

CARACTERIZACION Y EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACION DE NITROGENO DE CEPAS DE RHIZOBIUM, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides*), COMO CULTIVO COBERTURA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq)

Gonzalo Romero¹, Gustavo Bernal²

INTRODUCCION

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* J.) es actualmente uno de los más importantes cultivos en el Ecuador principalmente por su extensión de 207.285 ha (Censo Palmero 2005) sembradas por 5515 palmicultores (de los cuales alrededor del 87% son pequeños agricultores), el impacto socio-económico generando plazas de trabajo de manera directa (90000 personas) e indirecta, y por su potencial como bio-combustible.

La palma aceitera es un cultivo que demanda importantes cantidades de nutrientes, especialmente de nitrógeno (N) y tiene una extracción constante de elementos nutritivos del suelo. El costo de la fertilización es una de las inversiones más altas del manejo del cultivo, por lo que se debe seleccionar adecuadamente los fertilizantes a utilizar y ejecutar prácticas culturales apropiadas que ayuden a mejorar la fertilidad de los suelos.

El uso de leguminosas de cobertura es importante como parte del manejo del suelo cultivado con palma. Estas leguminosas: 1) contribuyen con el control de la erosión del suelo protegiéndolo de las lluvias fuertes y de la luz directa del sol, 2) mejoran la condición del suelo al proveer cobertura con materiales orgánicos, 3) reducen la temperatura del suelo, 4) permiten la infiltración más rápida, reduciendo la escorrentía superficial, 5) estimulan la micro y macro flora del suelo, 6) proveen de N por medio de la fijación simbiótica de N₂ atmosférico, 7) controlan plagas al prevenir la infestación de insectos que aparecen en los troncos de palma caídas, y 8) controlan las malezas por competencia (Rankine y Hardter, 1998).

Para obtener mayor cantidad de material vegetal de la leguminosa de cobertura, y por lo tanto mayor contribución de nutrientes y de protección al suelo, una estrategia importante es seleccionar cepas de la bacteria benéfica del suelo conocida como *Rhizobium* (o “rizobio”) que fija N atmosférico en beneficio de la leguminosa. Si bien es cierto, existen en el mercado inoculantes de esta bacteria, éstos son productos importados elaborados con cepas foráneas, aisladas de suelos diferentes a los del Ecuador, y que lamentablemente resultan ser ineficientes bajo condiciones locales (Bernal, 2006). Es importante por lo tanto, encontrar cepas nativas de las regiones ecuatorianas donde se cultiva la palma aceitera.

Este estudio busca: 1) caracterizar fenotípicamente a los aislamientos nativos de *Rhizobium* asociados a la Purearía, para conocer el genero taxonómico de la bacteria, y 2) seleccionar las cepas mas eficientes en fijar nitrógeno atmosférico al asociarse con la leguminosa, y tolerantes a químicos. Con la inoculación de la semilla de la Purearía con las mejores cepas seleccionadas en el estudio, se obtendrán plantas de la leguminosa con mayor material vegetativo que contribuya con el control de la erosión y con la fertilidad del suelo, en

¹ Estudiante Egresado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, IASA II. Becario de ANCUPA.

² Microbiólogo de Suelos, Ph D., Asesor Técnico de ANCUPA.

beneficio del cultivo de palma. Este artículo, presenta los resultados relacionados con la caracterización fenotípica de la bacteria asociada a la Pueraria.

OBJETIVOS

General

Contribuir con el mejoramiento de la calidad del suelo cultivado con palma aceitera, a través de la selección de cepas de “*Rhizobium*” asociadas a la Pueraria. Al mejorar la fertilidad del suelo por acción de la leguminosa, se estaría contribuyendo con la productividad de la palma.

Específicos

- Caracterizar fenotípicamente las cepas de “*Rhizobium*”, aisladas de las cuatro zonas productoras de Palma Aceitera.
- Evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de las cepas, bajo condiciones de invernadero y de campo.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de suelos y de raíces de Pueraria para el aislamiento de *Rhizobium*.

Se recolectaron 60 muestras de suelo en las diferentes zonas del Ecuador, donde el cultivo de la palma tiene importancia económica.

