

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA "LA MOLINA"

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO ACADEMICO DE BIOLOGIA



"Aislamiento de Rhizobium de Diferentes
Variedades (*Phaseolus lunatus*) y *Estudios*
de su Eficiencia en la Productividad de la
Leguminosa"

TESIS PRESENTADA POR:

GISELLA LILIANA MATOS CUZCANO

PARA OPTAR EL TITULO DE

BIOLOGO

LIMA - PERU

- 1994 -

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	REVISION DE LITERATURA	4
2.1	El cultivo de Pallar	4
2.1.1	Distribución Geográfica del pallar	4
2.1.2	Origen y dispersión de la planta	6
2.1.3	Clasificación taxonómica del pallar	11
2.1.4	Descripción botánica del pallar	12
2.1.5	Requerimiento fisiológico	15
2.1.6	Principales variedades cultivadas en el Perú	20
	a). Criollo Iqueño	20
	b). Sol de Ica	21
2.2.	Fijación de Nitrógeno	21
2.2.1	Sistemas no simbióticos de la fijación del Nitrógeno	22
2.2.2	Sistemas simbióticos de fijación del Nitrógeno	22
2.2.3	Clasificación del Rhizobium	24
2.2.4	Establecimiento de la Simbiosis	27
	a). Pre infección	28
	b). Infección y formación del nódulo.	29
2.2.5	Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno	34
2.2.6	Caracterización que deben poseer una cepa eficiente	37
2.2.7	Factores que influyen en la fijación del Nitrógeno	41
	a). El Oxígeno	42
	b). Dióxido de carbono	43
	c). El pH del Suelo	44
	d). Temperatura	44
	e). Humedad	45
	f). Salinidad	45
	g). Escasez	46
	h). Nitrógeno combinado	47
	i). Oligeolementos	47
	. Molibdeno	47
	. Cobalto	48
	. Boro	48
2.3	Inoculantes	48
2.3.1	Producción de inoculante.	49
2.3.2	Control de calidad del inoculante	50

III. MATERIALES Y METODOS	53
3.1 Recolección de nódulos de Rhizobium en Phaseolus lunatus	53
3.2 Aislamiento de nódulos de Rhizobium	53
3.3 Purificación de las cepas	56
3.3.1 Coloración Gram	59
3.3.2 Siembra en el medio Peptona-Glucosa con el indicador Purpura de Bromocresol (PGPBC)	59
3.3.3 Siembra en el medio levadura lactosa AGAR (LLA)	59
3.4 Caracterización cultural de las cepas de Rhizobium	60
3.5 Características Bioquímica y Fisiológica de las cepas de Rhizobium	60
3.5.1 Crecimiento a diferentes niveles de pH	60
3.5.2 Crecimiento a varias temperaturas	60
3.5.3 Tolerancia a niveles de NaCl	61
3.5.4 Producción de acidez en LMA más azul de Bromotimol al 0.53%	61
3.6 Autenticación	61
3.6.1 Desinfección de semillas	62
3.6.2 Germinación de las semillas	62
3.6.3 Trasplante de semillas a tubos con el medio Sandman	64
3.6.4 Preparación del inóculo	64
3.6.5 Inoculación de las plántulas	67
3.6.6 Evaluación	67
3.7 Selección de Cepas Eficientes a Nivel de Laboratorio	67
3.7.1 Evaluación de las plantas	68
3.7.2 Criterios de Evaluación Simbiótica	69
a). Efectividad	69
b). Peso seco de la parte aérea	70
c). Diferencia de crecimiento	70
d). Número de filiolos	70
e). Infectividad	70
f). Número de nódulos	71
g). Peso seco de los nódulos	71
3.8 Selección de Cepas a Nivel de Invernadero	71
3.8.1 Preparación del suelo	71
3.8.2 Siembra y raleo de las macetas	72
3.8.3 Preparación del inóculo	72
3.8.4 Inoculación de las macetas	73
3.8.5 Evaluación	73
a). En la inoculación	73
b). A la floración	73

3.8.6	Criterios de Evaluación simbiótica	73
	a). Efectividad	74
	b). Tamaño de planta	75
	c). Peso seco de la parte aérea	75
	d). Número de folíolos	75
	e). Infectividad	
3.9	Selección de sustratos para la supervivencia del Rhizobium	76
3.9.1	Preparación del soporte	76
3.9.2	Preparación del inóculo	77
3.9.3	Preparación del inoculante	77
3.9.4	Evaluación de la viabilidad del Rhizobium en los inoculantes	78
3.9.5	Evaluación de la población de bacterias mesófilas totales	79
3.9.6	Evaluación de la población de hongos y levaduras totales	80
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	81
4.1	Recolección de Nódulos y aislamiento de Rhizobium obtenidos de plantas de pallar (<i>Phaseolus lunatus</i>), purificación y caracterización cultural	81
4.2	Características Bioquímicas y Fisiológicas de las cepas de Rhizobium	87
4.3	Autenticación	97
4.4	Selección de cepas eficientes a nivel de Laboratorio	100
	4.4.1 Peso Seco (Efectividad)	100
	4.4.2 Diferencia de crecimiento	105
	4.4.3 Infectividad	113
4.5	Selección de Cepas a nivel de invernadero	134
	4.5.1 Peso Seco y determinación de Nitrógeno	134
	4.5.2 Tamaño de Planta	138
	4.5.3 Infectividad	142
4.6	Viabilidad del Rhizobium en los inoculantes	148
	4.6.1 Calidad Microbiológica del inoculante	153
V.	CONCLUSIONES	161
VI.	RESUMEN	163
VII.	BIBLIOGRAFIA	165
VIII.	APENDICES	188

