

ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE LA FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO Y ADAPTABILIDAD DEL MANÍ FORRAJERO, (*Arachis pintoi*), COMO COBERTURA EN PALMA ACEITERA, (*Elaeis guineensis* Jacq.), BAJO DOS CONDICIONES DE SIEMBRA EN ANCUPA (CIPAL). LA CONCORDIA, 2009

Byron Casanova¹; Gustavo Bernal²; Rocío Morales³; Luis Gusqui⁴

1. Estudiante UTE, Becario ANCUPA. Correo electrónico:byron_javi24@hotmail.com

2. ExDirector de Investigación ANCUPA

3. Responsable de Laboratorio ANCUPA

4. Profesor UTE Sto. Domingo

OBJETIVOS

Aislar y evaluar cepas de *Rhizobium*, estableciendo su efectividad en la fijación biológica de nitrógeno en maní forrajero, al usarlo como cultivo de cobertura en palma aceitera, aportando al mejoramiento de las condiciones de fertilidad del suelo y sus características físico-químicas, y mejorando la adaptabilidad de la leguminosa es estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se dividió en tres fases:

1. Fase de Laboratorio
2. Fase de Invernadero
3. Fase de Campo

1. FASE DE LABORATORIO: Aislamiento y Caracterización Fenotípica de las cepas de *Rhizobium*.

Factores de estudio

Cepas de *Rhizobium* para maní forrajero comercial y aisladas de diferentes zonas tropicales de Ecuador.

Variables y Métodos de Evaluación:

Las variables evaluadas fueron: Tiempo de Crecimiento, Morfología de Colonias, Resistencia a Acidificación o Alcalinización del Medio LMA, Resistencia a fuentes de carbono y nitrógeno, Resistencia a antibióticos, Tolerancia a metales pesados, Tolerancia a pH del medio, Tolerancia al Nitrógeno.

Manejo Específico del experimento:

La recolección de muestras de raíces se realizó en diferentes zonas de suelos tropicales del Ecuador donde el maní forrajero tiene prevalencia. Para la toma de muestras en el campo se seleccionaron plantas con las mejores características (robustas, verdes y sanas), se limpió un área de 15 cm. alrededor de la planta, excavando con una palilla hasta exponer sus raíces. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio (CIPAL), donde fueron extraídos los nódulos de la raíz y colocadas en tubos de ensayo para su respectivo proceso.

Cuadro 1. Distribución de toma de muestras por bloques de *Arachis pintoi*. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Bloques	Superficie de siembra de palma (ha)	Muestras *
San Lorenzo	15187.31	5
Tsáchila - Quinindé	119414.61	20
Los Ríos	54416.50	15
Oriental	18266.89	5
TOTAL		45

*Compuesta de cuatro submuestras.

Para el aislamiento de los *Rhizobium* a partir de los nódulos, estos fueron esterilizados superficialmente según el siguiente protocolo CIAT (1988).

- Tratamiento de los nódulos con etanol 95% durante 3 minutos.
- Sumergir los nódulos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 3 minutos.
- Realizar cinco lavados con agua destilada estéril a los nódulos.
- Posteriormente, cada uno de los nódulos fueron resuspendidos en 200 μ l de agua destilada estéril para luego ser macerado individualmente.
- Una alícuota de 25 μ l del macerado se sembró en placas Petri conteniendo levadura, manitol agar (L.M.A) (VINCENT 1975). Las placas fueron incubadas a 26 °C hasta la obtención de colonias.

Las pruebas de autenticación se hicieron en: medio LMA+Rojo Congo, y en GPA,

La conservación de las cepas bacterianas se realizó en tubos con agar inclinado y en tubos liofilizados. En el primer caso, las cepas fueron sembradas en el medio LMA contenido en tubos de vidrio con tapa rosca. Estos aislamientos se incubaron durante 9 días a 26 °C y luego se almacenaron a 4° C.

Para la liofilización se siguió el siguiente protocolo: Se preparó una solución de peptona al 20% y otra de sucrosa al 10%. Estas soluciones se esterilizaron por separado durante 15 minutos a 121° C. Se mezclaron y la mezcla se dispersó en cajas Petri con colonias, frotando la superficie del medio con un asa de platino, hasta formar una suspensión bacteriana homogénea. Se colocaron alícuotas de 200 μ l de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf (1.5 ml de capacidad) previamente esterilizados y sellados con algodón estéril. Se utilizó un liofilizador donde los tubos permanecieron 24 horas a -54 °C, luego de lo cual, fueron cerrados y almacenados en refrigeración (4° C).

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

La fase de invernadero se realizó en las Instalaciones del Centro de Investigación de Palma Aceitera, CIPAL, en el cantón La Concordia, provincia de Esmeraldas

Factor en estudio: cepas más eficientes o con mayor potencial, seleccionadas en la fase anterior (Fase Laboratorio). Los tratamientos evaluados fueron 10 cepas nativas, una comercial y dos testigos: absoluto y químico. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo conformada por una maceta (jarra magenta), en sustrato autoclavado (turba y pomina, 3:1), donde se colocó un estolón de maní forrajero desinfectado debidamente, inoculada con las cepas de *Rhizobium*, en una cantidad de 10ml conteniendo 10⁸ cel/ml.

Variabes: Peso fresco de la parte aérea, Peso seco de la parte aérea, Número de nódulos, Peso de nódulos frescos, Peso de nódulos secos, Porcentaje de nitrógeno en la parte aérea, Extracción de Nitrógeno Total.

3. FASE DE CAMPO: Evaluación de la Eficiencia Simbiótica de las cepas de *Rhizobium*.

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones de la Palma Aceitera (CIPAL), de propiedad de ANCUPA, ubicado en el Cantón La Concordia, km. 37.5 vía Quinindé, perteneciente a la Provincia de Esmeraldas, situada geográficamente entre las coordenadas 79° 22' longitud Oeste 00° 06' latitud Norte.

Factores en Estudio:

Por cada uno de los cultivos de cobertura se evaluó las Cepas de *Rhizobium*: Cepas (A).

Cuadro 3. Descripción de las cepas seleccionadas correspondientes a la fase de campo. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Cepas Seleccionadas	Descripción
A ₁	Cepa 5
A ₂	Cepa 14
A ₃	Cepa comercial 6011
A ₄	Fertilizante nitrogenado
A ₅	Testigo absoluto

Cuadro 4. Descripción de las condiciones de riego (B). La Concordia, Esmeraldas. 2009

Condiciones de Riego	Descripción
B ₁	Con Riego
B ₂	Sin Riego

Tratamientos: fueron evaluadas cada una de las combinaciones de los dos factores mencionados (Cepas y Riego).

Se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), con un arreglo factorial 5x2, con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por una parcela de 1.5 m x 1.5 m, con seis (6) hileras de siembra, a 30 cm. de distancia entre ellas. Los estolones fueron colocados en hoyos cada 15 cm.

Variabes: Peso fresco de la parte aérea, Peso seco de la parte aérea, Peso de nódulos, Porcentaje de Nitrógeno total, Extracción de Nitrógeno Total, Porcentaje de cobertura.