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

Bloques	Código	No de palmicultores	Superficie	%	No de muestras
Quinindé	A, B, C, D, E	4091	119414.61	58%	35
Quevedo	F, G, H, I	1464	54416.50	26%	16
San Lorenzo	K	71	15187.31	7%	4
Oriental	J	350	18266.89	9%	5
TOTAL		5976	207285.31	100%	60

Fuente: Censo Palmero, 2005.

La distribución de muestras está en relación a la superficie sembrada por bloques

En la toma de muestras se realizó una calicata para observar la rizosfera y determinar la profundidad de las raíces, identificando donde se encuentran la mayor cantidad de nódulos. La identificación de cada muestra se realizó con iniciales del sitio, y con numeración progresiva.

Cuadro 2. Sitios de recolección de las muestras. Se indican solo los 40 aislamientos con los cuales se llevo a cabo el estudio.

MUESTRA	CODIGO	ZONA	PROVINCIA
1	QE1	Quinindé	Esmeraldas
2	QE2	Quinindé	Esmeraldas
3	QE3	Quinindé	Esmeraldas
4	QE4	Quinindé	Esmeraldas
5	QE6	Quinindé	Esmeraldas
6	QE7	Quinindé	Esmeraldas
7	QE8	Quinindé	Esmeraldas
8	QE10	Quinindé	Esmeraldas
9	QP12	Quinindé	Pichincha
10	QZN13	Quinindé	Zona no Delimitada
11	QZN15	Quinindé	Zona no Delimitada
12	QE17	Quinindé	Esmeraldas
13	QE18	Quinindé	Esmeraldas
14	QP19	Quinindé	Pichincha
15	QP20	Quinindé	Pichincha
16	SLE21	San Lorenzo	Esmeraldas
17	SLE23	San Lorenzo	Esmeraldas
18	SLE24	San Lorenzo	Esmeraldas
19	QE26	Quinindé	Esmeraldas
20	QZN29	Quinindé	Zona no Delimitada
21	OO34	Oriente	Orellana
22	OS36	Oriente	Sucumbios
23	OS38	Oriente	Sucumbios
24	QZN41	Quinindé	Zona no Delimitada
25	QE43	Quinindé	Esmeraldas
26	QE44	Quinindé	Esmeraldas
27	QZN45	Quinindé	Zona no Delimitada
28	QuLR46	Quevedo	Los Ríos
29	QuZN47	Quevedo	Zona no Delimitada
30	QuG48	Quevedo	Guayas
31	QuZN49	Quevedo	Zona no Delimitada
32	QuZN50	Quevedo	Zona no Delimitada
33	QuLR51	Quevedo	Los Ríos
34	QuLR53	Quevedo	Los Ríos
35	QuLR54	Quevedo	Los Ríos
36	QuLR55	Quevedo	Los Ríos
37	QuLR57	Quevedo	Los Ríos
38	QuLR58	Quevedo	Los Ríos
39	QuLR59	Quevedo	Los Ríos
40	QuLR60	Quevedo	Los Ríos

Aislamiento de *Rhizobium*

Para el aislamiento de los rizobios a partir de nódulos, estos fueron primeramente esterilizados superficialmente según la metodología del CIAT (1998). Los nódulos fueron sumergidos en etanol (95%) durante 3 minutos, para luego pasar a una solución de hipoclorito de sodio (5%) durante 3 minutos, y finalmente ser lavados (cinco veces) con agua destilada estéril. Cada uno de los nódulos fueron colocados en tubos pequeños de plástico (tipo Eppendorf) conteniendo 200µl de agua destilada estéril, para ser macerados individualmente. Entonces, una alícuota de 25µl de la suspensión bacteriana se sembró en platos Petri conteniendo medio de cultivo LMA (levadura, manitol, agar) (Vincent, 1975). Las placas fueron incubadas en estufa a 26 °C, por un período adecuado (7-14 días) que permitió visualizar claramente la formación de colonias.

Pruebas de autenticación de la bacteria.

