



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-
MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus cajan*) BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS**

Autor: Douglas Daniel Osorio Menéndez

Tutor: Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire MSc

Guayaquil, octubre 2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Vicente Osorio y Maritza Menéndez por su apoyo incondicional, encontrar en ellos los consejeros y guías para encaminarme a ser una persona de bien y luchar por mis metas frente a las adversidades.

A mi abuela, que en paz descanse que siempre estuvo presente brindándome su apoyo moral y emocional a pesar de sus enfermedades.

A mis hermanos, por siempre estar junto a mí y encontrar en ellos más que hermandad y ser mis mejores amigos, estando siempre en las buenas y las malas.

A mi hijo Logan, que fue el motivo de seguir adelante y las ganas de querer mejorar y seguir haciéndolo para darle un mejor futuro.

A todos los que me ayudaron a continuar con mi sueño y depositaron su confianza en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al personal técnico del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por haber compartido sus conocimientos y ayudarme a mejorar en el ámbito personal como profesional para poder desarrollar este trabajo de investigación eficazmente, a la Doctora Daynet por abrirme las puertas en este prestigioso centro de investigación y brindarme la oportunidad de adquirir conocimientos indispensables en mi carrera como profesional.

Al Doctor. Milton Barcos, por ser una fuente de inspiración para mí y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de investigación, al Ing. Rodrigo Oviedo por guiarme en todo el proceso de desarrollo de mi proyecto, siendo el principal colaborador durante todo este proceso, quien, con su dirección, conocimiento, enseñanza permitió el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, agradezco a los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Guayaquil, quienes han contribuido a mi formación profesional.

Qf. Martha Mora Gutiérrez, MSc
DECANA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación “ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus cajan*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS” del estudiante Osorio Menéndez Douglas Daniel, indicando que ha (n) cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación. Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, CERTIFICO, para los fines pertinentes, que el estudiante está apto para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire MSc.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN
C.I. 0908084320



Presidencia
de la República
del Ecuador



Plan Nacional
de Ciencia, Tecnología,
Innovación y Saberes



SENESCYT
Secretaría Nacional de Educación Superior,
Ciencia, Tecnología e Innovación

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN

TÍTULO Y SUBTÍTULO:	"ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i> -MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (<i>Cajanus cajan</i>) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS."		
AUTOR(ES) (apellidos/nombres):	DOUGLAS DANIEL OSORIO MENÉNDEZ		
REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres):	REVISOR: ING AGR. VALERIANO BUSTAMANTE, MSc TUTOR: ING AGR. EISON VALDIVIEZO FREIRE, MSc		
INSTITUCIÓN:	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
UNIDAD/FACULTAD:	CIENCIAS AGRARIAS		
MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:			
GRADO OBTENIDO:	INGENIERO AGRÓNOMO		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	2019	No. DE PÁGINAS:	49
ÁREAS TEMÁTICAS:	MICROBIOLOGIA, BIOTECNOLOGIA		
PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:	Función de <i>Rhizobium</i> con las Micorrizas, fijación del nitrógeno, fijación del fósforo, micorrizas en nódulos		
RESUMEN/ABSTRACT (150-250 palabras): El texto presente explica el trabajo que se lleva a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), que tuvo como objetivo observar la interacción de la bacteria <i>Rhizobium</i> con las Micorrizas en la simbiosis conjunto en <i>Cajanus cajan</i> , mediante el aislamiento e inoculación de <i>Rhizobium</i> , en condiciones de laboratorio e invernadero y la inoculación de un consorcio de micorrizas del banco del (CIBE), un diseño completamente al azar con arreglo factorial, mediante los análisis de varianza y los datos registrados se pudo comprobar la simbiosis <i>Rhizobium</i> -Micorriza en las variables agronómicas externamente e internamente a nivel de laboratorio de la especie <i>Cajanus Cajan</i> . Se observó un desarrollo eficaz en los tratamientos que estuvieron inoculados con los dos microorganismos los cuales al estar en simbiosis ayudo a mejorar la fijación y asimilación de nutrientes en la planta.			
ADJUNTO PDF:	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
CONTACTO CON AUTOR/ES:	Teléfono: 0979072858	E-mail: Daniel-osorio-menendez@hotmail.es	
CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Ing. Agr. Eison valdiviezo Freire		
	Teléfono: (042) 288040		
	E-mail: fca@ug.edu.ec		

CERTIFICADO DEL DOCENTE REVISOR

Habiendo sido nombrado Valeriano Bustamante García, revisor del trabajo de titulación “ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus cajan*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.” certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por Douglas Daniel Osorio Menéndez, con C.I. No. 0930897756, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de Ingeniera Agrónoma , en la Carrera Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

Atentamente,

Ing. Agr. Valeriano Bustamante García, MSc
DOCENTE REVISOR
No. C.I. 1200694030

**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO
NO COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS**

Yo Douglas Daniel Osorio Menéndez, con C.I. 0930897756, certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es **“ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus cajan*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.”** son de mi absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente

Douglas Daniel Osorio Menéndez

C.I. No.0930897756

*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic./2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.

Declaración Expresa

Manifiesto que la presente investigación es original y fue desarrollada para obtener el pre-grado de Ingeniero Agronomo. La responsabilidad del contenido de este trabajo me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE-ESPOL.

ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-MICORRIZAS EN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus cajan*) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Autor: Douglas Daniel Osorio Menéndez

Tutor: Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire MSc.

Resumen

El texto presente explica el trabajo que se lleva a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), que tuvo como objetivo observar la interacción de la bacteria *Rhizobium* con las *Micorrizas* en la simbiosis conjunta en *Cajanus cajan*, mediante el aislamiento e inoculación de *Rhizobium*, en condiciones de laboratorio e invernadero y la inoculación de un consorcio de micorrizas del banco del (CIBE), utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial, mediante los análisis de varianza y los datos registrados se pudo comprobar la simbiosis *Rhizobium*-Micorriza en las variables agronómicas externamente e internamente a nivel de laboratorio de la especie *Cajanus cajan*. Se observó un desarrollo eficaz en los tratamientos que estuvieron inoculados con los dos microorganismos los cuales al estar en simbiosis ayudo a mejorar la fijación y asimilación de nutrientes en la planta.

Palabras claves: Función de *Rhizobium* con las *Micorrizas*, fijación del nitrógeno, fijación del fósforo, micorrizas en nódulos.

