, solidaridad, compañerismo y cariño brindado a mi persona de forma permanente.

A la Universidad Simón Rodríguez, a la Estación Experimental la Iguana, y a todo su personal por brindarnos con gran calidad humana y excelente atención, los espacios para la recolección de muestras y la estadía en el campo necesaria para la elaboración del presente trabajo.

A los proyectos: FONACIT G-2007001442 y CDCH PG-03-7884-2009 por proporcionar el financiamiento de las investigaciones realizadas en el presente trabajo.

A todos quienes han contribuido a mi bienestar, a todos quienes me han apoyado, a mi país, a mi planeta, y a toda la creación, Gracias*.

- :

*Baruj ata Adon-ay Elo-henu Melej haolam, shehejeianu vekiyamanu vehiguanu lagemán hazé.
Bendito eres Tú, KaShem nuestro D-s, Rey del universo, que nos ha dado vida y nos has hecho
existir y nos has conducido hasta esta fecha*

*Dedicado con gran amor a mi madre Edelmira Arzola,
Freddy Guerrero y Abraham Guerrero*

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa	8
1.1.1 Invasión de la raíz por parte de <i>Rhizobium</i>	9
1.1.2 Especificidad de hospedador	10
1.1.3 Fijación biológica de nitrógeno	10
1.2 La familia <i>Fabaceae</i>	11
1.2.1 <i>Calopogonium sp.</i>	12
1.3 Los <i>Rhizobia</i>	12
1.3.1 El género <i>Rhizobium</i>	13
1.4 Técnicas usadas en la caracterización de rizobios	14
1.5 Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa para el suelo	16
2. ANTECEDENTES	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	20
3.2 OBJETIVO GENERAL	20
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Área de estudio	21
4.2 Muestreo en campo	26
4.2.1 Recolección de plantas con raíces noduladas	26
4.2.2 Recolección de muestras de suelo	26
4.3 Cuantificación de las poblaciones nativas de rizobios por Número Más Probable (NMP) (Cochran, 1950)	26
4.4 Obtención de aislados bacterianos a partir de nódulos radicales de <i>Calopogonium sp.</i>	27
4.4.1 Tratamiento de los nódulos	27
4.4.2 Aislamiento bacteriano a partir de los nódulos	28

4.5 Caracterización microbiológica de los cultivos bacterianos aislados	28
4.5.1 Tinción Gram	28
4.5.2 Reacción en el medio Levadura Manitol Agar con Azul de BromoTimol (LMA-ABT)	29
4.5.3 Crecimiento en el medio Levadura Lactosa Agar (LLA)	29
4.5.4 Crecimiento en el medio agar Luria Bertani (LB)	29
4.5.5 Crecimiento en el medio Triptona Levadura Agar (TLA)	30
4.5.6 Prueba de la oxidasa	30
4.5.7 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kliger (KIA)	31
4.5.8 Preservación de los aislados bacterianos	31
4.6 Caracterización molecular	31
4.6.1 Aislamiento de ADNg de cultivos bacterianos	31
4.6.2 Ensayo de PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S (Lu y col., 2000)	32
4.6.3 Ensayo de TP-RAPD (Rivas y col., 2001)	33
4.7 Evaluación del efecto de los 15 aislados obtenidos sobre la biomasa seca, contenido de N total y eficiencia de fijación de N de <i>Calopogonium</i> sp.	37
4.7.1 Pruebas de nodulación de los aislados bacterianos en <i>Calopogonium</i> sp.	37
4.7.2 Cuantificación de la biomasa seca del vástago de las plantas de <i>Calopogonium</i> sp.	38
4.7.3 Cuantificación del N total del vástago de las plantas de <i>Calopogonium</i> sp.	38
4.7.4 Estimación de la eficiencia de fijación de N en las plantas de <i>Calopogonium</i> sp. inoculadas.	39
4.7.5 Análisis estadístico	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40