Manejo específico del Experimento

Se preparó el suelo mediante la limpieza y remoción superficial del suelo; para luego trazar los surcos a 0,30 m., de distancia. Se efectuó el trazado de los bloques, cada uno con 10 parcelas que fueron las unidades experimentales.

Antes de la siembra se procedió a fertilizar todas las parcelas con Fósforo, Potasio y micro nutrientes, de acuerdo al análisis del suelo realizado en los laboratorios de INIAP-EESC, y a los requerimientos del cultivo. Se aplicó urea (46% N, 40 kg/ha) únicamente en las unidades experimentales del tratamiento nitrogenado.

Los estolones fueron inoculados al momento de la siembra, incorporando las cepas contenidas en turba. La dosis fue de 10 g. de inoculante por kilogramo de estolones, fijándolo con una solución de azúcar al 25%. Para esto, se siguió la metodología sugerida por Bernal, Graham (2001).

La siembra de los estolones se efectuó en forma manual con el sistema de golpes cada 30 cm. de distancia entre plantas. En cada sitio se depositó un estolón. Antes de la siembra, se realizó un riego para garantizar un mejor establecimiento de la bacteria.

La cosecha se realizó manualmente a los 90 días de edad del cultivo. Las plantas elegidas fueron cortadas en la base del tallo y colocadas en fundas de papel, debidamente identificadas, de acuerdo al tratamiento.

RESULTADOS

FASE DE LABORATORIO

Banco Germoplásmico: Localidades De Recolección

Las muestras de *Arachis pintoii* para el aislamiento de cepas nativas, fueron 45 originarios de las cuatros zonas productoras de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis Jacq*), 20 provenientes de la zona de Santo Domingo - Quinindé, 5 de la zona de San Lorenzo, 5 de la zona del Oriente y 15 de la zona de Quevedo. Adicionalmente se utilizó como testigo, una cepa comercial de *Arachis pintoii*, procedente de Estados Unidos con su codificación 6011.

Caracterización Fenotípica

Crecimiento de la Bacteria

Diez cepas (C5, C12, C13, C14, C16, C18, C19, C20, C23, C25) (Cuadro 10), presentaron un crecimiento lento en medio LMA, con un tiempo de crecimiento de colonias de 7 días, el restante de cepas no presentaron crecimiento en el medio de cultivo, las cepas que presentaron crecimiento fueron provenientes de la zona de Quinindé (C5, C12, C13, C14, C16, C18, C19, C20), y las dos restantes de la zona de Quevedo (C23, C25).

Morfología de las Colonias

Las cepas formaron colonias circulares de apariencia gelatinosa blanco opaco.

Variación del pH del medio LMA + Azul de Bromotimol

La variación del pH del medio LMA + Azul de Bromotimol demostró acidificación del medio de cultivo, cambiándolo a una coloración amarillenta.

Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno

Con relación a las fuentes de Carbono (Glucosa, Fructosa y Sacarosa), todas las cepas de la zona de Quinindé y Quevedo fueron capaces de metabolizar los disacáridos y lograr crecimiento de las bacterias.

Las fuentes de Nitrógeno (glycina, tirosina) indicaron que las cepas de Quinindé y Quevedo lograron crecimiento, mientras que con la fuente de tirosina solo obtuvieron crecimiento las cepas (C14, C16, C18), provenientes de la zona de Quinindé.

Cuadro 6. Localidades de las Zonas de Santo Domingo, Quinindé, San Lorenzo, Oriente y Quevedo, donde se recolectaron los aislamientos nativos de “rizobios” asociados a Maní forrajero (*Arachis pintoi*). La Concordia, Esmeraldas. 2009

Nº	Código	PROPIEDAD	Nº	Código	PROPIEDAD	Nº	Código	PROPIEDAD
BLOQUE SANTO DOMINGO – QUININDÉ			BLOQUE DE QUEVEDO			BLOQUE ORIENTAL		
1	C1	Incopalmito	1	C21	Etesa	1	C36	Parque Peñacota Shushufindi
2	C2	Hcda. Aro	2	C22	IASA (Km. 35)	2	C37	Parque Peñacota Shushufindi
3	C3	Hcda. Crisden	3	C23	San Antonio	3	C38	Parque Peñacota Shushufindi
4	C4	Hcda. Enoe	4	C24	El Edén	4	C39	Parque Peñacota Shushufindi
5	C5	Hcda. El Rodeo	5	C25	U.T.Q Granja	5	C40	Parque Peñacota Shushufindi
6	C6	La Antena (Km. 50)	6	C26	Agroparaiso	BLOQUE SAN LORENZO		
7	C7	P.D.A (Km. 200)	7	C27	Delia María	1	C41	ALES
8	C8	Hcda: Josefina	8	C28	Buena Fé	2	C42	ALES
9	C9	SOPALIN	9	C29	Valencia	3	C43	ALES (Ricaute)
10	C10	Hcda. El Carmen	10	C30	Zoila Luz	4	C44	Palesema
11	C11	Repsol Quinindé	11	C31	INIAP (E.E.T.P)	5	C45	Energy palma
12	C12	La Marujita	12	C32	Hcda. San José			
13	C13	Fusakatan	13	C33	Parque Central de Quevedo			
14	C14	San Jorge	14	C34	Unidad de Paracaidistas			
15	C15	Purilimpia	15	C35	U.T.Q. Campus			
16	C16	DANAYMA						
17	C17	CIPAL						
18	C18	UNIPAL						
19	C19	La Esperanza						
20	C20	INIAP (E.E.S.D)						

Cuadro 8. Comportamiento las cepas nativas de rizobios nodulantes en Maní forrajero (*Arachis pintoii*) frente a diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno. La Concordia, Esmeraldas. 2009

CEPAS	FUENTES DE CARBONO			FUENTES DE NITRÓGENO	
	GLUCOSA	FRUCTOSA	SACAROSA	GLICINA	TIROSINA
C5	1	1	1	1	0
C12	1	1	1	1	0
C13	1	1	1	1	0
C14	1	1	1	1	1
C16	1	1	1	1	1
C18	1	1	1	1	1
C19	1	1	1	1	0
C20	1	1	1	1	0
C23	1	1	1	1	0
C25	1	1	1	1	0
6011	1	1	1	1	0

0=Ausencia de crecimiento; 1=Presencia de crecimiento

Fuente: Investigación de Laboratorio
Elaborado por: CASANOVA, Byron. 2009

Tolerancia a Diferentes Condiciones de Estrés.

Antibióticos: La tolerancia a antibióticos fue muy baja, en la fuente de estreptomina y espectinomina no presentaron tolerancia las cepas. Sólo tres cepas obtuvieron crecimiento en la fuente de kanamicina (C13, C18), estas dos provenientes de la zona de Quinindé y la cepa (C23), de la zona de Quevedo. (Cuadro 12).

Metales Pesados: Los datos obtenidos en el análisis de metales pesados mostraron que ningunas de las cepas son tolerantes a metales pesados. (Cuadro 12).

Acidez: En relación al pH del medio los resultados obtenidos nos indican que las cepas no son tolerantes a niveles de pH 4,5 y 8,5, mientras que a niveles de 5,0 solo fueron tolerantes tres cepas, dos de la zona de Quinindé (C13, C14), y la cepa (C23), proveniente de la zona de Quevedo, la tolerancia al pH 6,8 predominó el crecimiento de todas las cepas de las dos localidades.