ESTABLISHMENT OF SYMBIOSIS *Rhizobium*-MICORRIZAS IN FRÉJOL DE PALO (*Cajanus Cajan*) UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Author: Douglas Daniel Osorio Menéndez

Advisor: Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire MSc

Abstract

The present text explains the work carried out at the Biotechnological Research Center of Ecuador (CIBE), which aimed to observe the interaction of *Rhizobium* bacteria with mycorrhizae in the joint symbiosis in *Cajanus Cajan*, through isolation and inoculation of *Rhizobium*, in laboratory and greenhouse conditions and the inoculation of a mycorrhiza consortium of the bank of the (CIBE), using completely random with factorial arrangement design, by means of the analysis of variance and the recorded data it was possible to verify the *Rhizobium*-Mycorrhiza symbiosis in the agronomic variables externally and internally at the laboratory level of the *Cajanus Cajan* species. An effective development was observed in the treatments that were inoculated with the two microorganisms which, being in symbiosis, helped improve the fixation and assimilation of nutrients in the plant.

Key words: Function of *Rhizobium* with Mycorrhizae, nitrogen fixation, phosphorus fixation, mycorrhizae in nodules.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. <i>Objetivos Generales</i>	4
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. LA AGRICULTURA Y USOS DE MICROORGANISMOS	5
2.2. BIOFERTILIZANTES	6
2.3. MICROORGANISMO.....	6
2.4. BACTERIAS QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO MICROBIANO	7
2.5. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO.....	8
2.6. BACTERIAS SOLUBILIZADORES DE FÓSFOROS.....	9
2.7. MICROORGANISMO COMO BENEFICIO PARA LA AGRICULTURA.....	10
2.8. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	12
2.9. RHIZOBIUM.....	13
2.10. CLASIFICACIÓN DEL <i>RHIZOBIUM</i>	14
2.11. LEGUMINOSAS	14
2.12. GÉNEROS Y ESPECIES DE LAS LEGUMINOSAS.....	15
2.13. ASOCIACIONES RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS	16
2.14. NÓDULOS DE <i>RHIZOBIUM</i>	17
2.15. TIPOS DE NÓDULOS	18
2.16. MICORRIZAS ARBUSCULAR	18
III. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1. ÁREA Y DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	20
3.2. FACTORES ESTUDIADOS	21
3.3. TRATAMIENTOS.....	21
3.4. FASES EXPERIMENTALES	21
3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	22
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22

3.7.	METODOLOGÍA PARA RECOLECCIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE NÓDULOS	22
3.7.1.	<i>Obtención de material vegetativo</i>	22
3.7.2.	<i>Recolección de nódulos de Cajanus cajan</i>	22
3.7.3.	<i>Hidratación y limpieza de nódulos</i>	24
3.7.4.	<i>Esterilización superficial de nódulos</i>	24
3.8.	METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO DE <i>RHIZOBIUM</i>	25
3.8.1.	<i>Aislamiento de Rhizobium</i>	25
3.8.2.	<i>Siembra de Rhizobium</i>	26
3.8.3.	<i>Purificación y selección de cepas</i>	27
3.9.	METODOLOGÍAS DE PRUEBAS DE INFECTIVIDAD DE <i>RHIZOBIUM</i>	28
3.9.1.	<i>Preparación de Tinción de Gram</i>	28
3.9.2.	<i>Crecimiento de Cepas en medio líquido</i>	28
3.9.3.	<i>Preparación de jarras de Leonard modificadas</i>	29
3.10.	MÉTODO ESPECÍFICO PARA MANEJO DE EXPERIMENTO	31
3.10.1.	<i>Esterilización de arena de río</i>	31
3.10.2.	<i>Semillero con micorrizas</i>	31
3.10.3.	<i>Preparación de sustrato para experimento</i>	32
3.10.4.	<i>Trasplante e inoculación de Rhizobium-Micorriza</i>	32
3.11.	Hipótesis.....	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
4.1.	PARÁMETROS AGRONÓMICOS DE LA INTERACCIÓN <i>RHIZOBIUM-MICORRIZA</i> 33	
4.1.1.	<i>Crecimiento</i>	34
4.1.2.	<i>Biomasa Total generada por plantas de frejol de palo inoculadas con Rhizobium-Micorriza en tratamientos de SD y ST</i>	36
4.2.	PROMEDIO DE MICORRIZACION EN RAÍCES DE <i>CAJANUS CAJAN</i>	37
4.3.	POBLACIÓN MICORRICICA.....	39
4.4.	NUMERO DE NÓDULOS.....	40
4.5.	SIMBIOSIS <i>RHIZOBIUM-MICORRIZA</i>	42
4.6.	CONTEO DE ESPORAS DE (HMA) DENTRO DE NÓDULOS	42
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
4.7.	CONCLUSIONES.....	45
4.8.	RECOMENDACIONES	46

ÍNDICE DE CUADROS DEL TEXTO

Cuadro 1. Tratamientos con prueba de dos tipos de solución nutritiva. estudiados.	21
Cuadro 2. Variables agronómicas evaluadas de la interacción <i>Rhizobium</i> -Micorriza a la onceava semana.....	33
Cuadro 3. Micorrización evaluadas en raíces y suelo.....	37
Cuadro 4. Numero de nódulos y micorrización evaluadas dentro de nódulos.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS DEL TEXTO

Figura 1. Croquis de zona de estudio.....	20
Figura 2. Nódulos recolectados de raíces de <i>Cajanus cajan</i>	23
Figura 3. Trituración de nódulos. CIBE,	25
Figura 4. Siembra de nódulos triturados.....	26
Figura 5. Aislamiento de <i>Rhizobium</i> , purificación de cepa, multiplicación	27
Figura 6. Medios líquidos inoculados con <i>Rhizobium</i>	29
Figura 7. Jarras de Leonard, nódulos obtenidos de las jarras.....	30
Figura 8. Concentración de clorofila de <i>Cajanus cajan</i> en simbiosis de <i>Rhizobium</i> -Micorriza en 11 semanas.....	34
Figura 9. Diferencias en crecimiento en tratamientos de SD y ST.	35
Figura 10. Longitud de plantas de frejol de palo con dos soluciones nutritivas en simbiosis de <i>Rhizobium</i> -Micorriza de 11 semanas.....	35

Figura 11. Biomasa total obtenida para ver el desarrollo general de <i>Cajanus cajan</i>	36
Figura 12. Porcentaje de micorrización en raíces de frejol de palo en simbiosis con <i>Rhizobium</i> en 11 semanas (tabla7)	38
Figura 13. Estructuras infectivas de los HMA observadas a las 11 semanas experimentación con lente 40x en plantas de frejol de palo.....	38
Figura 14. Numero de esporas de HMA en 100g de suelo de cada tratamiento.	39
Figura 15. Promedio de numero de nódulos obtenidos de la onceava semana de cada tratamiento(tabla9).....	41
Figura 16. Nódulos removidos de sustrato para conteo.....	41
Figura 17. Vesículas de micorrizas dentro de nódulos de <i>Rhizobium</i>	42
Figura 18. Promedio de esporas de micorriza en cada 10 nódulos (tabla10).	43
Figura 19. Proceso de conteo de vesículas de (HMA).....	44