Para verificar la pureza de cada aislamiento de la bacteria, se siguió la metodología del CIAT (1988). Previamente los aislamientos se sometieron a tinción *Gram*, para luego ser sembrados en placas Petri conteniendo LMA con el indicador rojo congo en una concentración de 10ml/L (CIAT, 1988), y en medio glucosa-peptona-agar (GPA) conteniendo púrpura de bromocresol (10 ml/L). Las placas fueron mantenidas en incubadora a una temperatura de 26° C, y por un período de 7 a 14 días.

Conservación del germoplasma bacteriano

Se preparó asépticamente una solución de peptona al 20% y otra de sucrosa al 10%. Estas soluciones se esterilizaron por separado durante 15 minutos a 121° C, para luego ser mezcladas. Bajo la cámara de flujo laminar, se dispuso la mezcla sobre las colonias bacterianas creciendo en el medio de cultivo apropiado dentro de cajas Petri., se frotó las colonias con la ayuda de una asa de platino hasta lograr una suspensión bacteriana homogénea. A continuación, se colocó alícuotas de 200 µl de cada suspensión bacteriana (cepa) en tubos pequeños de plástico (tipo Eppendorf) de 1.5 ml de capacidad, y previamente esterilizados y sellados con algodón estéril. Cada tubo conteniendo una cepa de *Rhizobium*, fue sometido al proceso de liofilización. Se utilizó un liofilizador Labconco (Free Zone 4.5 liter. Model 77510) donde los tubos permanecieron por un tiempo 48 horas a una temperatura de -54 °C (54 °C bajo cero), luego de lo cual fueron cerrados y almacenados en refrigeración (4° C) hasta su utilización.

Reconstitución de las cepas

Para la reconstitución de las cepas almacenadas, en cada tubo de almacenamiento se colocó una pequeña cantidad de medio de cultivo (LMA) para generar una solución bacteriana. Una alícuota de la solución fue transferida a medio de cultivo (LMA) sólido para el crecimiento de nuevas colonias.

Producción del caldo bacteriano y determinación de la concentración.

De una colonia (pura) de cada cepa, formada en medio de cultivo sólido, se transfirió con el asa de platino una pequeña cantidad para ser depositada en frascos (100 ml) conteniendo medio de cultivo líquido. Luego por agitación se logró obtener los caldos bacterianos con una concentración aproximada de 10⁹ cel/ml (determinada por espectrometría). Esta concentración

se logró obtener después de los tres días, aunque algunas cepas lograron alcanzar esta concentración después de los ocho días de agitación. El caldo bacteriano de cada cepa con la concentración indicada, fue diluido con agua destilada estéril, hasta lograr una concentración final de 10^5 cel/ml.

Caracterización fenotípica de las cepas de *Rhizobium*

Para la caracterización fenotípica de las cepas asociadas a la Pueraria, se considero únicamente 40 aislamientos, en vista de que no se consiguió colonias puras de las 20 restantes en las pruebas correspondientes. A partir de las suspensiones bacterianas de 10^5 cel/ml, de cada cepa se tomó una alícuota de 50 μ l para depositarse en un orificio de una placa ELISA. Con la ayuda de un multi-inoculador (multipunto) de 48 descargas, fueron transferidas cuidadosamente sobre la superficie del medio de cultivo conteniendo la sustancia química, y así determinar la resistencia de cada cepa a ese producto.

Pruebas:

Tiempo de Crecimiento

Los aislamientos fueron sembrados en el medio LMA, e incubaron a 26 °C. Las lecturas se ejecutaron a los 5 y 12 días, determinándose dos rangos de crecimiento: 3 a 5 días para rizobios de crecimiento rápido y 7 a 12 días para rizobios de crecimiento lento (Somasegaran y Hoben, 1994).

Morfología de Colonias

Las colonias crecidas en medio LMA e incubados a 26 °C, fueron clasificadas en tres categorías: acuosas translúcidas, acuosas blancas opacas y cremosas opacas.

Producción de acidez o alcalinidad

Los microsimbiontes de Pueraria fueron sembrados en medio LMA conteniendo azul de bromotimol (0.25 g/100ml). Las placas fueron incubadas a 26 °C por 7 días determinándose la acidificación (color amarillo) o alcalinización (color azul) producida por cada cepa.

Crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno

Se siguió el método descrito por Bernal y Graham. (2001). Se utilizaron soluciones con fuentes de carbono y nitrógeno, incluidos sorbosa, tartrato, D-glucoronic, eritritol, dulcitol, citrato, lactatosa, glicina, triptófano, tirosina, respectivamente. Cada una usada en una concentración final de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en un medio basal. Además se ensayaron otras fuentes de carbono, como: glucosa, galactosa, xylosa, fructosa, maltosa, sacarosa.

Resistencia a antibióticos

Los aislamientos fueron sembrados en el medio de cultivo triptona-levadura-agar (TLA) conteniendo los antibióticos: estreptomycin (3 $\mu\text{g/ml}$), espectinomycin (5 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina

(10 ug/ml), y ácido nalidíxico (40 ug/ml), en base a la metodología sugerida por Beringer, 1974 (citado por Bernal y Graham, 2001).

Tolerancia a metales pesados.

Se probó la tolerancia al aluminio (500 ug/ml), plomo (500 ug/ml), cobre (100 ug/ml) y zinc (100 ug/ml), contenidos en medio TLA.

Tolerancia a pH del medio

Los aislamientos fueron evaluados en su capacidad de crecer en medio triptona-levadura-agar (TLA) a pH 4.5; 5.0; y 8.5.

Tolerancia a concentraciones de NaCl

Se determinó la tolerancia a 0.5%; 1.0%; 2.0% de NaCl. Se utilizó el medio TLA (triptona-levadura-agar). Las cepas expuestas a las diferentes concentraciones de sal, fueron incubadas a 26 °C durante 7 días.

Tolerancia a la urea

Se probó la tolerancia a concentraciones análogas a las reales de nitrógeno (1150, 530 y 460 gr por planta año⁻¹) contenidos en medio LMA.

Tolerancia al Muriato de Potasio

Se determinó la tolerancia a concentraciones análogas a las reales de muriato de potasio (460, 370 y 180 gr por planta año⁻¹) contenidos en medio LMA.

Las soluciones de carbono, nitrógeno, así como los antibióticos, metales pesados, cloruro de sodio, urea, y muriato de potasio, fueron esterilizadas por filtración, utilizando filtros *Acrodisc 13* (Gelman Sciences) de 0.2 µm, para ser añadidos posteriormente a los distintos medios estériles mantenidos en baño María, a una temperatura de 55 °C.

La presencia o ausencia de crecimiento de los aislamientos fue determinada dos veces. A los 7 días y a los 14 días. Todas las placas Petri fueron incubadas a 26 °C.

Toma de datos

Después de realizar las lecturas para cada prueba, la presencia o ausencia de crecimiento de cada cepa fue registrada en una matriz binaria en el programa NTSYS ver 5.0 (Numerical Taxonomical Statistics System). En cada prueba, el crecimiento de cada cepa se registró como positivo (1), y la ausencia de crecimiento como cero (0).

Análisis Estadístico

Una vez obtenida la matriz se aplicó la técnica de “cluster análisis” utilizando el método de UPGMA (Media Aritmética No Ponderada; Sneath & Sokal, 1973) mediante la utilización del

coeficiente SM (Simple Match). Se generó así, un dendrograma, el cual permitió mostrar las relaciones fenotípicas entre las cepas estudiadas.

RESULTADO Y DISCUSION

Siete cepas (cuadro 3), presentaron un crecimiento rápido en medio LMA, con un tiempo de crecimiento de colonias de 3 días versus 9 días de las 43 restantes, las cuales fueron consideradas de crecimiento lento en el mismo medio de cultivo. Las cepas de crecimiento rápido resultaron ser de la Provincia de Esmeraldas (Quinindé y San Lorenzo) y una de la Provincia de Pichincha (zona límite con Esmeraldas). Las cepas de crecimiento rápido, formaron colonias circulares de apariencia acuosa de color blanco opaco, mientras que las cepas de crecimiento lento, tomaron una coloración cremosa opaca (cuadro 3).

