

EVALUACION AGRONOMICA DE OCHO ESPECIES DE LEGUMINOSAS HERBACEAS NATIVAS, IDENTIFICADAS COMO POTENCIALES FIJADORAS DE NITROGENO ATMOSFERICO

José Francisco Guamán Díaz¹ y Magaly Yaguana Arévalo¹

¹ Universidad Nacional de Loja. Correo electrónico: guamandiaz@hotmail.com

INTRODUCCION

Las leguminosas nativas de las zonas estacionalmente secas de la provincia de Loja, son especies adaptadas a condiciones edafoclimáticas adversas, siendo necesario realizar estudios que generen conocimientos para la sustentación de su uso como mejoradoras de la fertilidad de los suelos y su inserción en los sistemas de producción de las familias campesinas.

Las leguminosas establecen simbiosis con bacterias generalmente del género *Rhizobium*, la planta suministra los carbohidratos necesarios para el metabolismo de las bacterias y éstas los utilizan como fuente de energía al transformar el nitrógeno libre de la atmósfera, en una forma asimilable para la planta y su posterior incorporación a las proteínas; fijando de esta manera el nitrógeno que será incorporado al sistema agrícola; esta asociación tiene mayor impacto en el rendimiento y la producción del cultivo. Esta propiedad es de gran importancia desde el punto de vista alimenticio y ecológico, porque su integración permite la restauración y mantenimiento de la fertilidad del suelo, proveyendo de nitrógeno a bajo costo (FAO, 1985). La presente investigación estudió la efectividad y eficiencia de la fijación biológica de N₂ al inocular cepas de *Rhizobium* aisladas de ocho leguminosas nativas herbáceas de zonas secas de Centro Loja y Valle de Casanga, las cuales han sido producto de estudios y caracterizaciones anteriores. Los objetivos planteados fueron:

1. Determinar la necesidad nutritiva de ocho leguminosas herbáceas nativas de Centro Loja y Valle de Casanga.
2. Establecer un ensayo de autenticación y eficiencia a nivel de invernadero para determinar cepas eficientes.

MATERIALES Y METODOS

Las leguminosas nativas, motivo de estudio corresponden a las zonas del: Valle de Casanga y Centro Loja, de los Cantones Paltas y Gonzanamá. La caracterización edafoclimática es de tipo subtropical seco, comprende altitudes de 841 a 2 250 msnm., con precipitaciones promedio anuales de 400 mm. en la parte baja y 750 mm. en la parte alta, la temperatura fluctúa de 19 a 29 °C. Presenta dos temporadas: lluviosa de enero a mayo y seca de junio a diciembre. La topografía es bastante irregular con pendientes que van del 18 al 70 %. La vegetación es xerofítica, con espacios de suelo desnudo y afloramientos rocosos debido a los altos procesos erosivos.

La investigación de autenticación y prueba de eficiencia de ocho especies de leguminosas bajo invernadero, se llevó a cabo en Catacocha a 1750 msnm, por ser el centro de estudio de la zona.

Se muestreó y colectó el suelo de los sitios de origen de las leguminosas, a una profundidad de 20 cm.; se separó una muestra de 500 g por especie para someterla al análisis químico de laboratorio y el resto se procesó como sustrato. Se colocó 1 kg de sustrato en cada macetero previamente desinfectado e identificado.

Frente a los bajos contenidos nutritivos de los suelos (sustratos), se preparó soluciones nutritivas minerales tendientes a suplir las deficiencias, mediante la formulación de soluciones madre, como se expresa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de soluciones nutritivas, Catacocha 2 008.

Nº	Sustancia nutritiva	Concentración	Cantidad para 1 litro
1	KH_2PO_4	1 M	136.1 g
2	K_2HPO_4	0.2 M	174.18 g
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 M	251.51 g
4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 M	236.15 g
5	$\text{Na}(\text{NO}_3)$	1 M	85.84 g
6	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		0.02 g
7	ZnCl_2		0.1 g
8	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.02 g
9	H_3BO_3		0.648 g
10	Cloruro férrico		5 mg
11	Molibdato de Sodio		0.04 g

Las soluciones nutritivas aplicadas por tratamiento fueron:

Solución A: 1+2+3+4+5+6+7+8. (Para aplicar al tratamiento nitrogenado)

Solución B: 1+2+3+6+7+8 (Para aplicar al testigo y al tratamiento inoculado)

Solución C: 9

Solución D: 10

Solución E: 11

} Para aplicar a todos los tratamientos (ensayo).

La semilla fue colectada en los sitios de origen de la planta madre. En el laboratorio de Fisiología Vegetal del AARNR de la UNL, se desinfectó y escarificó manualmente las semillas para proceder a su germinación.

En maceta con sustrato previamente humedecido con agua destilada, se hicieron dos hoyos colocando dos plántulas de leguminosas, transcurridos ocho días de la siembra se ralearon las plántulas menos vigorosas, dejando una planta por maceta.

Transcurridos seis días del trasplante se aplicaron 10 ml. de solución A al tratamiento nitrogenado y 10 ml de solución B a los tratamientos testigo e inoculado; las soluciones C y D, se aplicaron 2 ml. y de la solución E 3 ml. a todos los tratamientos. La frecuencia de aplicación fue dejando un día, hasta los 16 días posteriores al trasplante; luego se incrementó la dosis a 25 ml. de las soluciones A y B, con frecuencia de tres días, mientras de las soluciones C, D, se aplicaron 2 ml. y de la solución E 3 ml. Paralelamente se dieron riegos con agua destilada hasta capacidad de campo.