ÍNDICE DE CUADROS DEL ANEXO

Cuadro 1A. Análisis de varianza de la variable número total de áfidos por planta, a los 30 días después de la infestación. Prueba de antixenosis.....	49
Cuadro 2A. Análisis de varianza de la variable de crecimiento en SD y ST.....	49
Cuadro 3A. Análisis de varianza de la biomasa total obtenida para ver el desarrollo general de <i>Cajanus cajan</i>	50
Cuadro 4A. Análisis de varianza del porcentaje de micorrización en raíces de frejol de palo en simbiosis con <i>Rhizobium</i>	51
Cuadro 5A. Análisis de varianza del número de esporas de HMA en 100g de suelo.....	51
Cuadro 6A. Análisis de varianza del promedio de número de nódulos obtenidos de la onceava semana de cada tratamiento.....	52
Cuadro 7A. Análisis de varianza del promedio de esporas de micorriza de cada 10 nódulos.....	53

I. INTRODUCCIÓN

Las ventajas de la simbiosis con *Rhizobium* son múltiples, la planta puede autoabastecerse de nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas. Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas. Puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el N. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, seres humanos (Rodríguez, 1993).

Las ventajas del HMA al momento de interactuar en simbiosis con las plantas aumentan los niveles de asimilación de nutrientes y agua en el suelo, lo que provoca un alto desarrollo de biomasa, además se encarga de proteger ataques de algunos patógenos y poder resistir la toxicidad de metales en el suelo (Guadarrama, Sánchez, Álvarez y Ramos, 2004).

La Planta aporta con fotosintatos indispensables para todas las actividades metabólicas y a la vez da un lugar donde pueda reproducirse y generar un micro hábitat, esta simbiosis refleja un incremento en la productividad vegetal, reduce la compactación del suelo y se mantiene la diversidad de microorganismos (Guadarrama, Sánchez, Álvarez y Ramos, 2004).

La planta hospedera recibe una mayor captación de nutrientes gracias a las hifas de HMA que se encuentran externamente porque poseen una mayor habilidad para explorar el suelo. El rango del hongo para extenderse y obtener nutrientes es de hasta 9 m esto es una ventaja, debido a que resuelven limitantes al momento de adquirir nutrimentos que la planta radicularmente no podría por

el lento movimiento de algunos minerales en el suelo (Guadarrama, Sánchez, Álvarez y Ramos, 2004).

La simbiosis HMA con el hospedero aporta una resistencia a deficiencias hídricas por medio de diferentes mecanismos tanto de respuestas físicas como una bioquímica. Las plantas micorrizadas en condiciones de estrés hídrico resisten más tiempo condiciones de sequía y tienen una recuperación más rápida (Guadarrama, Sánchez, Álvarez y Ramos, 2004).

La simbiosis entre la micorriza y el hospedero genera una alteración en la forma de captar agua gracias al micelio de los hongos micorrícicos mantienen una continuidad del agua entre la raíz y el suelo mientras que las hifas incrementan la captación de agua, la influencia de este microorganismo es de gran valor productivo y ecológico al mejorar la vigorosidad de las plantas y ayudar a la supervivencia en condiciones extremas. (Guadarrama, Sánchez, Álvarez y Ramos, 2004).

1.1. Planteamiento del problema

La mayoría de los suelos ecuatorianos dedicados a la agronomía son andisoles su composición esta basada en cenizas volcánicas y cubren un área apreciable de (26,62%) de la superficie del Ecuador.

En cuanto a las características químicas de los Andisoles, estos suelos generalmente tienen pHs que se encuentran en el rango de 5.5 a 6.5; siendo un rango ideal para la mayoría de los cultivos. Sin embargo, el uso inadecuado de fertilizantes nitrogenados ocasiona la acidificación de los mismos ($\text{pH} < 5.3$) con la consecuente disminución en la disponibilidad de nutrientes. Con respecto al contenido de materia orgánica, los Andisoles presentan cifras elevadas (2 a 20%); no obstante, los contenidos de nitrógeno (N) disponible para las plantas en este tipo de suelos no son altos, debido a la baja tasa de mineralización o degradación de dicha materia orgánica. Por esta razón, el contenido de materia orgánica en andisoles no es un criterio válido para estimar los requerimientos de fertilización nitrogenada.

En general tienen un buen contenido de potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg). sin embargo, cultivos de alto rendimiento agotan dichas fuentes de nutrientes del suelo (Valverde, 2009).

En cuanto al fósforo (P), una de las características más importantes de los andisoles es su capacidad para fijar este elemento en la superficie de los minerales amorfos y en los complejos humus-aluminio. Este fenómeno hace que el P presente en la solución del suelo forme compuestos insolubles eliminando de esta forma la disponibilidad de este nutriente para las plantas. El mecanismo de fijación del P en la fracción mineral inorgánica ha sido descrito como una reacción de quemiabsorción, intercambio y precipitación (Alvarado, 2009).

1.2. Formulación del problema

¿Se logrará establecer la simbiosis *Rhizobium*- micorriza en frejol de palo (*Cajanus cajan*)?

1.3. Justificación

La desnitrificación de los suelos causa muchos problemas para la agricultura porque las bacterias desnitrificantes expulsan el nitrógeno asimilable por las plantas en formas de gas de nitrato y esto es una de las causas de la erosión de los suelos, la agricultura sustentable, plantea mejorar la eficiencia de la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y rizobios competitivos, capaces de ser usados en biorremediación y fitorremediación gracias a la fijación de nitrógeno atmosférico que logra la bacteria de *Rhizobium* la cual trasforma en nitrato para que pueda ser asimilable para la planta y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos; en tal sentido, las investigaciones se han orientado al estudio del rizobios como promotor del crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas (Santillana, 2005).

En relación con el fosforo asimilable por las plantas este no puede ser absorbido por la raíz de la planta si está a más de 2 cm, el P es un elemento de

lento movimiento en el suelo por lo cual lleva a los agricultores a fertilizar más los suelos lo cual provoca acidificación y mayores gastos, por esta razón la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que viven simbióticamente con la mayoría de plantas. (Barrer, 2009).

El propio autor plantea que ellos les aportan beneficios, dándoles ventajas con respecto a las plantas no micorrizadas, como por ejemplo facilitándole a la planta la toma de nutrientes de baja disponibilidad o de poca movilidad en el suelo gracias a que al estar inoculadas en las plantas estas producen un mayor desempeño radicular y a la vez el hongo produce un manto de micorrización de hasta 9 metros

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Establecer la simbiosis de *Rhizobium*-Micorrizas en *Cajanus cajan* bajo condiciones de invernadero.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Establecer la simbiosis entre *Rhizobium*-Micorrizas en plantas de *Cajanus cajan*.
- Determinar parámetros agronómicos de las plantas de *Cajanus cajan* en interacción *Rhizobium*-micorrizas.