Salinidad: En cuanto a la salinidad, ninguna de las cepas obtuvo crecimiento en las concentraciones 0,005; 0,01; 0,02 %.

Úrea: Los datos obtenidos nos dan como resultados que todas las cepas crecieron en las distintas concentraciones de nitrógeno 20 ug/l; 50 ug/l; 100 ug/l; 500 ug/l, en concentraciones análogas a las cantidades de úrea aplicadas en el campo de 530 y 460g por planta año⁻¹

Análisis Estadístico (Fase de Laboratorio)

Los datos obtenidos del análisis de agrupamiento (Figura 3), se identificaron cinco grupos a partir de un dendograma donde podemos determinar los siguientes agrupamientos, el primer grupo la cepa 16, el segundo grupo entre las cepas 14, 18, el tercer grupo entre las cepas 5,12,19,20,25, el cuarto grupo entre las cepas 13,23, el quinto grupo la cepa 6011.

Cuadro 9. Tolerancia a diferentes niveles de estrés de las cepas noduladoras de Maní forrajero (*Arachis pintoii*). La Concordia, Esmeraldas. 2009

CEPAS	ANTIBIÓTICOS			METALES PESADOS				pH				NITRÓGENO				SALINIDAD		
	ESTREPTOMICINA	KANAMICINA	ESPECTINOMICINA	ALUMINIO	COBRE	PLOMO	ZINC	4,5	5,0	6,8	8,5	20 ug/l	50 ug/l	100 ug/l	500 ug/l	0,005	0,01	0,02
C5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C13	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C23	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
C25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0
6011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0

0 = Ausencia de Crecimiento; 1 = Presencia de Crecimiento

Fuente: Investigación de Laboratorio
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

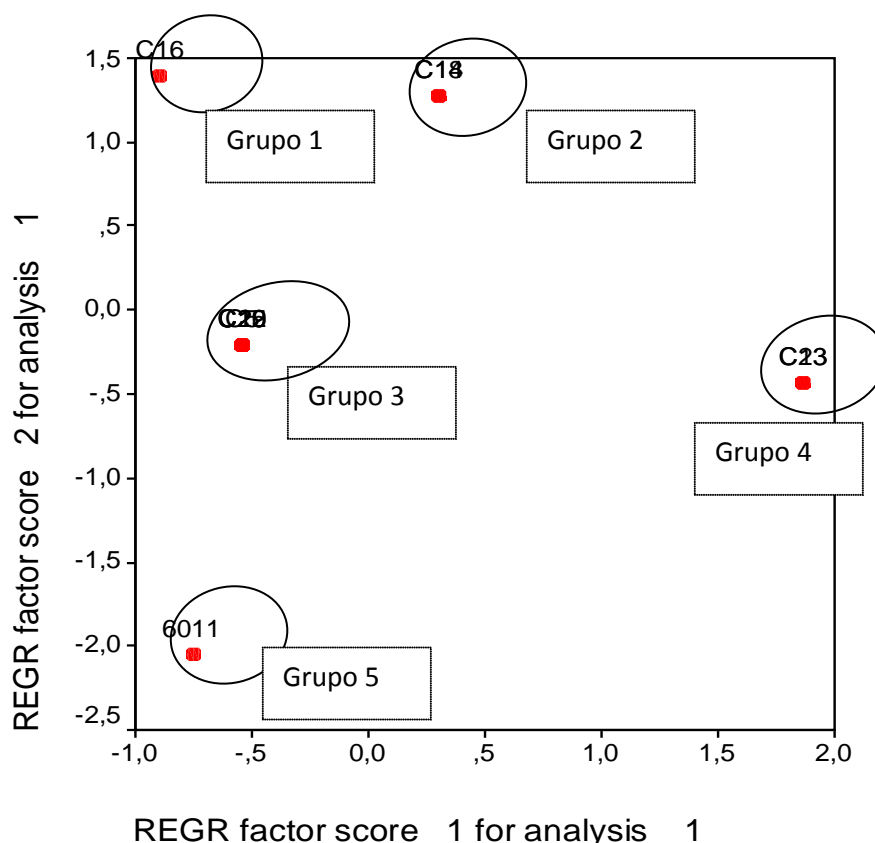


Figura 2. Análisis de agrupamientos de una colección de aislamientos de “*Rhizobium*” asociados a Maní forrajero (*Arachis pintoii*), en el cultivo de Palma, el primer grupo esta agrupada la cepa 16, el segundo grupo entre las cepas 14, 18, el tercer grupo entre las cepas 5,12,19,20,25, el cuarto grupo entre las cepas 13,23, el quinto grupo las cepas 6011. La Concordia, Esmeraldas. 2009

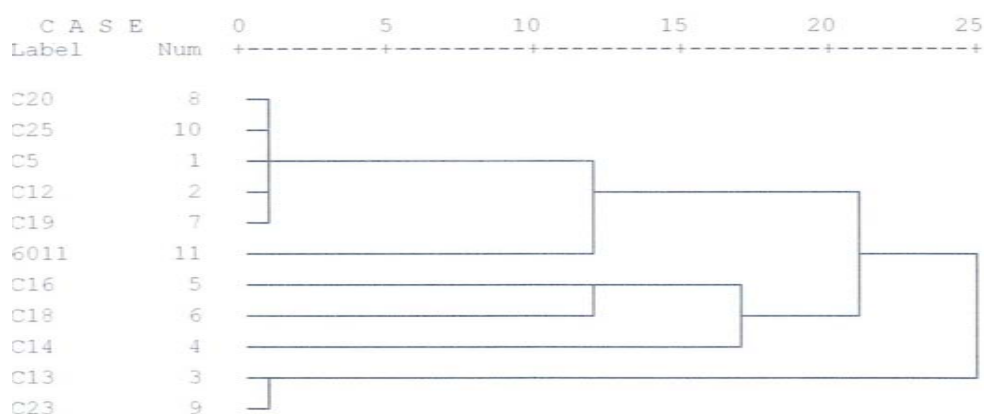


Figura 3. Dendrograma mostrando los dos principales grupos de los aislamientos de “rizobios” asociados a Maní forrajero (*Arachis pintoi*), en el cultivo de Palma Aceitera, en el Ecuador. La Concordia, Esmeraldas. 2009

FASE DE INVERNADERO

La investigación se desarrolló en tres etapas donde se evaluó a las cepas más eficientes en la fase invernadero. El interés generalmente se ha focalizado en el sistema simbiótico de las plantas leguminosas y los rizobios, debido a que esta asociación tiene el mayor impacto cuantitativo en el ciclo del Nitrógeno.

En el cuadro 13 se representan los resultados de los ADEVAS correspondientes a las diferentes variables analizadas, donde se refleja que los datos fueron tomados de forma clara y precisa.