Para la inoculación se prepararon soluciones salinas que contengan las bacterias de las cepas correspondientes a cada especie (ocho), se tomó 12 ml de suspensión bacteriana y se introdujo paralelamente a la raíz principal, vertiendo 2 ml. de inóculo a cada planta/maceta, completando un total de 6 repeticiones por especie.

Luego de ocho semanas posteriores a la inoculación se evaluaron las leguminosas (floración, periodo en que la nodulación y la tasa de fijación del nitrógeno alcanzan niveles máximos), en este momento el contenido de nitrógeno esta correlacionado con el que la planta tendrá cuando llegue a su madurez.

Las variables registradas al momento de la cosecha fueron el peso fresco de la biomasa y de la raíz por separado; posteriormente se tomaron pesos secos, este peso constituye un parámetro indicativo de la efectividad de la fijación de nitrógeno (Erdwan y Jeans, 1952 citado por Borges 1975).

En laboratorio de Bromatología se molió la parte aérea de las plantas, se aireó al ambiente por 12 horas y se enviaron al laboratorio de foliares del SESA-Tumbaco, para la determinación de nitrógeno.

Las raíces se separaron cuidadosamente del suelo y se evaluaron mediante la metodología sugerida por el CIAT 1988; en donde se registraron parámetros de abundancia, color predominante, nodulación en la raíz principal y tamaño de nódulos.

El diseño aplicado en la presente investigación para cada una de las especies fue el de Diseño Completamente al Azar, con tres tratamientos y seis repeticiones.

Finalmente con apoyo del Dr. Carlos Rodríguez Genetista Molecular de la ESPOCH, se realizó la caracterización molecular de las cepas, los patrones de bandas obtenidos, fueron visualizados por electroforesis.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE LOS SITIOS DE COLECTA DE LAS LEGUMINOSAS

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de las características químicas de suelos, correspondientes a las ocho especies de leguminosas herbáceas (plantas madres) estudiadas.

Tabla 2. Características químicas de los suelos de Centro Loja y Valle de Casanga, cantones Paltas y Gonzanamá, provincia de Loja, 2008.

Especie /Análisis	<i>Desmodium molliculum</i>	<i>Mimosa albida</i>	<i>Aeschynomene brasiliana</i>	<i>Crotalaria sp.</i>	<i>Desmodium procumbens</i>	<i>Macroptilium sp.</i>	<i>Clitoria sp.</i>	<i>Mucuna sp.</i>
pH	5,61 L. Acido	6,5 Neutro	6,05 L. ácido	6,27 L. ácido	6,78 neutro	5,82 L. ácido	6,69 neutro	7,6 L. alcal
MO %	1,45 Medio	1,81 Medio	3,60 alto	4,41 alto	1,33 medio	2,55 alto	2,14 alto	2,67 alto
N total %	0,07 Bajo	0,09 Bajo	0,18 medio	0,22 medio	0,07 bajo	0,13 bajo	0,11 bajo	0,13 bajo
P ppm	9,8 Bajo	3,2 Bajo	5,5 bajo	8,0 bajo	3,2 bajo	3,2 bajo	16 medio	12,5 medio
K cmol/kg	0,20 medio	0,20 medio	0,15 bajo	0,20 medio	0,15 bajo	0,15 bajo	0,15 bajo	0,92 alto
Ca cmol/kg	12,5 Alto	15,3 Alto	11,3 alto	9,15 alto	10,95 alto	14,85 alto	10,7 alto	12,7 alto
Mg cmol/kg	2,38 Alto	32,51 Alto	5,51 alto	3,79 alto	51,85 alto	28,80 alto	6,09 alto	2,63 alto
Fe ppm	16 Bajo	7,7 Bajo	17,6 bajo	26 medio	6,4 bajo	10,8 bajo	11,7 bajo	18,1 bajo
Mn ppm	18,6 Alto	33,4 Alto	2,4 bajo	19,3 alto	2,3 bajo	14,3 medio	11,1 medio	3,5 bajo
Cu ppm	2 Medio	1,8 Medio	4 medio	3,3 medio	1,6 medio	1,6 medio	1,6 medio	2,7 medio
Zn ppm	1,3 Bajo	1,1 Bajo	1,3 bajo	1,5 bajo	2 bajo	2,3 bajo	1,3 bajo	1,6 bajo

Fuente: Laboratorios del SESA Tumbaco

La reacción de los suelos oscila entre 5,61 y 7,6 aptos para que ocurra el proceso de nodulación en leguminosas, la mayoría de las leguminosas no nodulan en pH bajo (ácido). El contenido de calcio es alto oscila entre 9,15 a 15,3 cmol/kg actuando sobre la proliferación de los rizobios y la infección de las leguminosas, el calcio modera el efecto tóxico del aluminio y magnesio.