II. MARCO TEORICO

2.1. La agricultura y usos de microorganismos

La agricultura se encuentra con la necesidad de acoger medidas ecológicas que ayuden a conservar la tierra, es así como de esta manera se encuentran a los microorganismos utilizados como biofertilizantes que cumple con este papel esencial porque sustituye de manera global los productos agroquímicos. Es por ello que cada día es más evidente el valor significativo que poseen los microorganismos en la agricultura y su vínculo con el ser humano (Grageda, 2012).

En la agricultura actual la inserción de microorganismos benéficos ha aumentado notablemente, tales como: bacterias promotoras de crecimiento, bacterias fijadoras de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fosfato y hongos Micorrízicos arbusculares (MA). Algunas plantas que viven en la rizosfera pueden receptar los nutrientes a través de interacciones que establecen con los microorganismos, pero de manera especial son requeridas las interacciones con los simbioses de la raíz (Guerra, 2008).

Las características del microorganismo es su específica condición de cultivo y medioambiente y son los candidatos de solventar las dificultades en las ciencias vivas. En los últimos 50 años los microorganismos van avanzando tanto en tecnologías médicas, para el ser humano y para la salud animal, además cumplen el rol de procesar alimentos para la seguridad y calidad de los mismos, protegen el medio ambiente, ingeniería genética, como ya hemos mencionado la biotecnología agrícola y tratamiento efectivo de los desechos agrícolas, presentan un costo menor comparados con los fertilizantes químicos (Higa y James, s.f.).

2.2. Biofertilizantes

Se define a los biofertilizantes como un instrumento o insumos importante que se encuentran formados con uno o varios microorganismos, mediante los cuales, de una u otra manera, mejoran, proveen o perfeccionan la disponibilidad de nutrientes al momento de aplicarlos a los cultivos (Acuña, s.f.).

2.3. Microorganismo

La inserción de microorganismos se efectúa mediante de la utilización de inoculantes en las semillas o sobre el suelo, el objetivo es establecer una asociación benéfica entre el microorganismo y la planta. Los inoculantes monovalentes son aquellos que contienen un solo tipo de microorganismo y los inoculantes polivalentes son aquellos que constan de dos o más microorganismo. Una tendencia mundial es la utilización de inoculantes líquidos que ayudan a la supervivencia del microorganismo en el inoculantes para un extenso período. Los inoculantes se encargan de no aportar microorganismos que no sean deseados ni tampoco los posibles contaminantes y la cantidad que se debe aplicar deben ser exactamente la que se requiera para obtener resultados eficientes (García, I., 2011).

En la zona cercana a las raíces se encuentra la mayor concentración donde abunda los microorganismos, que se la conoce con el nombre de rizosfera. A las raíces les corresponden una biomasa de 5 a 6 Tm por hectárea, que produce exudados radiculares, y contienen, la energía fijada por fotosíntesis. Estos exudados ricos en carbonatados sirven de alimento a los microbios, que facilitan minerales que la planta necesite. Existen tres modelos de microorganismos que establecen una simbiosis con las raíces de las plantas:

- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- Hongos formadores de micorrizas arbusculares.
- Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (Asociación vida sana, s.f.).

2.4. Bacterias que favorecen el crecimiento microbiano

Las bacterias que son las promotoras del crecimiento de las plantas representan numerosas especies del suelo, en particularmente los micorrízicos, se encuentran asociados con la mayoría de las especies de plantas. Entre las especies de que han sido ampliamente estudiadas se localiza a las rizobacterias impulsadoras del crecimiento de las plantas que se encargan de colonizar la rizosfera y la superficie de las raíces. Algunas del género de cuentan con la capacidad de penetrar y proliferar en al interior de las raíces, y después sin causar daño se trasladan en los tejidos internos de las plantas, puede ser en el tallo, hojas u otros órganos, esto se da a través del sistema vascular, donde se establecen y desarrollan poblaciones endófitas (Caballero, 2006).

Los microorganismos en la rizosfera desarrollan actividades metabólicas de las que aprovecha las plantas para beneficiarse como son: las transformaciones de la materia orgánica del suelo, movilización de nutrientes inorgánicos, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, antagonismos frente a patógenos. El efecto rizosférico es un grupo de interacciones que se producen en la rizosfera, que supone la estimulación del crecimiento microbiano alrededor de la raíz a causa del variado aporte de compuestos carbonados (solubles e insolubles) al suelo, fenómeno también conocido como rizodeposición, que se puede dar mediante:

- Exudados: son compuestos de un peso bajo en moléculas procedentes de células intactas.
- Secreciones: son compuestos que están liberados activamente por las células de raicillas.
- Mucílagos vegetales: son procedentes de varias partes de la raíz.
- Mucigel: es un material gelatinoso que consiste estar sobre raicillas debida a los mucílagos, bacterias, productos metabólicos, material coloidal.
- Lisados: son compuestos que están liberados, pero esta vez por la rotura de las células epidérmicas viejas.

- Restos de tejidos y células de la cofia, epidermis y corteza de la raíz y otros (Rodas Pinochet, 2006).

2.5. Bacterias fijadoras de nitrógeno

El nitrógeno molecular al igual que otros componentes se presenta en el aire de manera natural, solo se la puede realizar mediante un reducido o pequeño grupo de microorganismos que se los denomina fijadores de nitrógeno. Esta molécula es muy estable debido a su triple ligadura que poseen y une a los dos átomos de nitrógeno, además, se considera (FBN) Fijación Biológica de Nitrógeno, a la reducción del N_2 a amoníaco. Dentro del grupo de los Fijadores de nitrógeno encontramos una gran biodiversidad que va del metabolismo aerobio al anaerobio, que poseen características como las metabólicas y la capacidad de reducción de nitrógeno en forma libre u obligatoria en la asociación simbiótica en plantas específicas. Sin embargo, el papel fundamental de los fijadores de nitrógeno es la ecología como tarea esencial que cumple con la biosfera del planeta (Muñoz, Munive, Bustillas, Rocha., 2015).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno están constituidas por un complejo enzimático llamado nitrogenasa. Una enzima proteica es la nitrogenasa, que se encuentra formado por dos metaloproteínas: la ferroproteína y la molibdoferroproteína. Esta enzima provoca catálisis debido a la primera reacción de la fijación del nitrógeno, es decir, la transformación del nitrógeno que se encuentra en la atmosfera en amoníaco. La restricción de la fijación de nitrógeno es ocasionada por la existencia de grandes cantidades de oxígeno en el nódulo radicular. Para alcanzar un nivel alto de eficiencia la nitrogenasa debe trabajar a muy bajas tensiones de oxígeno, para ello la leghemoglobina trabaja como filtro de oxígeno; además regula la tensión de oxígeno en el nódulo radicular. De esta forma permite que la nitrogenasa desarrolle su actividad eficientemente, para lo cual requiere gasto de ATP y es inhibida por ADP (Calvo, 2011).