Cuadro 10. Análisis estadístico de las variables evaluadas en la fase de invernadero. La Concordia, Esmeraldas. 2009

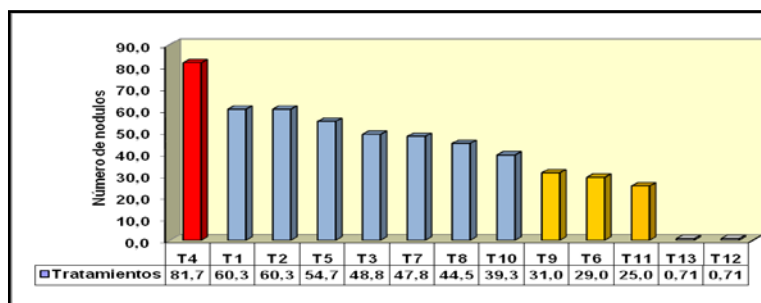
F de V	G.L.	Peso fresco de la planta	Peso seco de la planta	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos	Peso seco de nódulos	Nitrógeno (%)	Extracción de Nitrógeno
Total	51							
Tratamientos	12	1,27 NS	1,10 NS	19,07 **	65,46 **	61,50 **	2,07 *	2,00 NS
EExp.	39							
C.V. (%)		8,93	3,20	19,90	2,65	2,62	17,07	17,37

Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron. 2009

Número de Nódulos

Para los tratamientos dio como resultado tres rangos significativos: ocupando el primer rango significativo siendo superior al resto de tratamientos T4 (Cepa 14) con 81,7 nódulos promedio. El último rango significativo es ocupado por T12 (Testigo absoluto) y T13 (testigo químico) lo cual es lógico por no haber sido inoculados.

Mientras que los tratamientos con inoculación de cepas que ocupan el tercer rango significativo en cuanto a número de nódulos son: T9 (Cepa 23) con 31,0 nódulos, T6 (Cepa 18) en promedio 29,0 nódulos y T11 (Cepa Comercial 6011) con 25 nódulos en promedio y son estadísticamente iguales e inferiores al resto de tratamientos que cuentan con inoculación de cepas (Gráfico 1).

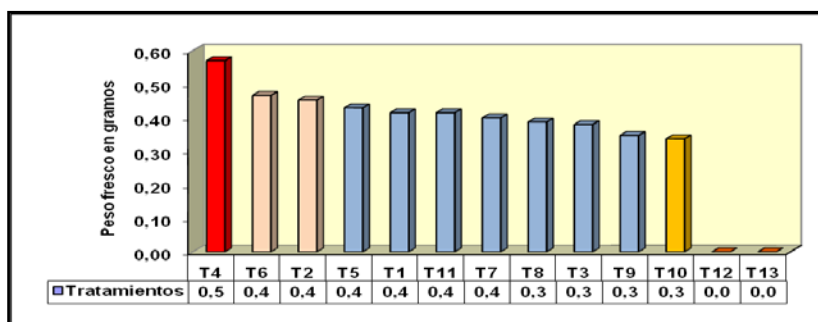


Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 1. Representación de tratamientos para número de nódulos. La Concordia, Esmeraldas, 2009

Peso Fresco de Nódulos

En el Gráfico 2, se representa los tratamientos que de acuerdo a la prueba de Tukey al 5 % se encontraron cuatro rangos significativos donde T4 (Cepa 14) con un peso promedio de nódulos de 0,57 gramos, es diferente y superior al resto de tratamientos ocupando el primer rango significativo. Mientras que los tratamientos T12 (Testigo absoluto) y T13 (testigo químico) ocupan el último rango de significancia debido a que en la investigación no se inoculó cepas a ninguno de ellos. El tratamiento T10 (Cepa 25) con menor influencia en cuanto a peso fresco de nódulos con 0,33 gramos siendo estadísticamente inferior al resto de tratamientos que presentan inoculación con las cepas.

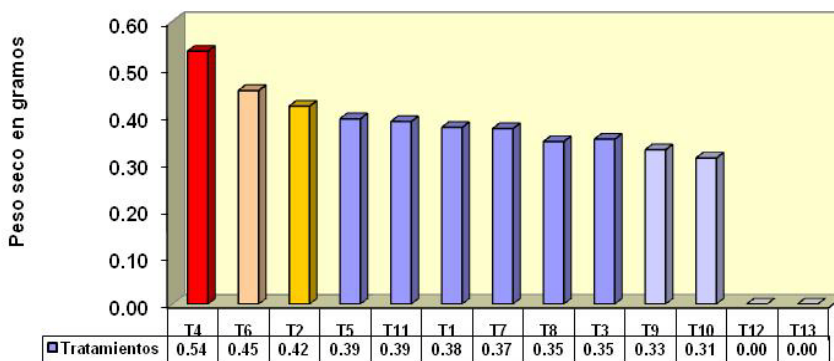


Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 2. Representación de tratamientos en peso fresco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas, 2009

Peso seco de los Nódulos

Para tratamientos reportó cuatro rangos de significancia estadística siendo T4 (Cepa 14) el tratamiento que ocupa el primer rango estadístico con un promedio de 0,54 gramos de peso seco. Los tratamientos evaluados con inoculación T9 (Cepa 23) con 0,33 gramos y T10 (Cepa 25) con 0,31 gramos de peso seco son estadísticamente iguales e inferiores al resto de tratamientos que fueron inoculados con Cepas de bacterias nitrificantes. Los tratamientos T12 (Testigo absoluto) y T13 (Testigo químico) no presentaron formación de nódulos en la raíz del Maní forrajero (*Arachis pintoii*) y ocupan el último rango significativo dentro de los tratamientos evaluados (Gráfico 3).

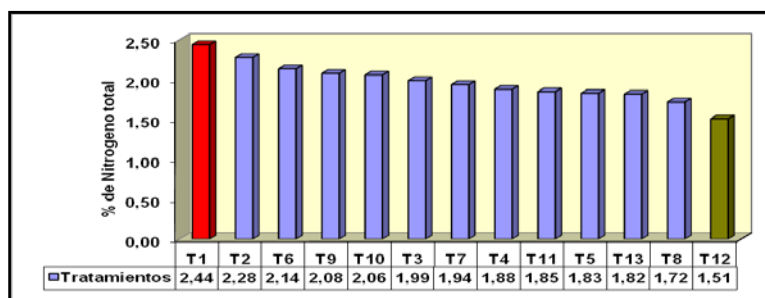


Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 3. Representación de tratamientos evaluados en peso seco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Nitrógeno Total (%)

Para la evaluación se detectó dos rangos significativos teniendo al tratamiento T1 (Cepa 5) superior y diferente al resto de tratamientos con un porcentaje de Nitrógeno 2,44. El tratamiento T12 (Testigo absoluto) es estadísticamente inferior al resto de tratamientos con 1,51 % de Nitrógeno total (Gráfico 4). Rodríguez, Villalobos, *et al.* (1998), indica que el Maní forrajero (*Arachis pintoi*) tiene un capacidad de Nitrógeno total que va de entre 2,96% a 3,40 % en la asociación con gramínea esto debido a que al estar asociado entra en competición por Nitrógeno lo que no ocurre cuando no están solas .



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 4. Representación de tratamientos evaluados en N. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Extracción de Nitrógeno

De acuerdo con análisis estadístico (Anexo 11) realizado, la variable Extracción de Nitrógeno no reporto significancia estadística. El Coeficiente de Variación que se manejo en esta investigación es 17,37 % lo cual da confiabilidad a los datos tomados.