El contenido de fósforo es bajo en seis casos oscila de 3,2 a 9,8 ppm., el potasio se mantiene en niveles de bajo 0,15 cmol/kg a medio (0,20 cmol/kg); las deficiencias de fósforo y potasio se manifiestan principalmente en reducción del crecimiento de las leguminosas, lo cual a su vez reduce la fijación de nitrógeno, porque incide afectando la formación de los nódulos. Estudios de campo realizados en Virginia EEUU citados por la FAO, 1985, mostraron que los incrementos en el número de nódulos fueron mayores cuando se aplicaron los nutrientes fósforo y potasio; estos resultados indican la importancia del balance nutricional. El contenido de nitrógeno es bajo, oscila del 0,07 % a 0,13 % característico de estos suelos; siendo necesario continuar con la búsqueda de alternativas para incrementar el contenido de este elemento en el suelo.

El contenido de hierro aprovechable de los suelos es bajo, oscila de 6,4 a 18,1 ppm., este elemento es importante porque la nitrogenasa, enzima fijadora de nitrógeno esta compuesta de hierro, sin

cantidades adecuadas de este elemento la fijación de nitrógeno no puede ocurrir. El hierro además, es un constituyente de la leghemoglobina del nódulo que protege a la nitrogenasa de la inactividad provocada por el oxígeno, a las leguminosas con deficiencias se aplicará quelatos de hierro a nivel foliar, para obtener una buena nodulación (FAO, 1985).

El contenido de zinc es bajo oscila de 1,1 a 2,3 ppm. El contenido de manganeso de bajo a medio (2,3 – 33,4 ppm). Estos dos elementos se requieren para el crecimiento del huésped; pero no afectan a la nodulación. El contenido de cobre es medio oscila de 1,6 – 4 ppm, su deficiencia resulta en el desarrollo de numerosos nódulos pequeños (FAO, 1985).

ANALISIS DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS

Contenido de nitrógeno de ocho especies de leguminosas nativas.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados del análisis foliar de los tres tratamientos analizados en el presente ensayo.

Tabla 3. Contenido de nitrógeno registrado en la parte aérea de ocho leguminosas en tres tratamientos, Catacocha 2008.

ESPECIES	% de nitrógeno de parte aérea		
	Inoculado	Nitrogenado	Testigo
<i>Desmodium molliculum</i>	2,82	2,99	3,17
<i>Mimosa albida</i>	3,06	2,87	2,99
<i>Aeschynomene brasiliana</i>	3,09	3,4	3,07
<i>Crotalaria sp.</i>	3,74	3,36	3,45
<i>Macroptilium sp.</i>	3,62	2,93	3,22
<i>Clitoria sp.</i>	4,05	2,7	2,82
<i>Desmodium procumbens</i>	3,80	3,92	3,80
<i>Mucuna sp.</i>	1,70	2,33	2,62

Fuente: Laboratorios SESA, Tumbaco 2008.

Los contenidos de nitrógeno en la parte aérea de las leguminosas son muy variables entre especies, y los valores entre tratamientos de una misma especie difieren notablemente, como se expresa en la **Figura 1**.

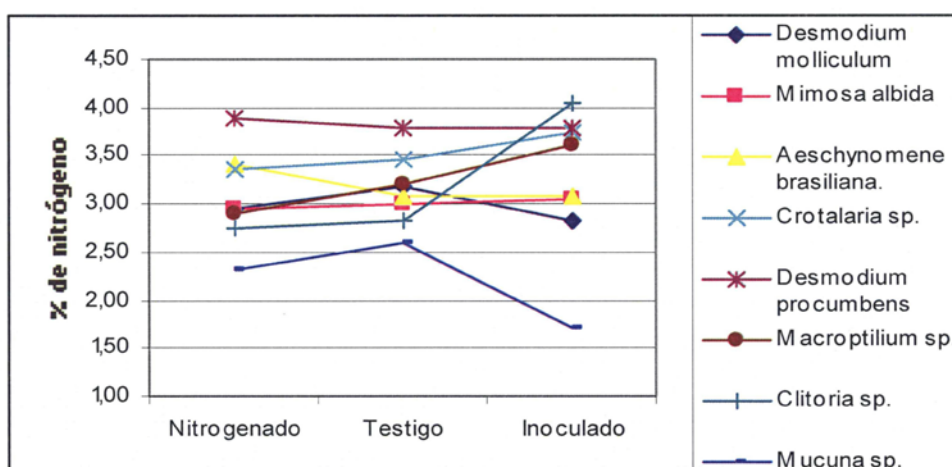


Figura 1. Contenido de nitrógeno de ocho especies de leguminosas sometidas a tres tratamientos, Catacocha 2008.

El interés de la presente investigación fue la respuesta de la inoculación de cepas, por lo que a continuación se analiza las especies que presentaron mayor contenido promedio de nitrógeno en el tratamiento inoculado, así: en *Clitoria* sp. el contenido de N es superior con 4,05% para el tratamiento inoculado frente al testigo con 2,82 %; seguido de *Crotalaria* sp. cuyo contenido de nitrógeno para el tratamiento inoculado es de 3,74 % frente al testigo de 3,45 %. En tercer lugar se apreció a *Macroptilium* sp. con contenidos de nitrógeno de 3,62 % para el tratamiento inoculado frente al testigo con 3,21 %; y el cuarto lugar corresponde a *Mimosa albida* con un contenido de nitrógeno para el tratamiento inoculado de 3,06 % frente al testigo de 3 %.

En *Aeschynomene brasiliana* el contenido de nitrógeno promedio para el tratamiento Inoculado es superior al testigo con 0,02 %, por lo que resulta interesante seguir trabajando con esta especie. *Desmodium molliculum*, *Desmodium procumbens* y *Mucuna* sp. no presentaron promedios favorables a la inoculación, más bien el tratamiento testigo resultó superior; por tanto no son eficientes.