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

En cuanto a antibióticos, se observa en el cuadro 3, que la kanamicina fue el antibiótico, al cual las cepas en estudio presentaron mayor tolerancia, con cinco cepas de Quinindé, una de San Lorenzo, una del oriente, y una de la zona de Quevedo. En el medio de cultivo conteniendo ácido nalidíxico, solo siete cepas mostraron crecimiento, de las cuales, cuatro correspondieron a Quevedo, una a Quinindé, una a San Lorenzo y una a la región amazónica. En estreptomicina, a la concentración arriba indicada, crecieron siete, con tres pertenecientes Quinindé, tres a Quevedo y una al oriente. En espectinomicina, ninguna de las cepas evidenció crecimiento a la concentración experimentada.

Los datos obtenidos en el análisis de metales pesados mostraron que cinco cepas de Quinindé (QE7, QE8, QZN15, QP19, QE26) crecieron en el medio de cultivo conteniendo los metales Zinc y Plomo, y solo una de San Lorenzo (SLE21) y una del oriente (OO34), crecieron en medio con este metal. Las cepas de Quevedo no toleraron ningún metal pesado (cuadro 3).

Cuadro 3. Crecimiento, morfología, y tolerancia a antibióticos y metales, de las cepas en estudio.

CEPAS	Tipo de Crecimiento	Morfología	Antibióticos				Metales			
			Kanamicina	Ácido Nalidíxico	Estreptomina	Espectinomina	Aluminio	Zinc	Plomo	Cobre
QE1	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE2	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE3	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE4	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE6	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE7	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	+	-	-	-	-	+	-	-
QE8	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	+	+	-	-	-	+	-	-
QE10	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	+	-	-	-	-	-	-	-
QP12	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	+	-	+	-	-	-	-	-
QZN13	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QZN15	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	+	+	-
QE17	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE18	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QP19	Crecimiento Lento	Creoso Opaco		-	-	-	-	+	-	-
QP20	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	+	-	-	-	-		-	-
QE26	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco		-	-	-	-	+	+	
QZN29	Crecimiento Rápido	Acuoso Blanco Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QZN41	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QE43	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	+	-	-	-	-	-
QE44	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	+	-	-	-	-	-
QZN45	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
SLE21	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	+	-	-	-	-	+	-	-
SLE23	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-		-	-	-	-	-	-
SLE24	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-
OO34	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-		+	-	-	+	-	-
OS36	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-
OS38	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuLR46	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuZN47	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuG48	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuZN49	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-
QuZN50	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-

QuLR51	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuLR53	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	+	-	-	-	-	-
QuLR54	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuLR55	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	-	-	-	-	-	-
QuLR57	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-
QuLR58	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	+	-	-	-	-	-	-
QuLR59	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	-	-	+	-	-	-	-	-
QuLR60	Crecimiento Lento	Creoso Opaco	+	-	+	-	-	-	-	-

Las cepas de Quinindé son las que mas toleraron las concentraciones de antibióticos, y de metales pesados. Estos resultados, pueden estar relacionados con el hecho de la zona mencionada es tradicionalmente agrícola, sometida desde hace años a un manejo intensivo de la palma, con el uso de agroquímicos, a los cuales las cepas y microorganismos del suelo en general pudieron haberse adaptado a las condiciones adversas, generando tolerancia o resistencia a determinados productos químicos. Este hecho también se evidencia en la zona de Quevedo principalmente con antibióticos. Estudios microbiológicos de laboratorio, realizados por la Universidad Técnica Equinoccial (Bernal, 2006) evidenciaron una población alta de actinomicetos en las dos zonas, y se conoce que este grupo tiene la capacidad de producir una gama de antibióticos como mecanismo de sobre vivencia. Posiblemente, el rizobio en estas zonas convive sinérgicamente con este grupo importante del suelo, generando mecanismos de resistencia a los antibióticos.