2.6. Bacterias solubilizadores de fósforos

La alta capacidad de bacterias solubilizadoras de fósforo es llevada a cabo mediante distintas tácticas o habilidades según sea orgánico o inorgánico el fósforo del suelo. Sin llegar a ser orgánicas las bacterias van a producir enzimas del tipo fosfatasa que hidrolizan los enlaces orgánicos fosfatados liberando aniones fosfato a la solución del suelo de donde las raíces y los microorganismos se alimentan. Si el caso es el fósforo inorgánico su solubilización es obtenida por las bacterias mediante la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico que libera fosfatos y cationes de Ca, Fe y Al a la solución del suelo (González Gustavo, 2008).

Bajo condiciones de P (fósforo), las plantas aumentan el crecimiento de las raíces o también conocida como los pelos radicales o su densidad, con el fin de conseguir la investigación de una mayor superficie y volumen de suelo. Tanto las plantas como los microorganismos pueden aumentar la solubilidad del P inorgánico (Pi) pobremente soluble a través de la liberación de protones, iones OH⁻ o CO₂ y aniones de ácidos orgánicos como citrato, malato y oxalato y pueden mineralizar el P orgánico (Po) por la liberación de varias enzimas fosfatasas (Restrepo, et al., 2015).

Algunos microorganismos del suelo poseen la ventaja de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas, de esta manera contribuye a su disponibilidad en el suelo, entre ellos se destacan las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) que establecen una excelente alternativa para aminorar la cantidad de fertilizantes aplicados a diferentes cultivos. Estas bacterias solubilizan tanto el Po (fósforo orgánico), como el Pi (fósforo inorgánico) e incluyen una amplia cantidad y diversidad de géneros (Restrepo, et al., 2015).

2.7. Microorganismo como beneficio para la agricultura.

En la actualidad es muy probable ver a los microorganismos implantados en los cultivos debido a las grandes interacciones benéficas que contribuye a la agricultura, no sólo por el bienestar ambiental o duradero del planeta como se ha mencionado antes, sino que, también para aumentar los rendimientos en los cultivos y por tener menos costo económico comparados con los fertilizantes químicos. Los agricultores en su sano juicio buscan muchas vías aptas, capaces de desarrollo y con menos rendimiento económico, debido a que estas bacterias no solo proporcionan rendimiento al ambiente, sino que, a toda la humanidad con su hábitat, es por esta razón que se considera una opción viable o razonable para todos los agricultores que deseen tener beneficios y rendimiento en sus cultivos tanto por su calidad y por su economía (Grageda, 2012).

Existe un interés global en el estudio de las variedades de microorganismos autóctonos que son capaces de degradar contaminantes como el petróleo crudo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los bifenilos policlorados en distintos ambientes. Es importante para las estrategias óptimas de biorremediación in situ, los organismos que desempeñan un papel en los procesos de degeneración de contaminantes. Asimismo, para caracterizar las comunidades bacterianas y sus respuestas a los contaminantes se han realizado esfuerzos, y así aislar a los degradadores potenciales e identificar los genes funcionales implicados en procesos de degradación particulares. Se ha llegado a demostrar que las comunidades microbianas dominadas por cianobacterias fototróficas pueden participar activamente en la degradación del petróleo y sus derivados (Abed, et al., 2002).

Los seres humanos siempre tienen la necesidad de buscar los beneficios de varios planteamientos de hipótesis en distintas áreas. Antes de lanzar un producto, un planteamiento, una idea, un servicio; se tiene que hacer un análisis de estudio, para ello, se necesita información, mecanizar el objetivo, el bienestar que ofrecerá, se toma medidas para mejorar y avanzar a beneficio de la humanidad, y de la misma manera avanza para el beneficio del planeta, de la tierra y por ende de la agricultura. Un planteamiento es usar biofertilizantes en las plantas que sean reemplazadas por otros productos químicos, lo cual propone un mecanismo totalmente desarrollado, beneficioso tanto para la salud

como para el bolsillo del agricultor. Estos biofertilizantes son insertados por agrónomos, que son consideradas personas aptas y capaces, con conocimiento holístico para llevar a cabo todo el procedimiento.

El acelerado deterioro de los suelos es uno de los problemas ambientales del sector agrícola, que es a causa del continuo crecimiento de los monocultivos y del uso de fertilizantes e insecticidas químicos. Al querer suplir la alta demanda de alimentos hace que los productores quieran por cualquier medio y por todas las formas acelerar los procesos de germinación, crecimiento y producción sin tener la consciencia del daño que causa al suelo y como afecta en la salud al consumidor final. Por este motivo, surge la obligación de utilizar mecanismos de tipo biológico para la germinación, crecimiento y producción, los cuales van a reemplazar los métodos químicos que son aun actualmente utilizados, esto permitirá mejorar la calidad de la comida que se verá reflejado en la salud del consumidor, además, disminuirá el acelerado proceso de contaminación que está presentando el suelo y tendrá un mayor rendimiento económico el productor puesto que el uso de microorganismos eficientes abaratará los costos, comparado con la inversión que se debe realizar por adquirir fertilizantes químicos (Arias, 2010).

El EM (microorganismos eficaces) es inoculado en el medio natural, el efecto individual de cada microorganismo es ampliamente magnificado en una manera sinérgica por su acción en comunidad. La tecnología EM, fue introducida y propuesta por Teruo Higa, Ph. D, profesor de horticultura de la universidad de Ryukyus en Okinawa, Japón. A comienzos de los años sesenta, el profesor Higa comenzó la investigación de una alternativa que reemplazara los fertilizantes y pesticidas sintéticos, popularizados después de la segunda guerra mundial para la producción de alimentos en el mundo entero (Arias, 2010).

Los microorganismos efectivos son una cultura mixta de microorganismo que presentan beneficios (fundamentalmente bacterias fotosintéticas, productoras de ácido láctico, levaduras, actinomicetos y hongos fermentadores) que pueden ser aplicados como inoculante para:

- Aumentar la diversidad microbiana de los suelos.
- Aumentar la calidad y la salud de los suelos.

- Aumentar el crecimiento, la calidad y el rendimiento de los cultivos (Arias, 2010).