Materia seca de la parte aérea

Tabla 4. Efecto de la inoculación y la aplicación de nitrógeno en la Biomasa (g) de la parte aérea de ocho especies de leguminosas silvestres de Centro Loja y Valle de Casanga.

Especie	Materia seca (g)		
	Inoculada	Nitrogenada	Testigo
<i>Desmodium molliculum</i>	0,49	1,27	0,07
<i>Mimosa albida</i>	0,77	1,11	0,79
<i>Aeschynomene brasiliana</i>	2,72	3,44	2,24
<i>Crotalaria</i> sp.	2,29	3,75	2,34
<i>Desmodium procumbens</i>	1,29	1,20	0,91
<i>Macroptilium</i> sp.	0,73	2,43	1,38
<i>Clitoria</i> sp.	0,53	2,01	0,24
<i>Mucuna</i> sp.	4,03	3,58	2,86

Fuente: Autores

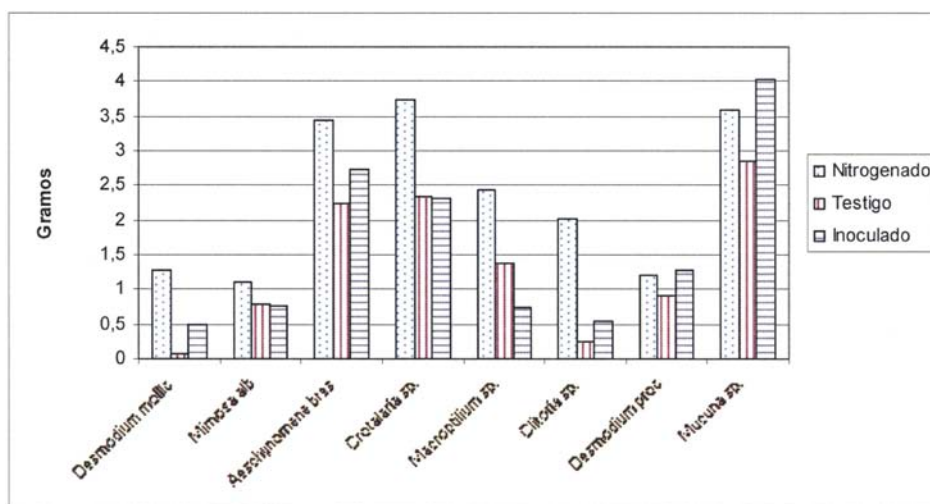


Figura 2. Promedios del peso seco de la parte aérea (g) de ocho leguminosas sometidas a prueba de eficiencia en invernadero, Catacocha 2008.

Las especies cuyos promedios de peso de materia seca de la parte aérea que sobresalieron en el tratamiento inoculado con respecto al testigo y al nitrogenado fueron: *Desmodium procumbens* y

Mucuna sp.; sin embargo estas especies sometidas al análisis estadístico no presentaron diferencias significativas.

Altura de plantas de ocho especies de leguminosas sometidas a prueba de eficiencia en invernadero

Tabla 5. Efecto de la inoculación y la aplicación de nitrógeno en la altura de la planta (cm.) de ocho especies de leguminosas de Centro Loja y Valle de Casanga, Catacocha 2008.

Especie	Altura de la planta (cm.)		
	Inoculada	Nitrogenada	Testigo
<i>Desmodium molliculum</i>	24,8	41,3	11,7
<i>Mimosa albida</i>	17,8	17,2	15,0
<i>Aeschynomene brasiliana</i>	39,8	33,5	33,7
<i>Crotalaria</i> sp.	22,2	27,7	23,3
<i>Desmodium procumbens</i>	13,3	15,3	10,0
<i>Macroptilium</i> sp.	41,0	64,2	68,2
<i>Clitoria</i> sp.	11,2	60,3	13,8
<i>Mucuna</i> sp.	55,7	44,2	41,3

Fuente: Autores

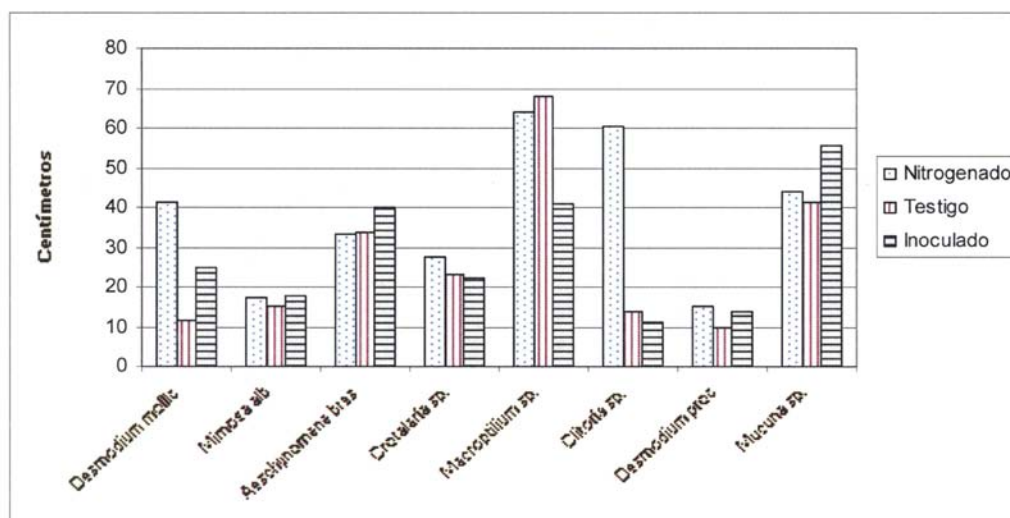


Figura 3. Promedios de altura (cm.) de ocho especies de leguminosas sometidas a prueba de eficiencia bajo invernadero, Catacocha 2008.