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

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

En relación a la salinidad, ninguna de las cepas estudiadas creció a las concentraciones de 0.5; 1 y 2%. Dos cepas de Quinindé (QE10 y QE18), y cuatro de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) crecieron a concentraciones análogas a las cantidades de urea aplicadas en el campo (de 530 y 460 gr por planta año⁻¹). En cuanto al muriato de potasio, el aspecto mas relevante es que, las cepas de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) toleraron concentraciones análogas a las del campo (460, 370 y 180 gr por planta año⁻¹), mientras que las de Quinindé (QE18, QP19, QE26 y QE44) toleraron concentraciones solo de 370 y 180 gr por planta año⁻¹.

Los resultados mostraron que las cepas de crecimiento rápido, acidificaron el medio de cultivo LMA usando azul de bromotimol, y convirtiéndolo a una coloración amarillenta, con

excepción de los aislamientos QE10, QE17, QE18 y SLE23, que alcalinizaron el medio de cultivo (color azul). Las cepas de crecimiento lento, alcalinizaron el medio de cultivo, pero así mismo se observó ciertas excepciones, como las cepas QP12, QZN15, QP19, SLE24, QE26, QZN29, QuLR46 y QuLR55 que no lo hicieron.

Análisis Estadístico

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

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

Figura 1. Dendograma mostrando la relación de aislamientos de “rizobios” asociados a la Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), en el cultivo de Palma Aceitera.