FASE DE CAMPO

En esta fase se tomaron las mejores Cepas. Mejor adaptadas a la inoculación de estolones con rizobios, constituye una práctica agronómica más económica y generalmente más efectiva que la aplicación de fertilizantes nitrogenados para (TAURIÁN, *et al.* 2002).

En esta fase se evaluó su comportamiento y eficiencia en el campo para lo cual en el Cuadro 14 se representa los resultados de los ADEVAS evaluados en las diferentes variables analizadas, lo cual garantiza que la investigación ha sido bien concluida de conformidad a los datos que se reportan.

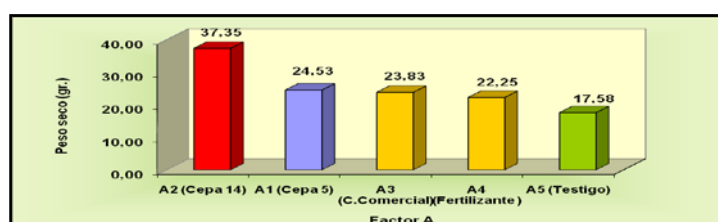
Cuadro 11. Análisis estadístico de las variables evaluadas en la fase de campo. La Concordia, Esmeraldas. 2009

F de V	G. de L.	Peso fresco de la planta	Peso seco de la planta	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos	Peso seco de nódulos	Cobertura %	Nitrógeno %	Extracción de Nitrógeno
Total	39								
Tratamientos	9	15,08 **	11,74 **	361,09 **	287,99 **	275,79 **	3,31 **	3,18 **	7,10 **
Cepas (A)	4	29,75 **	21,18 **	800,22 **	640,32 **	611,95 **	6,51 **	5,57 **	15,40 **
a ₅ vs a ₄ ,a ₃ ,a ₂ ,a ₁	1	14,86 **	27,68 **	977,78 **	830,32 **	801,28 **	19,56 **	5,08 NS	16,17 **
a ₄ vs a ₃ ,a ₂ ,a ₁	1	3,61 NS	11,68 **	1629,64 **	1383,86 **	1335,48 **	2,20 NS	0,79 NS	15,41 **
a ₃ vs a ₂ ,a ₁	1	10,74 **	13,18 **	289,63 **	140,06 **	149,94 **	1,81 NS	0,58 NS	14,03 **
a ₂ vs a ₁	1	18,38 **	32,16 **	303,82 **	207,025 **	161,08 **	2,45 NS	15,83 **	15,98 **
Riego (B)	1	0,047 NS	0,51 NS	0,65 NS	5,84 *	4,97 *	0,53 NS	0,76 NS	0,87 NS
AxB	4	4,17 **	5,10 **	12,07 **	6,20 **	7,33 **	0,81 NS	1,39 NS	0,37 NS
Repeticiones	3	2,77 NS	1,57 NS	0,46NS	1,24 NS	0,31 NS	10,54 **	2,07 NS	2,54 NS
Error Experimental	27								
C.V. (%)		26,94	18,01	8,98	2,10	1,85	3,91	10,15	18,32

Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Peso Seco de la Planta

El Factor A (Cepas) muestra tres rangos significativos donde A2 (Cepa 14) ocupa el primer rango que lo determina superior al resto con 37,35 gramos/planta en promedio, mientras que A5 (Testigo) ocupa el último lugar en promedio de peso seco con 17,58 gramos / planta que se puede observar en el (Gráfico 7).



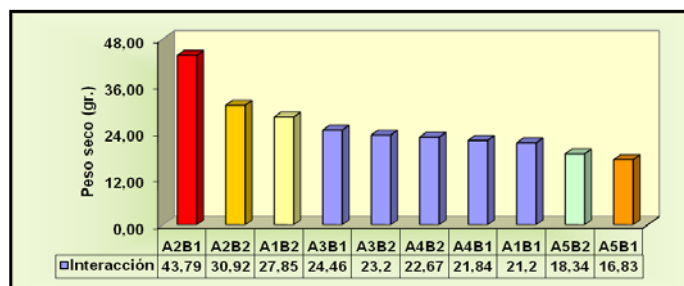
Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 7. Representación de Factor A (Cepas) para peso seco de la planta. La Concordia, Esmeraldas. 2009

En el Gráfico 7 se representa el Factor A (Cepas) y también las comparaciones ortogonales realizadas dentro de la investigación determinando alta significancia estadística la comparación de A5 (Testigo absoluto) versus el resto de factores donde se aclara que si es útil la fertilización química como el uso de cepas para el establecimiento de maní forrajero (*Arachis pintoi*), al igual que la influencia marcada entre A4 (fertilización) en contra de los factores que fueron inoculados con cepas de rizobio con alta significancia estadística. Hay referencia de alta significancia estadística entre las comparaciones de

los factores con inoculación de cepas tanto A3 (Cepa comercial) y A1 (Cepa 5), A2 (Cepa 14) marcan influencia positiva entre ellas en cuanto a la variable de peso seco de la planta.

En las interacciones de A x B, se expresó cuatro rangos significativos donde la interacción A2B1 (Cepa 14 con riego) presenta el mayor promedio de peso seco con 43,79 gramos/planta. El menor promedio lo mantienen la interacción A5B1 (testigo absoluto con riego) con 16,83 gramos / planta que es estadísticamente diferente y ocupa el último rango de significancia representado en el (Gráfico 8).

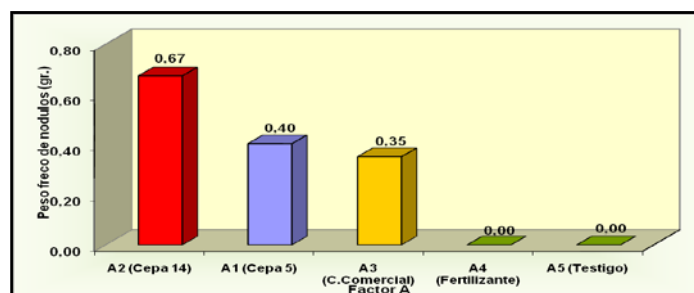


Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 8. Representación de interacción A x B para peso seco de la planta. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Peso Fresco de los Nódulos

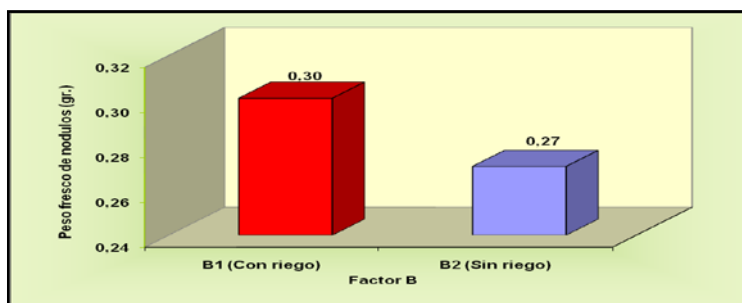
Las diferencias del Factor A (Cepas) se muestran en cuatro rangos significativos donde A2 (Cepa 14) ocupa el primer rango que lo determina superior al resto con 0,67 gramos de peso fresco en promedio, mientras que A3 (Cepa comercial) ocupa el último lugar en promedio de peso fresco de nódulos con 0,35 gramos entre los factores de A que fueron inoculados con cepas de *Rhizobium*, siendo estadísticamente inferiores los factores A4 (fertilizante), A5 (Testigo absoluto) debido a que no fueron inoculadas con cepas de *Rhizobium* y no presenta formaciones de nódulos por ende nada de peso de nódulos esto se puede observar en el (Gráfico 11)