Los promedios de altura de ocho especies de leguminosas nativas durante el periodo experimental evidencian diferencias importantes entre los tratamientos; al analizar el tratamiento inoculado tres son las especies que superan al testigo: *Mimosa albida*, *Aeschynomene* sp. y *Mucuna* sp. Sin embargo el análisis estadístico en altura con el tratamiento inoculado fue significativo solamente para *Aeschynomene brasiliana*.

La respuesta de las leguminosas tropicales a la inoculación varían de un sitio a otro, pero las características del suelo no son determinantes en la relación de un inoculante, sino el genotipo de la leguminosa (Holliday, 1985)

Nodulación de las especies de leguminosas sometidas a prueba de eficiencia a nivel de invernadero

Del estudio de los nódulos realizado al momento de la cosecha se determinó lo siguiente:

La nodulación en *Desmodium molliculum*, presentó las siguientes características: la abundancia en el tratamiento testigo es mediana y en el inoculado es abundante. El tamaño que predomina en los tratamientos es pequeño, significando una característica intrínseca de la planta. La nodulación en la raíz principal en el tratamiento testigo e inoculado es regular. El color predominante en el T (testigo) e I (inoculado) es verde.

Mimosa albida presentó nódulos en el TT y TI abundantes y muy abundantes respectivamente. El tamaño predominante para el caso de testigo es pequeño y para inoculados es mediano. La nodulación en la raíz principal el testigo es nula y en el caso de inoculado es regular. El color predominante para el testigo es verde y en el inoculado es rojo.

En *Aeschynomene brasiliana* los nódulos se muestran abundantes en los tratamientos; el tamaño predominante es pequeño, la nodulación en la raíz principal para el testigo fue regular, mientras que para el TI fue predominante. El color sobresaliente en los tratamientos fue rojo.

En *Crotalaria* sp, la abundancia en los tratamientos va de mediana a abundante. El tamaño predominante es pequeño. La nodulación en la raíz principal para el testigo es nulo, mientras que en el tratamiento inoculado es regular. El color predominante en testigo es rojo- verde y el inoculado es rojo.

En *Desmodium procumbens* la abundancia presentada en el testigo y en el inoculado es abundante. El tamaño predominante es pequeño. La nodulación en la raíz principal en el testigo es regular y en Inoculado es predominante. El color predominante en el tratamiento testigo es blanco y en el Inoculado es rojo.

En *Macroptilium* sp., presenta abundancia en el tratamiento inoculado y en el testigo es muy abundante. El tamaño predominante en el testigo es pequeño y en el inoculado mediano. La nodulación en la raíz principal para el testigo y el inoculado es regular. El color predominante es rojo.

Clitoria sp. presentó abundancia mediana en el testigo, mientras que para el inoculado es abundante. El tamaño predominante de nódulos es pequeño, la nodulación en la raíz principal para el testigo es nula, mientras que para el inoculado es regular. El color predominante para el tratamiento testigo es verde y para el Inoculado es rojo.

En *Mucuna* sp., el registro de abundancia para los tratamientos es mediana. El tamaño predominante para testigo e inoculado es grande. La nodulación de la raíz principal en el testigo es nulo y para el inoculado es regular. El color predominante para el tratamiento testigo es blanco, y para el inoculado es rojo.

Caracterización molecular de cepas de *Rhizobium* spp. Los resultados del aislamiento de ADN genómico de ocho cepas de *Rhizobium* correspondiente a especies de leguminosas nativas se muestran en la figura 4; en donde claramente se puede observar la banda de ADN de alto peso molecular, en la parte inferior. Las cepas 01, 49, 58, 61, 62, 63, y 64 presentan bandas completamente definidas. Sin embargo, la integridad del ADN de las muestras 03 y 78 no es tan buena como las anteriores. En algunas muestras es posible observar la presencia de una gran cantidad de ARNr y ARNm, debido a que la extracción de ADN se realizó con cultivos que se encontraban en la fase de crecimiento exponencial o logarítmico. La presencia de estas moléculas no interferirá en análisis posteriores.