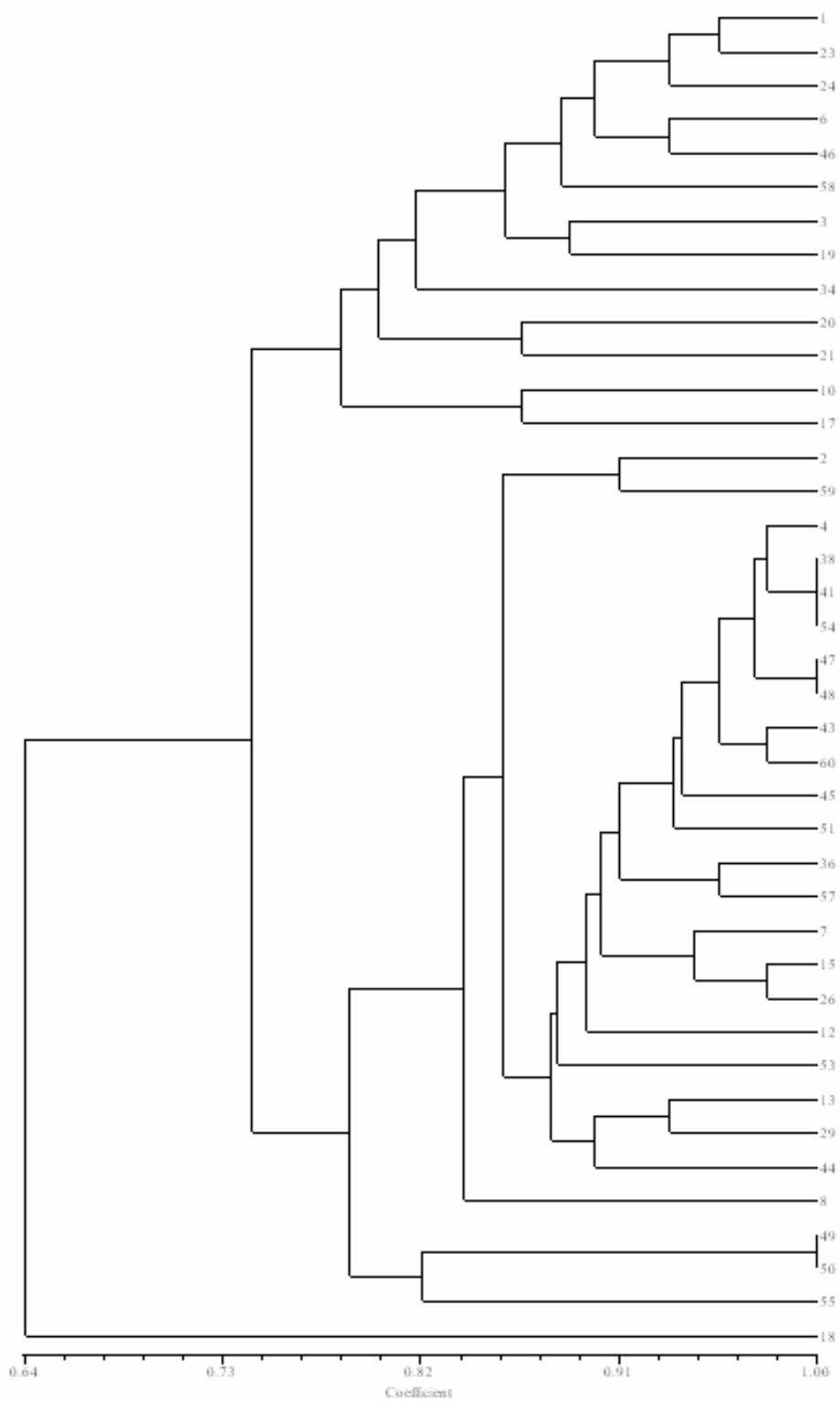
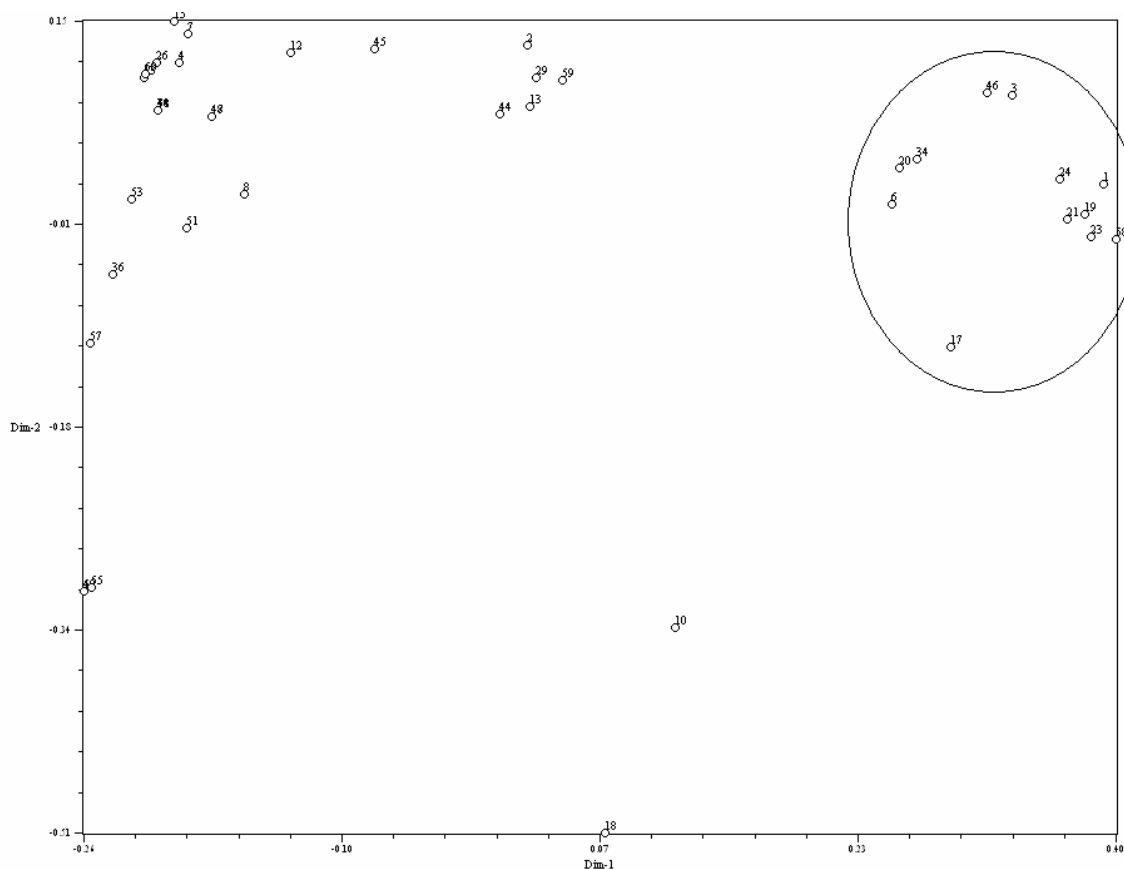


Figura 2. Análisis gráfico de agrupamientos de una colección de aislamientos de “*Rhizobium*” asociados a la Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), en el cultivo de Palma Aceitera.