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 11. Representación de Factor A (Cepas) para peso fresco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

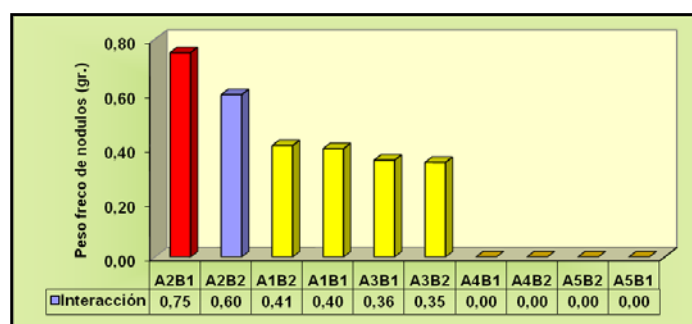
El Factor B (Condiciones de riego) presentó significancia estadística denotando influencia del mismo sobre el peso fresco de nódulos, se reportó que B1 (Con riego) es el mejor con un promedio de 0,30 gramos, siendo B2 (Sin riego) inferior en el peso fresco de nódulos que fue de 0,27 gramos de peso fresco véase en el (Gráfico 12).



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 12. Representación de Factor B (Condiciones de riego) para peso fresco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Las interacciones de A x B, se expresaron cuatro rangos significativos donde la interacción A2B1 (Cepa 14 con riego) presenta el mayor promedio que es 0,75 gramos de peso fresco de nódulos; mientras que el menor promedio lo mantienen las interacciones A1B2 (Cepa 5 sin riego) con un peso de fresco que es 0,41 gramos, A1B1 (Cepa 5 con riego) con 0,40 gramos en promedio, A3B1 (Cepa comercial con riego) es 0,36 gramos y A3B2 (Cepa comercial sin riego) que tiene 0,35 gramos de peso fresco de nódulos que es estadísticamente igual e inferiores a las interacciones que fueron inoculadas con cepas de *Rhizobium*, que está representado en el Gráfico 13. Mientras que en las interacciones A4B1 (Fertilizante con riego), A4B2 (Fertilizante sin riego), A5B1 (Testigo absoluto con riego) y A5B2 (Testigo absoluto sin riego) no hubo presencia de nódulos nitrificantes en la raíz de maní forrajero (*Arachis pintoi*).



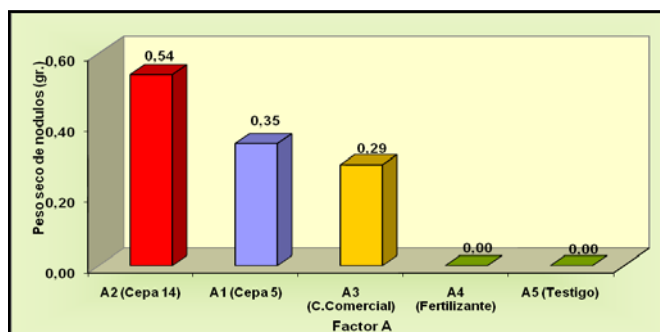
Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 13. Representación de interacción A x B para peso fresco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Peso Seco de los Nódulos

El Factor A (Cepas) presentó cuatro rangos significativos ubicándose A2 (Cepa 14) en el primer rango significativo como el de mayor promedio de peso seco en nódulos 0,54 gramos y el menor promedio de peso seco de nódulos se encuentra A3 (Cepa comercial) con 0,29 gramos que determina la influencia directa de las cepas de *Rhizobium* el peso seco de los nódulos.

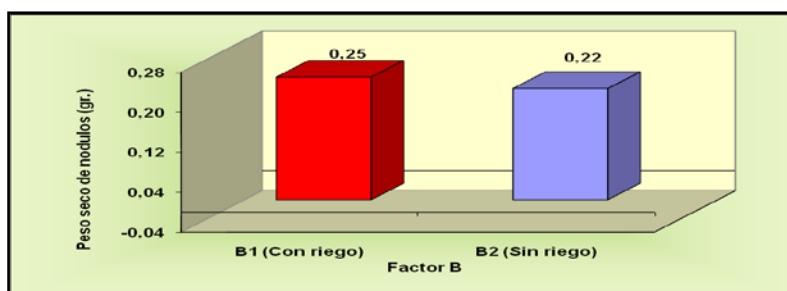
Los resultados de la prueba de Tukey al 5% son corroborados por las comparaciones ortogonales (Anexo 24) en cuanto a la diferencia entre las cepas nativas evaluadas dentro de esta investigación A1 (Cepa 5), A2 (Cepa 14) con alta significancia estadísticas al ser comparadas con A3 (Cepa comercial) y su efecto positivo en el peso seco de los nódulos de raíz de Maní forrajero (*Arachis pintoi*) véase en el (Gráfico 14).



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 14. Representación de Factor A (Cepas) para peso seco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

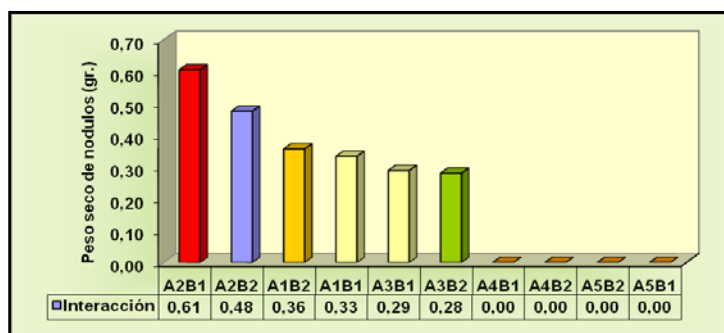
Las diferencias del Factor B (Condiciones de riego) se muestran en dos rangos significativos donde B1 (Con riego) ocupa el primer rango significativo con 0,25 gramos de peso seco, mientras que B2 (Sin riego) ocupa el último lugar en promedio de peso seco fresco con 0,22 gramos que se puede observar en el (Gráfico 15).



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 15. Representación de Factor B (Condiciones de riego) para peso seco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

En las interacciones de A x B, se expreso cinco rangos significativos donde la interacción A2B1 (Cepa 14 con riego) ocupa el primer rango significativo 0,61 gramos en peso seco de los nódulos y el menor promedio en peso seco de nódulos lo mantienen la interacción A3B2 (Cepa comercial sin riego) que tiene un peso seco de nódulos de 0,28 gramos lo que lo ubica en el rango significativo inferior de las interacciones donde se inoculo cepas de *Rhizobium*. Las interacciones A4B1 (Fertilizante con riego), A4B2 (Fertilizante sin riego), A5B1 (Testigo absoluto con riego) y A5B2 (Testigo absoluto sin riego) no presentaron formación de nódulos en la raíz de maní forrajero (*Arachis pintoi*) (Gráfico 16).