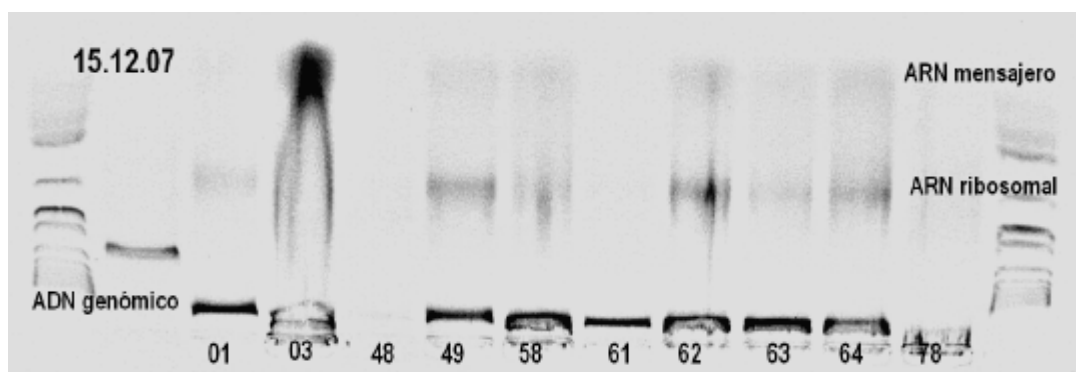


Figura 4. ADN genómico extraído de cepas de *Rhizobium sp.*

En las **Figuras 5, 6 y 7** se presentan las bandas obtenidas a partir de la aplicación de patrones “fingerprinting” a cada una de las cepas en estudio.

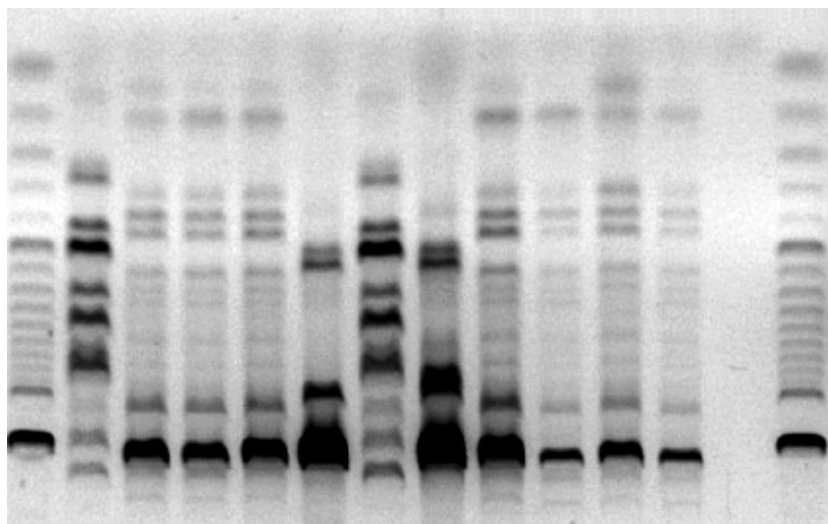


Figura 5. Patrones de bandas visualizados por electroforesis para ERIC-PCR.

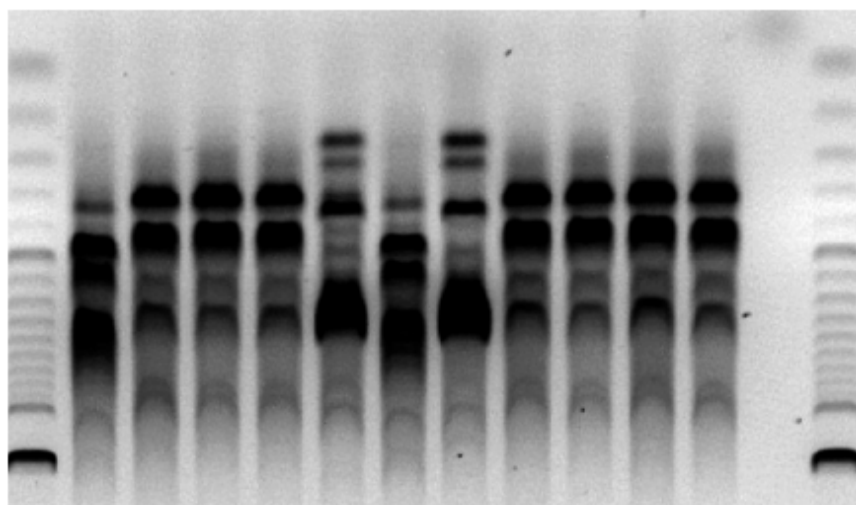


Figura 6. Patrones de bandas visualizados por electroforesis para ERIC-PCR.

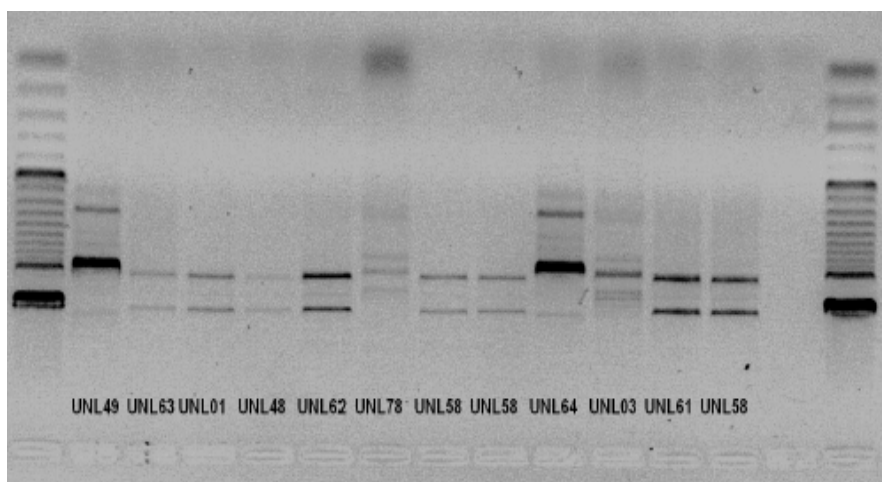


Figura 7. Patrones de bandas visualizados por electroforesis para ERIC-PCR.