Los microorganismos producen beneficios para el ser humano, ya sea formando parte del microbiota del ser humano o mediante la producción de productos de interés para los seres humanos como queso, cerveza, antibióticos, yogur o pan. Aunque en algunas ocasiones parezca que los microorganismos son malos, la mayoría de ellos son beneficiosos, y se incluyen en este grupo algunas bacterias y hongos (exceptuamos a los virus) (Sánchez , 2019).

2.8. Clasificación de los microorganismos

Los microorganismos así son organizados, estudiados y clasificados por una rama de la ciencia biológica que es la microbiología, de esta manera se clasifican principalmente en cuatro grupos: bacterias, virus, hongos y parásitos:

- **Bacterias:** Son células procariotas que no presentan núcleo y poseen un solo cromosoma. Reciben su nombre según su forma, si tienen forma alargada y cilíndrica serán denominados bacilos, si su forma es redondeada se denominarán cocos, etc. Las bacterias se subclasifican en Gram (-) que poseen en su pared celular una sola capa de peptidoglucanos y Gram (+) que presentan varias capas. En cuanto a su nutrición la mayoría de las bacterias son heterótrofas, otras, en menor cantidad, son autótrofas, saprofitas o simbioses.
- **Virus:** Son aquellos organismos bastante simples que no pueden nutrirse, relacionarse ni reproducirse por sí solos, lo que casi los convierte en parásitos pues para subsistir necesitan de su actividad intracelular ya sea animal o vegetal. Los virus también pueden ser citopáticos si matan a la célula que infectan, mientras que si solo producen una infección crónica y son no citopáticos cuando no matan a la célula huésped.
- **Hongos:** Son aquellos organismos eucariotas unicelulares o pluricelulares, además son heterótrofos y en su mayoría saprofitos. Su reproducción es por gemación, esporulación o fragmentación en

el medio extracelular y se clasifican en levaduras o en hongos con hifas.

- **Parásitos:** Son organismos eucariotas que se clasifican en protozoos son eucariotas unicelulares y se multiplican en el medio intracelular o extracelular y helmintos son eucariotas pluricelulares, se denominan gusanos y su reproducción es sexual (Vargas & Villazante., 2014).

2.9. *Rhizobium*

El nitrógeno es considerado uno de los elementos muy importantes para la vida de las plantas, que se agota velozmente por la extracción de los cultivos, así como por los procesos de lixiviación con las aguas de riego, como consecuencia el nitrógeno del suelo puede llegar a acabarse en su totalidad. Es por este motivo que existen microorganismos que fijan el nitrógeno atmosférico (N_2) que viven en simbiosis en las raíces de las leguminosas como el *Rhizobium* sp., formando nódulos, lo cual representa una alternativa ecológica y económica para el manejo de este nutriente (Gomero y Velásquez, 1999).

La bacteria del suelo pertenece al género *Rhizobium* (comúnmente llamada rizobios) promueve una fijación biológica del nitrógeno atmosférico al momento que interactúa con las leguminosas. El inoculante de *Rhizobium* está formado por una cepa (bacteria) eficiente en fijación de nitrógeno incorporada en un sustrato que sirve de portador o soporte, que permite la sobrevivencia del microorganismo (Campaña, 2004).

2.10. Clasificación del *Rhizobium*

Clasificaron a la especie y al género de *Rhizobium*, de la siguiente manera:

- B. j. *Bradyrhizobium japonicum*
- B. sp. *Bradyrhizobium sp.*
- B. spp. *Bradyrhizobium spp.*
- R. l bv p. *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*
- R. l bv t. *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*
- R. l bv v. *Rhizobium leguminosarum biovar viceae*
- R. m. *Rhizobium meliloti*
- R. sp. *Rhizobium sp.*
- R. spp. *Rhizobium spp.*
- R. t. *Rhizobium trifolii* (Viteri, Consenza y Rosas., 1992).

2.11. Leguminosas

Las leguminosas se manifiestan en la zona tropical del globo terraqueo como una opción para ayudar a resolver en la carencia protéico y la desnutrición que afectan en la zona ya mencionada. No obstante, se necesita en las leguminosas un buen suministro de nitrógeno, mediante la aplicación de biofertilizantes o también mediante la nodulación de cepas que sean eficientes de rizobio para cada tipo de especie, se considera que ambos métodos son económicos. Para poder alcanzar este procedimiento se necesitará el conocimiento holístico del tipo de nodulación y su eficiencia en cuanto a fijación de nitrógeno (Prieto, Agudelo y Varela, 1990).

Los atributos especiales de las leguminosas se deben a su habilidad para asociarse en forma simbiótica con ciertas bacterias del suelo y formar nódulos, en los cuales el nitrógeno atmosférico tiene que ser convertido a nitrógeno amoniacal para ser luego utilizado por la planta en la síntesis de proteínas. Cabe destacar que la atención de los primeros agricultores fue cautivada por la

capacidad de estas plantas para mejorar el suelo, además del gran valor nutritivo que posee.

las leguminosas se encuentran en el segundo lugar de familia que son muy importantes para la alimentación del ser humano y animal. Gracias a su capacidad para establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo llamadas rizobio, se les consideran aptos para desarrollarse y crecer en suelos áridos, de escasa fertilidad. Estos microorganismos constituyen unos órganos especiales que son los nódulos, en las raíces de las leguminosas, donde el dinitrógeno (N_2) atmosférico se transforma en amonio que se exporta a la planta para su crecimiento. El conocimiento de las bacterias capaces de establecer simbiosis con estas plantas ha avanzado en las técnicas moleculares de identificación bacteriana desde el descubrimiento de los nódulos en las leguminosas (Ramírez, Álvaro, Velázquez, Bedmar, 2016).

2.12. Géneros y especies de las Leguminosas

las Leguminosas o también conocida como Fabaceae comprenden dentro de unos 720 géneros en el mundo (Lewis y Polhill 1998; Lewis et al. en prep.) y cerca de 18.000 especies. Estas especies de leguminosas son muy variadas en hábito, algunas son acuáticas verdaderas, además también incluyen desde algunos de los más grandes árboles hasta pequeñas hierbas efímeras. Las hojas, semillas, raíces, las legumbres tiernas, y flores de muchas leguminosas proveen de manera fructuosa muchas proteínas para los animales y de la misma manera para los seres humanos. Las leguminosas también son utilizadas en otras áreas como para la industria del perfume, en la producción de muchas medicinas y, en algunos casos, como drogas alucinógenas (Lewis y Klitgaard, 2002).