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

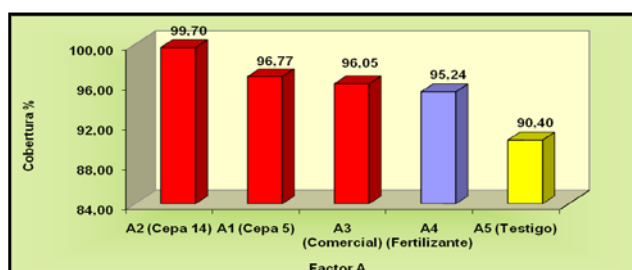
Gráfico 16. Representación de interacción A x B para peso seco de nódulos. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Cobertura

El Factor A (Cepas) dio como resultado dos rangos significativos donde A2 (Cepa 14) con una cobertura de 99,70 %, A1 (Cepa 5) con 96,77 % en cobertura y A3 (Cepa comercial) con un promedio general de 96,05 % son estadísticamente iguales y ocupan el primer rango significativo. Ocupando el último rango significativo se encuentra A5 (Testigo absoluto) con un promedio de 90,40 % (Gráfico 17).

Para el factor A (Cepas) se encontró alta significancia en la comparación de A5 (Testigo absoluto) con el resto A4 (Fertilizante), A3 (Cepa comercial), A2 (Cepa 14) y A1 (Cepa 5) lo que demuestra que la fertilización, la inoculación de cepas de *Rhizobium* tiene influencia en el porcentaje de cobertura del maní forrajero (*Arachis pintoi*) más no hay significancia estadística en la comparación de las cepas de *Rhizobium* (A1, A2, A3) y la fertilización química (A4) (Gráfico 17).

Según los datos obtenidos se acepta la citado por Nieto (2004) La capacidad del maní forrajero de crecimiento bajo sombra facilita su asociación con otros cultivos esto promueve aumentos en la biomasa en relación con el monocultivo.



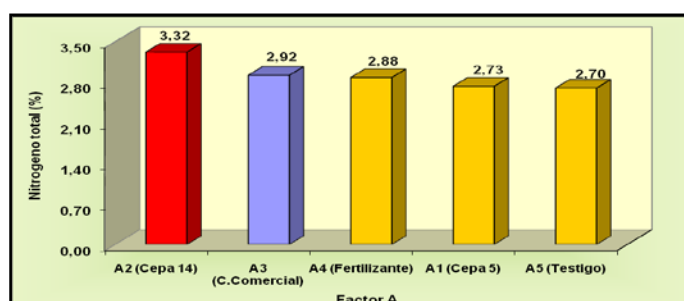
Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 17. Representación de Factor A (Cepas) para cobertura. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Nitrógeno Total (%)

Para el Factor A (Cepas): el primer rango significativo A2 (Cepa 14) con 3,32 % de Nitrógeno que es superior al resto. Mientras que A4 (Fertilizante) con 2,88 % de Nitrógeno, A1 (Cepa 5) con un promedio de Nitrógeno total de 2,73 % y A5 (Testigo absoluto) con 2,70 % de nitrógeno son estadísticamente iguales e inferior al resto de factores representados en el (Gráfico 19).

Las comparaciones ortogonales (Anexo 31) realizadas para el Factor A (Cepas) presentan alta significancia estadística en la comparación de las cepas nativas evaluadas A1 (Cepa 5) y A2 (Cepa 14) y su efecto directo en % de Nitrógeno total y no significancia en el resto de comparaciones evaluadas.



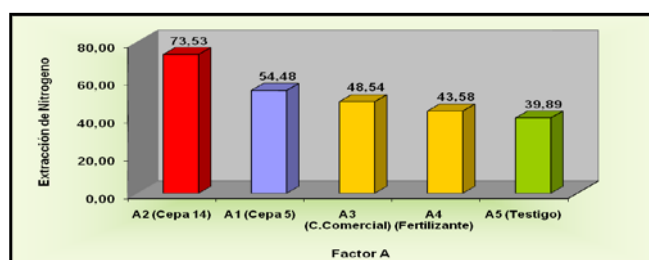
Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 19. Representación de Factor A (Cepas) para % de Nitrógeno Total. La Concordia, Esmeraldas. 2009

Extracción de Nitrógeno

En el Anexo 34 para el ADEVA de la variable extracción de nitrógeno presenta alta significancia estadística en las Fuentes de Variación para tratamientos y Factor A (Cepas) y ninguna significancia estadística entre el resto de fuentes de variación evaluadas con un coeficiente de variación de 18,32 % lo cual garantiza que la investigación ha sido bien concluida de conformidad a los datos que se reportan.

De acuerdo con la prueba de Tukey al 5 % (Anexo 35) para el Factor A (Cepas) presento tres rangos significativos ubicándose el Factor A2 (Cepa 14) con 75,53 % de extracción de Nitrógeno en el primer rango significativo y mientras que A5 (Testigo absoluto) se presenta con el menor promedio de extracción de Nitrógeno que es 39,89 % evaluados dentro de esta investigación representado en el (Gráfico 21)



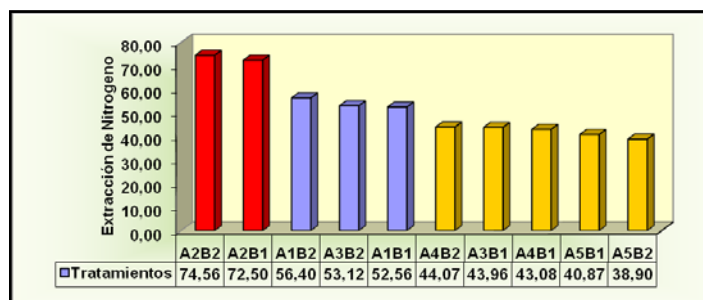
Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 21. Representación de Factor A (Cepas) para la extracción de Nitrógeno. La Concordia, Esmeraldas, 2009

Se presenta alta significancia entre A5 (Testigo absoluto) comparado con los factores con cepas inoculadas de *Rhizobium* (A1, A2 y A3) en el maní forrajero (*Arachis pintoi*) y A4 (fertilizante) demostrando una eficiencia en extracción de Nitrógeno, marcando la diferencia con el testigo absoluto. De igual forma alta significancia estadística entre la fertilización química (A4) vs las cepas de *Rhizobium* (A3, A2, A1) inoculadas a la leguminosa demostrando la alta fijación biológica de Nitrógeno por parte de las cepas así como la alta diferencia significativa entre las cepas nativas (A2, A1) y la cepa comercial (A3) manteniendo diferencia en cuanto extracción de Nitrógeno entre las cepas nativas (A2 vs A1) con alta significancia.

Los tratamientos presentaron alta significancia por lo que se desarrollo la prueba de significancia de Tukey al 5 % de probabilidad (Anexo 36) donde se detecto dos rangos significativos donde los tratamientos A2B2 (Cepa 14 sin riego) con 74,56 % en promedio y A2B1 (Cepa 14 con riego) que tiene un % de extracción de Nitrógeno de 72,50; son estadísticamente iguales y superiores al resto de tratamientos.