En la figura 8, claramente se puede observar tres grupos bien diferenciados. El primer grupo está formado por las cepas UNL049 y UNL064, las mismas que comparten una similitud del 95%. El segundo grupo, que corresponde a las cepas UNL063, UNL058, UNL061, UNL001, UNL062 y UNL048, muestran una similitud mayor al 98%. Finalmente, el último grupo corresponde a las cepas UNL078 y UNL003, agrupadas con una similitud del 83%. Es muy probable que cada uno de los grupos encontrados, correspondan a especies bacterianas determinadas. La asignación de cada uno de éstos grupos a una determinada especie del género *Rhizobium*, deberá ser comprobada posteriormente mediante secuenciamiento del gen del ARN ribosomal 16S.

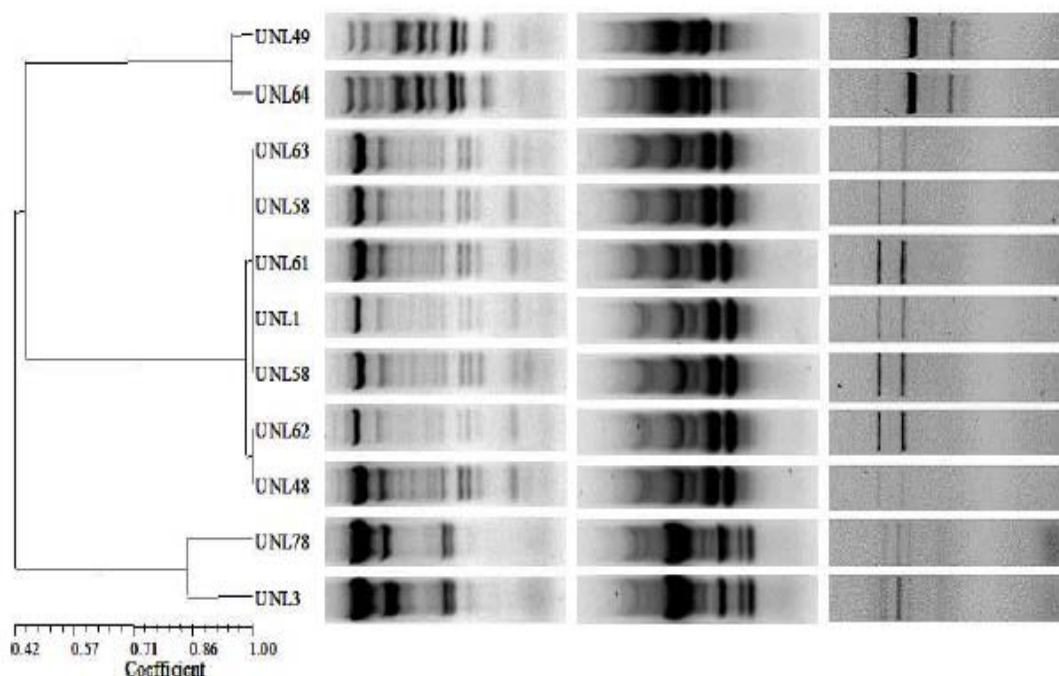


Figura 8. Dendrograma basado en los patrones de fingerprinting de ERIC, BOX y REP-PCR, que muestran la similitud de cepas del género *Rhizobium*.