2.13. Asociaciones Rhizobium-Leguminosas

Las leguminosas al relacionarse con bacterias del género *Rhizobium* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y otras no leguminosas como recuperadoras de fertilidad. Además de esta cualidad, las leguminosas se asocian con las micorrizas en forma simbiótica; las asociaciones entre hongos Zygomycetes y raíces de las leguminosas son simbióticas. Permitiendo a éstas una mayor absorción de elementos como fósforo, agua y otros nutrientes, asimismo la liberación de hormonas de crecimiento es atribuida por el hongo, colaborando en la formación de agregados del suelo.

La determinación de los rizobios para nodular una leguminosa está codificada en elementos genéticos susceptibles de ser transferidos entre especies e incluso entre géneros, y esta capacidad para transferirse horizontalmente determina el espectro de hospedador de un rizobio. Esta transferencia génica permitiría a cepas de distintas especies, nodular la misma leguminosa y que una misma especie de rizobio que contenga cepas pertenecientes a diferentes simbiovariedades pueda nodular a diferentes leguminosas (Ramírez, Álvaro, Velázquez, Bedmar, 2016).

La interacción *Rhizobium*-leguminosas que establecen depende de un complejo intercambio durante todo el proceso simbiótico de señales, y que solamente una combinación correcta permitirá una simbiosis eficiente. Existen evidencias que incrementa notablemente la nodulación en algunas leguminosas al usar inductores de los genes *nod* (Nápoles, et al., 2016).

La investigación que se realizó sobre la simbiosis rizobio-leguminosa permitió describir la presencia en el interior de los nódulos de unas células especializadas denominadas bacteroides (Prazmowski, 1890) y de una clara relación entre la formación de bacteroides y la asimilación de N_2 (Nobbe y Hiltner, 1893). Con esta base de información ya era posible con certeza asegurar que las leguminosas establecen simbiosis con ciertos microorganismos diazotróficos aquellos que se alimentan de nitrógeno, que son los responsables de la asimilación del N_2 atmosférico, y que gran parte de ese N pasa al suelo donde el siguiente cultivo puede aprovecharlo. De esta manera, se pudo comprender el

éxito ancestral de un ciclo de cultivos (Ramírez, Álvaro, Velázquez, Bedmar, 2016).

2.14. Nódulos de *Rhizobium*

La formación del nódulo radicular por parte de la planta y por parte del microsimbionte es un proceso coordinado mediante una serie de etapas:

- En donde la primera etapa se basa por parte de la bacteria en un proceso de reconocimiento celular. La planta lanza señales quimioattractantes, como los flavonoides. La bacteria recepta estas señales y busca puntos donde pueda penetrar en la raíz de la planta emisora.
- La segunda etapa es la infección de la planta, consiste que la bacteria penetra en la raíz de la planta y forma un tubo de infección; ésta avanza por el tubo de infección hasta llegar a la parte exterior de la raíz.
- La tercera y última etapa consiste en el establecimiento del simbiosoma (simbiosis diatófica) (Calvo, 2011).

Los rizobios comienzan a multiplicarse sobre la superficie de la raíz debido al proceso de infección que se da mediante los pelos radicales, donde el pelo radical se curva. Los rizobios son aquellos que penetran, a través de un hilo de infección; el hilo de infección crece dentro de la corteza de la raíz, permitiendo que los rizobios penetren en las células corticales. Estas células, junto con los rizobios, empiezan a multiplicarse para así de esta manera poder formar el nódulo (Sylvester, Kipe, Harris y Valencia, 1987).

2.15. Tipos de nódulos

Un nódulo puede ser de dos tipos:

- Los nódulos de crecimiento limitado, también denominados por nódulos de crecimiento determinado, que presentan una estructura externa con apariencia esférica. Se caracterizan principalmente porque no presentan células de transferencia.
- Los nódulos de crecimiento indeterminado o también llamados ilimitado. Son nódulos que siempre poseerán células meristemáticas en división que permitirán al nódulo crecer, sí presentan células de transferencia y las células presentan un elevado número de vacuolas, principalmente las células periféricas (Calvo, 2011).

2.16. Micorrizas Arbuscular

La endomicorriza o también denominada micorriza arbuscular es el tipo de asociación hongo-raíz, que se encuentra constituida por ciertos zigomicetos, los cuales colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbuscúlos, los nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped actúan como órganos de intercambio. Algunos géneros de esta misma familia de hongos forman mediante lípidos otro tipo de estructuras llamadas vesículas, que se encuentran presente intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrimentos para el hongo. La simbiosis se conoció como vesículo-arbuscular (VA) gracias a la presencia de arbuscúlos como de vesículas, a pesar de que, no todas las especies de hongos constituyen o desarrollan vesículas, por esta razón en la actualidad la asociación se conoce como micorriza arbuscular (MA) (Aguilera, Olalde, Arriaga y Contreras, 2007).

Se requiere la adición de micorrizas, principalmente cuando:

- Se introduce una planta nueva.
- Cuando se adicionan cantidades significativas de materiales aluviales o cenizas volcánicas al ecosistema, materiales que no tienen micorriza.
- Cuando se esteriliza el medio de cultivo intencionalmente, en ciertos tipos de medio de enraizamiento o por uso excesivo de agroquímicos.

La fertilidad de los denominados micorriza arbuscular (AM) son determinadas por las características biológicas, físicas y químicas, las cuales son las interacciones más ordinarias que se presentan el mayor porcentaje de especies de plantas, y que obviamente son las más importantes. Un nutriente limitante en la mayoría de los suelos es el fósforo que es proporcionado gracias a la función importante que realiza esta simbiosis (hongo-raíz), contribuyendo beneficios a la planta (Aguilera, Olalde, Arriaga y Contreras, 2007).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Área y descripción de la zona de estudio

El experimento realizo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE-ESPOL (Escuela Superior Politécnica del Litoral) ubicada en el campus Prosperina km. 30.5 vía perimetral GUAYAQUIL-ECUADOR cuyas coordenadas son 2°09'04.3" latitud sur 79°57'13.7", Con temperatura de 24°C hasta 35°C y con precipitaciones en épocas lluviosas de 145mm mensual y 472mm promedio anual, la humedad relativa se reflejó de 65% y máxima hasta 100%, la radiación solar máxima de 1385 w/m².(figura1)