En el último rango significativo se ubicaron los tratamientos A4B2 (Fertilizante sin riego) de 44,07 %, A3B1 (Cepa Comercial con riego) con 43,96 %, A4B1 (Fertilizante con riego) de 43,08 %, A5B1 (testigo absoluto con riego) tiene un promedio de 40,87 % y A5B2 (Testigo absoluto sin riego) con un promedio de extracción de Nitrógeno de 38,90 % son iguales y estadísticamente inferiores al resto de tratamientos (Gráfico 22). Según lo citado por Rodríguez (1998) indica que el maní forrajero (*Arachis pintoi*) tiene un capacidad de fijar de un 53 a 58% de su contenido de nitrógeno total mientras que en condiciones de asociación con gramíneas es capaz de fijar 80% de Nitrógeno.



Fuente: Investigación de campo
Elaborado por: CASANOVA, Byron, 2009

Gráfico 22. Representación de tratamientos para extracción de Nitrógeno. La Concordia, Esmeraldas. 2009

CONCLUSIONES

1. En la fase de laboratorio se determinó que *Arachis pintoii*, es nodulada por rizobios de crecimiento lento, correspondientes al género *Bradyrhizobium*.
2. De las 40 muestras analizadas, se obtuvo 8 aislamientos de la zona de Quinindé y 2 aislamientos de la zona de Quevedo.
3. Mediante pruebas de caracterización se observó: todas las cepas fueron tolerantes a las fuentes de **Carbono**, **Nitrógeno**, todas las cepas para la fuente de **Glicina** crecieron adecuadamente, mientras que para la fuente de **Tirosina** se obtuvo crecimiento en las cepas C14, C16 y C18; en la tolerancia a **Antibióticos** en las fuentes de **Estreptomicina** y **Espectinomina** ninguna cepa presentó crecimiento, mientras que en la fuente de **Kanamicina** se obtuvo crecimiento de las cepas C13, C18, C23; para la tolerancia a **Metales Pesados** no se obtuvo crecimiento en ninguna cepa; frente a los niveles de **pH** se observó que a valores de 6.8 y 5.0 las cepas que presentaron crecimiento fueron C13, C14 y C23, en niveles 4.5 y 8.5 no se obtuvo crecimientos; para todos los niveles de **Nitrógeno** (20 ug/l, 50 ug/l, 100 ug/l, 500 ug/l), se obtuvo crecimiento en todas las cepas y finalmente para las dosis de **Salinidad** no se obtuvo crecimiento.
4. En la fase de invernadero la Cepa 14 presentó mejor respuesta en el número de nódulos, peso fresco y peso seco de nódulos; la Cepa 5 presenta mayor porcentaje de Nitrógeno total pero no es significativa la tasa de extracción de nitrógeno.
5. En la fase de campo el factor Riego influyó positivamente en el peso fresco y seco de la planta, número de nódulos, peso fresco y seco de nódulos, porcentaje de cobertura, porcentaje de nitrógeno total.
6. El factor Cepas da como resultado a las C14 y C5 como las más eficientes en la variable extracción de nitrógeno total, catalogándolas como potenciales inoculantes para mejorar las tasas de fijación biológica de nitrógeno en maní forrajero (*Arachis pintoii*).
7. La Cepa 14 tiene mejor respuesta en campo a la mayoría de las variables evaluadas.

RECOMENDACIONES

1. Usar la Cepa 14 ANCUPA, para la producción de bioinoculantes en el cultivo de maní forrajero (*Arachis pintoii*), asociado a palma aceitera, en la zona de La Concordia.
2. Evaluar las cepas C14 y C5 en diferentes condiciones de suelo y clima, como potenciales inoculantes de maní forrajero.
3. Considerar al maní forrajero como una cobertura favorable y de fácil adaptación y crecimiento, asociada al cultivo de palma aceitera, bajo condiciones de riego y sin riego.

BIBLIOGRAFÍA

- BERNAL, G; GRAHAM, P. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with Mexican bean rhizobia. Can. J. Microbiol. Vol. 47. Number 6. pp:526-534.
- BROSE, E.; PEDROSO, M.E. 2002. Produção de inoculantes. s.n.t. 15 p.
- CAMPAÑA, D. 2003. Evaluación de tres cepas de Rhizobium etti Bajo condiciones de campo y de ocho soportes de las bacterias para la producción de inoculantes en dos variedades de fréjol (*Phaseolus*

- vulgaris*). Tumbaco-Pichincha. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas Quito 2003.
- CIAT. 1987. Simbiosis leguminosa – rizobio; Manual de método de evaluación Selección y manejo agronómico. Cali (Col), CIAT. 210 p.
- _____. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Editores: Proyecto CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)-UNDP de Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-*Rhizobium* para aumentar la Fijación Biológica del Nitrógeno. Cali, Colombia.
- _____. 1988. Inoculación con rizobios de leguminosas forrajeras tropicales. Calí (Col), CIAT. 13 p. N^o: 14: 389-397.
- CONSTANTE, D. 1993. Influencia de cuatro portadores en la eficiencia y Competitividad de *Rhizobium meliloti* en campo. Tesis Ing. Agr. Quito (Ec). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 74p.
- GRAHAM, P. 1998. Biological dinitrogen fixation Symbiotic. P. 322-345. In Principles and Applications of Soil Microbiology. Sylvia, et al., eds. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
- GRAHAM, P. H. 2000. Nodule formation in Legumes. Encyclopedia of Microbiology. 3:407-417.
- JEREZ, M. 2004. Evaluación de Biotipos de *Bradyrhizobium spp.* en el cultivo del Maní (*Arachis hypogaea L.*) en las provincias de Manabí y Loja. Tesis Ing. Agr. Quito. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 127 p.
- MUNÉVAR, M. F. 1998. Ciclo de cursos de actualización de conocimientos sobre suelos con aplicaciones en el cultivo de palma de aceite. Modulo 2. p
- RODRÍGUEZ, R.; VILLALOBOS, L.; VILLAREAL, M. 1998. Fijación biológica de nitrógeno del maní forrajero (*Arachis pintoi*). UNA – ITCR. Programa Cooperativo UNA – NCSU – UCR 10.
- ROMERO, G. 2008. “Caracterización y Evaluación de la Efectividad de la Fijación de Nitrógeno de cepas de *Rhizobium*, asociadas a Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), como cultivo de cobertura de Palma Aceitera (*Elaeis guineensis Jacq*). Tesis Ing. Agrop. Santo Domingo. Escuela Superior Politécnica del Ejercito IASA II, Facultad de Ciencias Agropecuarias 128 p.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. 1984. Handbook for Rhizobia. Springer Laboratory. New York, U.S.A.
- SOMASEGARAN, P. and HOBEN, H. 1985. Methods in legume – rhizobium technology Paia, Hawaii, (EE.UU.) University of Hawaii, Department of Agronomy and Soil Science. 280p.
- SPRENT J.; SPRENT P. 1990. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. Plant and Soil 141: 16-41.
- VINCENT, J. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Centro Regional de Ayuda Técnica. Buenos Aires (Arg.). Editorial Hemisferio Sur. 200p.
- YONG, J.; et. al. 2001. A revision of *Rhizobium frank* 1889, with na emended description of the genus, and the inclusion of all species of *agrabacterium Conn* 1942 y *Allorhizobium undicola* de Lajudie et. Al. 1998 as new combination: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International of systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 89-103.