CONCLUSIONES

- Los resultados del estudio, sugieren que dos grupos de bacterias fijadoras de N, están asociadas a la leguminosa Pueraria. Este hecho es más evidente con las cepas aisladas de la zona de Quinindé (Provincia de Esmeraldas). Probablemente, existen al menos dos géneros de la bacteria (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) haciendo simbiosis con esta leguminosa de cobertura de la palma. El primer grupo de cepas son de crecimiento rápido, y el otro, es cepas de crecimiento lento, respectivamente. Estos resultados permiten también considerarla a la Pueraria como una leguminosa promiscua, que se asocia naturalmente con rizobios de taxonomía (en cuanto a genero) diferente.
- En términos generales, en las zonas productoras de palma aceitera del país, son las cepas de crecimiento lento las que prevalecen, asociadas a la leguminosa, pero un hecho interesante es que en la zona de Quinindé, las de crecimiento rápido son las que prevalece. Será importante, a través de un diagnostico, determinar si la practica de la inoculación es frecuente y desde hace que tiempo se lo ha realizado, y obviamente si la practica ha tenido éxito en cuanto a fijación de nitrógeno en la leguminosa.
- Las cepas de las zonas de Quinindé y Quevedo mostraron ser las más tolerantes a condiciones adversas. Las condiciones de una agricultura más intensiva en ambas

regiones, probablemente son causa para que estos microorganismos desarrollen mecanismos de adaptación.

- Los resultados de este estudio, recomiendan realizar una caracterización considerando características genotípicas que permitan elucidar definitivamente la taxonomía del rizobio asociado a la Pueraria, y en el estudio a realizarse sobre la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas, será necesario determinar si las mejores cepas en fijar N, corresponden al género *Rhizobium* o al género *Bradyrhizobium*.

BIBLIOGRAFIA

1. 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. In press.
2. Bernal, G. 2006. Comunicación Personal.
3. Carmona, A. 2004. Cobertura Vegetal en Palma Aceitera. Costa Rica. XXVI Curso Internacional de Palma Aceitera. Agosto 23 – Septiembre 11.
4. Censo Palmero. 2005. Asociación Nacional de Palma Aceitera (ANCUPA), Fundación de Fomento de Exportaciones de Aceite de Palma y sus Derivados de Origen Nacional (FEDEPAL), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria (SIGAGRO).
5. CIAT. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Editores: Proyecto CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)-UNDP de Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-Rizobio para aumentar la Fijación Biológica del Nitrógeno. Cali, Colombia.
6. Coyne, M. 2000. Microbiología del Suelo un Enfoque Exploratorio. México.
7. 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.
8. Pound, B. 1997. Cultivos de Cobertura para la Agricultura Sostenible en América. Taller Regional Latinoamericano, realizado por la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida, México. Consultado 13 Marzo 2006. Disponible en: <http://www.lead.virtualcenter.org/es/ele/conferencia1/Agrofor1.htm>
9. Rankine, T.H., Hardter, R. 1998. Guía de Campo. Serie en Palma Aceitera. Fase Inmadura. Volumen II. INPOFOS Y CANPOTEX. Traducido 2004. p 75-84.
10. Sneath, H. F., Sokal, R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Eds. D. Kennedy. 573 p.
11. Rodríguez, M., González, M., Ferrera, R. 1993. Manual de Agro microbiología. México. Editorial Trillas. 11p.
12. Somasegaran, P., Hoben, H. 1994. Handbook for rhizobia. Springer Laboratory. New York, U.S.A.
13. VINCENT, J. 1975. Manual Práctico de Rizobiología. Centro Regional de Ayuda Técnica. Buenos Aires (Arg.). Editorial Hemisferio Sur. 200p.