5.1 Cuantificación de las poblaciones nativas de rizobios por Número Más Probable (NMP) (Cochran, 1950)	40
5.2 Obtención de aislados bacterianos a partir de nódulos radicales de <i>Calopogonium sp.</i>	43
5.3 Caracterización microbiológica de los cultivos bacterianos aislados	47
5.3.1 Tinción Gram	47
5.3.2 Crecimiento en el Medio LMA-RC	49
5.3.3 Reacción en el medio Levadura Manitol Agar con Azul de BromoTimol (LMA-ABT)	50
5.3.4 Crecimiento en el medio Levadura Lactosa Agar (LLA)	51
5.3.5 Crecimiento en el medio agar Luria Bertani (LB)	51
5.3.6 Crecimiento en el medio Triptona Levadura Agar (TLA)	51
5.3.7 Prueba de la oxidasa	53
5.3.8 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kliger (KIA)	53
5.4 Caracterización molecular	55
5.4.1 Aislamiento de ADNg de cultivos bacterianos	55
5.4.2 Ensayo de PCR de la subunidad ribosomal pequeña, ARNr 16S (Lu y col., 2000)	57
5.4.3 Ensayo de TP-RAPD (Rivas y col., 2001)	59
5.5 Evaluación del efecto de los 15 aislados obtenidos sobre la biomasa seca, contenido de N total y eficiencia de fijación de N de <i>Calopogonium sp.</i>	64
5.5.1 Pruebas de nodulación de los aislados bacterianos en <i>Calopogonium sp.</i>	66
5.5.2 Cuantificación de la biomasa seca del vástago de las plantas de <i>Calopogonium sp.</i> inoculadas.	72
5.5.3 Cuantificación del N total del vástago de las plantas de <i>Calopogonium sp.</i> inoculadas.	76

5.5.4 Estimación de la eficiencia de fijación de N en las plantas de <i>Calopogonium</i> sp. inoculadas.	80
6. CONCLUSIONES	84
7. BIBLIOGRAFÍA	85
APÉNDICE A	94
APÉNDICE B	95
AGRADECIMIENTOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. El nódulo.	10
Figura 2. <i>Calopogonium</i> sp.	12
Figura 3. Clasificación de la Familia <i>Rhizobeaceae</i> .	13
Figura 4. Esquema general metodológico de los pasos realizados en el trabajo experimental del proyecto.	21
Figura 5. Área de estudio.	22
Figura 6. Climadiagrama de la zona del centro de Guárico.	24
Figura 7. Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR del 16S en el ARNr 16S de <i>E.coli</i> .	34
Figura 9. Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR TP-RAPD en el ARNr 16S de <i>E.coli</i> .	36
Figura 10. Raíces noduladas en el ensayo de NMP.	42
Figura 11. Evaluación de la Integridad y Concentración inicial del ADN de las muestras.	56
Figura 12. Amplificación del ARNr 16S.	58
Figura 13. Amplificación por TP-RAPD.	60
Figura 14. Árbol de correlación de similitud entre los perfiles obtenidos.	63
Figura 15. Nódulos obtenidos en los ensayos de inoculación de los	69

aislados bacterianos en plantas de *Calopogonium sp.*

Figura 16. Biomasa seca obtenida en cada tratamiento.	73
Figura 17. N total obtenido para cada tratamiento.	77
Figura 18. EFN obtenida para cada tratamiento.	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características ambientales de la Estación Experimental La Iguana.	23
Tabla 2. Parámetros físico-químicos del suelo de las parcelas de la Estación Experimental La Iguana.	25
Tabla 3. Composición del medio nutritivo sólido Norris y Date (1976).	94
Tabla 4. Composición del medio Levadura Manitol Agar (LMA-RC).	94
Tabla 5. Composición del medio Levadura Manitol Agar (LMA-ABT).	94
Tabla 6. Composición del medio Levadura Lactosa (LLA).	95
Tabla 7. Composición del medio Agar Luria Bertani (LB.)	95
Tabla 8. Composición del medio Triptona Levadura Agar (TLA).	95
Tabla 9. Composición del medio Agar Hierro de Kligler KIA.	95
Tabla 10. Condiciones de la reacción de PCR ARNr 16S.	96
Tabla 11. Parámetros de ciclaje del PCR ARNr 16S.	96
Tabla 12. Composición de la mezcla de PCR-TPRAPD.	96
Tabla 13. Parámetros de ciclaje del ensayo PCR-TPRAPD.	97
Tabla 14. Composición de la solución nutritiva sin N (Norris y Date, 1976).	97
Tabla 15. Nódulos obtenidos en el ensayo de NMP pH 6,8.	41
Tabla 16. Nódulos obtenidos en el ensayo de NMP pH 4,5.	41
Tabla 17. Aislados bacterianos obtenidos a partir de nódulos de <i>Calopogonium sp.</i>	46
Tabla 18. Características microbiológicas de los aislados.	48
Tabla 19. Propiedades medidas en el vástago de las plantas de <i>Calopogonium sp.</i> inoculadas en los ensayos de vivero.	67