INDICE DE CUADROS

1.	Lugar de Recolección de los Nódulos de Rhizobium y Phaseolus lunatus , número de muestreo número de cepas obtenido y codificación de las Cepas después de los pruebas de pureza.	83
2.	Caracterización de las colonias de Rhizobium aislada de los nódulos de Phaseolus lunatus a los 3 días de inoculación (Cepas de crecimiento rápido) y 7 días (cepas de crecimiento lento) a 28°C.	88
3.	Caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas nativas de Rhizobium y Bradyrhizobium .	91
4.	Porcentaje de germinación de las semillas de pajar al ser sometidos a diferentes concentraciones del desinfectante y a diferentes tiempos de exposición.	98
5.	Peso seco a nivel de laboratorio ANCOVA en experimentos factoriales para evaluar significancia entre los factores.	102
6.	Evaluación de la efectividad de las cepas en estudio mediante el criterio de Lalonde y col. y por la prueba t; en la variedad Criollo - Iqueño.	102
7.	Evaluación de la efectividad de las cepas en estudio mediante el criterio de Lalonde y col. y por la variedad Ica- 450.	103
8.	Tamaño de planta a nivel de Laboratorio, se evaluó mediante un análisis de covariancia en experimentos factoriales.	109
9.	Tamaño de planta. Evaluación de los medios de los tratamientos mediante prueba t.	109
10.	Número de nódulos a nivel de Laboratorio. Evaluación de la infectividad mediante el criterio de Lalonde y col. y una prueba no paramétrica para la variedad Criollo - Iqueño.	116
11.	Número de nódulos a nivel de Laboratorio, evaluación de la infectividad mediante el criterio de Lalonde y col., y una prueba no paramétrica para la variedad Ica-450.	116
12.	Peso seco a nivel de invernadero. Análisis de variancia para evaluar significancia en los factores estudiados.	135

13. Evaluación de la efectividad de las cepas en estudio mediante la prueba t, y la determinación del índice de efectividad del inoculante (IEI) comparándolo con el índice de rendimiento del nitrógeno (IRN) en la variedad Criollo -Iqueño. 136
14. Evaluación de la efectividad de las cepas en estudios mediante la prueba t, y la determinación del índice de efectividad del inoculante de rendimiento del Nitrógeno (IRN) en la variedad Ica- 450. 139
15. Tamaño de planta a nivel de invernadero. Análisis de variancia para evaluar significancia en los factores estudiados 139
16. Evaluación de las medias de los tratamientos mediante la prueba t, para la variedades Criollo-Iqueño. 143
17. Evaluación de las medias de los tratamientos mediante la prueba t, para la variedad Ica- 450. 143
18. Evaluación de la infectividad según el criterio de Lalonde y col. (1990) comparándole con la prueba t, para la variedad Criollo-Iqueño. 147
19. Evaluación de la infectividad según el criterio de Lalonde y col, (1990) comparándole con la prueba t, para la variedad Ica-450. 147
20. Viabilidad de las cepas de *Rhizobium* en cuatro inoculantes almacenados en la refrigeración 4°C durante 6 meses. 151
21. Determinación de la calidad microbiológica del inoculante mediante el recuento de bacterias mesófilas totales de los inoculantes almacenados en refrigeración. 155
22. Determinación de la calidad microbiológica de los inoculantes mediante el recuento de hongos y levaduras en los inoculantes almacenados en refrigeración. 155

INDICE DE FOTOS

- 1.- Plántulas de pallar (**Phaseolus lunatus**) en las variedades Criollo Iqueño e I-450 24 horas después de haberse transplantado en el Medio Sadman en agar inclinado. 85

- 2.- Prueba de Pureza. Reacción positiva y negativa al ser sembrada en el medio Peptona-Glucosa utilizando como indicador Purpura de Bromocresol. **Rhizobium** dá reacción negativa. 86

- 3.- Prueba de Pureza. Diferenciación del **Rhizobium** con el género **Agrobacterium**, pues este género presenta la enzima Ketolactasa y por lo tanto da reacción positiva. 93

- 4.- Crecimiento a diferentes niveles de NaCl. La cepa en estudio soporta una salinidad de hasta el 1 % de NaCl. 95

- 5.- Producción de acidez. Las cepas de textura cremosa y apariencia seca (Grupo II) acidifican el medio (Izquierda), mientras que las cepas de textura elástica (Grupo I) lo alcalinizan (Derecha). 106

- 6.- Efectividad. Comportamiento de las cepas vs. los controles (extremos) en la variedad Ica-450. 118

- 7.- Infectividad. Comparación de una planta inoculada con la cepa (PLL113) con el control sin inoculante en la variedad Criollo Iqueño, a los siete días después de la inoculación. 119

- 8.- Infectividad. Distribución y color de los nódulos de la cepa PLC213 en la variedad Criollo Iqueño a los 39 días después de la inoculación. 120

- 9.- Infectividad. Nódulos de la cepa PLC213 en la variedad Ica-450. 121

- 10.- Especificidad. Preferencia de la cepa inoculada PLB211b por la variedad Criollo Iqueño. 123

- 11.- Infectividad. Color y distribución de los nódulos de la cepa PLA142a en la variedad Criollo Iqueño. 140
- 12.- Invernadero. Ensayo de selección de cepas en la variedad Criollo Iqueño a los 30 días de haber sido inoculado. 141
- 13.- Invernadero. Ensayo de selección de cepas en la variedad Ica-450 a los 30 días de haber sido inoculado. 149
- 14.- Evaluación de la población de **Rhizobium** presente en el Inoculante. Cepa PLL113. 150
- 15.- Evaluación de la población de **Rhizobium** presente en el inoculante. Cepa PLC213.