CONCLUSIONES

- El contenido de las formas aprovechables de macronutrientes de los suelos (sustratos) fue bajo; mientras que el contenido de micronutrientes va de medio a bajo.
- En el contenido promedio de nitrógeno de la parte aérea las leguminosas sometidas al tratamiento inoculado que presentaron valores superiores fueron: *Clitoria* sp 4,05%, *Crotalaria* sp 3,74%, *Macroptilium* sp 3,62%; frente al testigo de 2,84%, 3,45% y 3,21% respectivamente.
- De las especies señaladas anteriormente y contrastadas con el Índice de Efectividad de Inoculación las que respondieron fueron: *Crotalaria* sp., *Macroptilium* sp. y *Clitoria* sp.
- El contenido de nitrógeno de la parte aérea en el tratamiento inoculado, resultó significativo estadísticamente en *Macroptilium* sp.
- La biomasa de la parte aérea resultó altamente significativo en el tratamiento nitrogenado, en las siguientes especies: *Desmodium molliculum*, *Aeschynomene brasiliniana*, *Crotalaria* sp., *Macroptilium* sp. y *Clitoria* sp.
- La altura de la planta resultó altamente significativa para el tratamiento nitrogenado en las especies: *Desmodium molliculum*, *Desmodium procumbens* y *Clitoria* sp; y significativa en el tratamiento inoculado en *Aeschynomene brasiliniana*, mientras que en el tratamiento testigo fue para *Macroptilium* sp.
- El *Rhizobium* inoculado varió en su efectividad siendo la cepa UNL063 inoculada en *Macroptilium* sp. la que concentró el mayor contenido de nitrógeno en la parte aérea.
- Los nódulos evaluados en abundancia, tamaño, nodulación en la raíz principal y color en el tratamiento inoculado, resaltaron en su orden: *Mimosa albida*, *Macroptilium* sp., *Clitoria* sp., *Crotalaria* sp. y *Aeschynomene brasiliana*. El color en todas estas especies fue rojo, lo que indicó la presencia de leghemoglobina activa, síntoma de fijación biológica.
- La caracterización molecular reflejó la existencia de tres grupos de cepas bien diferenciados, el primero conformado por la UNL064 *Clitoria* sp. con similitud de 95 %, el segundo por UNL001 *Desmodium molliculum*, UNL058 *Aeschynomene brasiliniana*, UNL061 *Crotalaria* sp., UNL062 *Desmodium procumbens* y UNL063 *Macroptilium* sp. muestran similitud mayor al 98 %; y un tercer grupo donde se ubica UNL078 *Mucuna* sp y UNL003 *Mimosa albida* agrupadas con similitud del 83 %.
- Con las especies de leguminosas silvestres que resultaron eficientes: *Crotalaria* sp., *Macroptilium* sp. y *Clitoria* sp., continuar investigando a nivel de laboratorio, invernadero y campo; para determinar los aportes de nitrógeno a los suelos de las zonas secas.
- Las leguminosas asociadas a rizobios nativos y probadas en el ensayo de autenticación seguirlas asociando en los sistemas de producción de las zonas secas.
- Profundizar estudios de cepas eficientes por especie de leguminosa, en diversas localidades de la provincia de Loja, con la finalidad de determinar la más apta para formulación de inoculantes.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado A., J. Iglesias y O. Guell. 2005. Análisis multielemental de material foliar por medio de ICP-MS. Revista Agronomía Costarricense. 29: 1. 17-28 p.
- Bernal, G. 2006. La fijación biológica de nitrógeno: componente clave de la fertilidad de los suelos y el rendimiento de cultivos en el Ecuador. 1 ed. Quito – Ecuador. 145 p.
- Borges, D. 1975. Aislamiento, Autenticación y efectividad de dos cepas de dos cepas de *Rhizobium* de frijol (*Vigna sinensis* L.). Informe técnico. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 33 p.
- Cadavil, L. 1995. Utilización de abonos verdes en suelos dedicados a la siembra de yuca. Centro Internacional de Agricultura tropical. CIAT. Cali-Colombia. 17 p.
- Díaz, G., y K. Estupiñán. 2004. La mucuna como cultivo de cobertura alternado con el maíz. Boletín divulgativo N° 03.. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Los Ríos – Ecuador. 20 p.
- CIAT. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio; Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. 1 ed. Cali – Colombia. 178 p.
- Cunachi, A. 2006. Autenticación y eficiencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovariedades *viceae* y *trifolii* y de *Rhizobium meliloti*. Tesis Ing. Agrónoma. ESPOCH. Riobamba - Ecuador. 46 p.
- FAO - ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. 1985. Manual Técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. (*Rhizobium*-Leguminosa). Italia. 61 p.
- García, M., E. Treto, y M. Alvarez. 2000. Los abonos verdes: una alternativa para la economía del nitrógeno en el cultivo de la papa. Estudio comparativo de diferentes especies. Revista Cultivos tropicales 21 (1). La Habana Cuba. 5 – 11 p.
- Garassini, L.A. 1967. Microbiología Agraria. Edit. Universidad Central de Venezuela. Maracay-Venezuela. 200-220 p.
- Graham, P. 1999. www.rhizobium.umn.edu
- Guamán, F., y M. Yaguana. 2007. Caracterización morfofisiológica de bacterias fijadoras de N₂ en leguminosas herbáceas nativas de Centro Loja y Valle de Casanga. Edit. Universitaria-UNL. Loja – Ecuador. 28 p.
- Holliday, J. 1985. La fijación biológica de nitrógeno como una agrotecnología transferible en el trópico. Memorias de la X Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Maracay-Venezuela. 6 p.
- Jerez, M. 2004. Caracterización fenotípica y genética de cepas de *Bradyrhizobium* spp. en el cultivo de maní y evaluación de eficiencia simbiótica para la producción de inoculantes. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Central. Quito- Ecuador. 127 p.
- Marcano, Lisbeth; *et al.* 2001. Fijación biológica de N₂ por *Pachecoa venezualensis* en dos suelos de sabana

- Mendez, N., y R. Jesús. 2002. Relación entre el peso seco total y los caracteres vegetativos y la nodulación de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.). Revista UDO Agrícola. Departamento de agronomía, Universidad de Oriente, Maturín. Venezuela. 46 – 53 p.
- Somasegaran, P., H. Hoben, y J. Halliday. 1981. Ejercicios prácticos en tecnología *Rhizobium* – Leguminosa. Trad. al español por Cuautle Evangelina. Chapingo – México. 87 p.
- Soria, N. 2008. Nutrición foliar y defensa natural de las plantas. XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Memorias de conferencias magistrales. Quito. 11 p.
- Temprano, F. 2006. Evaluación de la capacidad simbiótica de aislamientos de *Sonorhizobium medicae* procedentes de suelos de la Dehesa Andaluza y Extremeña con *Medicago polymorpha*. Revista recursos silvopastoriles. 95-100 p.
- Zwart, M., *et al.* 2005. Coberturas y la salud del suelo. Revista EARTH, Tierra Tropical. 1 (1): 9-20. Las Mercedes del Guácimo – Costa Rica.