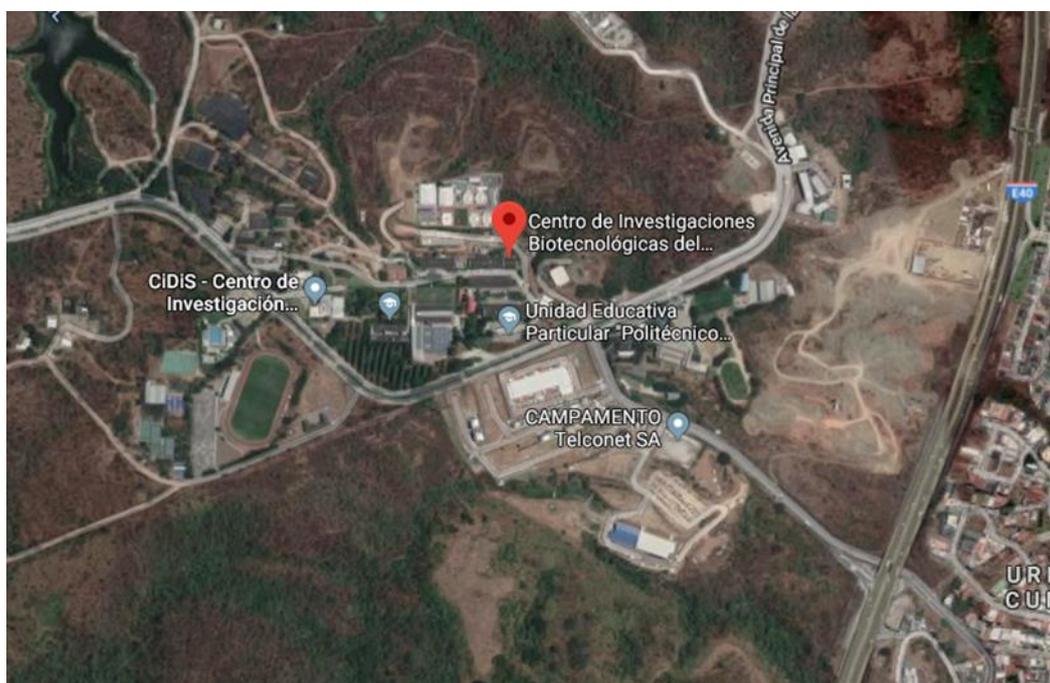


Figura 1. Croquis de zona de estudio de gps.

3.2. Factores estudiados

Los factores en estudio fueron Cepas aisladas de *Rhizobium* en simbiosis con inoculo de micorriza en *Cajanus cajan*.

3.3. Tratamientos

Los tratamientos se detallan en la siguiente tabla:

N	Solución Nutritiva	Denominación
1	Sandman	C =Cepa de <i>Rhizobium de Cajanus cajan</i> .
2		C7 =Cepa de <i>Rhizobium</i> de banco del Cibe.
3		C4 =Cepa de <i>Rhizobium</i> de banco del Cibe.
4		CTM=Control con micorrizas.
5		CT =Control total.
6	Steiner	C =Cepa de <i>Rhizobium de Cajanus cajan</i> .
7		C7 =Cepa de <i>Rhizobium</i> de banco del Cibe.
8		C4 =Cepa de <i>Rhizobium</i> de banco del Cibe.
9		CTM=Control con micorrizas.
10		CT =Control total.

Cuadro 1. Tratamientos con prueba de dos tipos de solución nutritiva. estudiados.

3.4. Fases experimentales

La investigación y el desarrollo en este procedimiento de proyecto se realizó, a través de dos fases: fase de laboratorio y fase de invernadero.

3.5. Unidad Experimental

Estuvo constituida por la interacción de cepas de *Rhizobium* y esporas de micorriza bajo nutrición con solución de Sandman y steiner

3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial con prueba en interacción de cuatro cepas de *Rhizobium* en simbiosis con micorriza, establecidas en dos tratamientos de solución nutritiva y cinco réplicas.

3.7. Metodología para recolección y esterilización de nódulos

3.7.1. Obtención de material vegetativo

En cuanto a la recolección de material vegetativo, se lo obtuvo de plantas de *Cajanus cajan* sembradas en Cibe-Espol Guayaquil Ecuador, en la cual se recolecto raíces que estaban infectadas de *Rhizobium*, del mismo modo, para poder determinar la infectividad en las raíces, se verifico que haya nódulos en los pelos radiculares. Para tener un mayor rango en rhizobio debemos buscar nódulos con ciertas características como su forma, coloración y tamaño.

3.7.2. Recolección de nódulos de *Cajanus cajan*

Se delimitó el área para obtener una mayor precisión en el muestreo del material que se va a conseguir, para la recolección de los nódulos se usó el método de muestreo de zig zag. Además, se escogieron las plantas con mayor vigor las cuales ya adquirieron un tamaño óptimo para la producción, también beneficiará el desarrollo y multiplicación de *Rhizobium*, debido a que, las plantas se encuentran sembradas en suelo arenoso.

Con una pala de mano se removió la tierra haciendo una circunferencia alrededor del tallo de 40cm de ancho, siguiendo la raíz principal con la pala de mano se perforo la tierra 30cm para descompactarla, este método se lo realizó para poder remover la tierra con las manos y de esta manera evitar dañar las raíces para que no se corten los nódulos o se desprendan, debido a que las raíces de *Cajanus cajan* son muy finas y se parten con facilidad.

Siguiendo la raíz principal se pudo observar nódulos con mayor frecuencia en los pelos radiculares, algunos con distintas características. Es importante saber escoger los nódulos porque se puede llegar a la confusión de: nódulos secos o cortados con nódulos (activados). Se recomienda que los nódulos que se debe escoger tienen que ser esféricos - ovalados de color crema o rosado, en la cual, se tomaron de 5 a 7 nódulos por cada planta con 1cm de raíz por cada lado.

Para trasladar y preservar los nódulos se usó frascos de vidrio previamente esterilizados. Se les colocó silica gel al fondo del frasco y por encima algodón para la conservación requerida de los nódulos, además que, permitió que el contacto no sea directo, entonces, ayuda a que no se sequen los nódulos, porque es un desecante y al final, se los deja en refrigeración de 20oc a 4oc.



Figura 2 Nódulos recolectados de raíces de *Cajanus cajan*.

3.7.3. Hidratación y limpieza de nódulos

Los nódulos obtenidos fueron puestos en un colador, e inmediatamente fueron lavados con agua de grifo, debido a que, al extraerlos del suelo estaban cubiertos por material vegetal y partículas de tierra que al momento de sembrarlos pudo haber sido causa de contaminación. Para su hidratación se los colocó en un frasco con agua por dos horas, cambiando el agua cada 30 minutos.

3.7.4. Esterilización superficial de nódulos

La esterilización de los nódulos se la realizó en una cámara de flujo laminar, en la que hay que tener presente estos dos métodos:

- Para poder realizar la esterilización de los nódulos se usaron cajas Petri de vidrio previamente auto clavadas, Se procedió a sumergir los nódulos en hipoclorito de sodio (cloro) al 15% en la primera caja por 3 minutos, luego se los trasladó a la segunda caja la cual contenía alcohol al 75% por 1 minuto. Se realizaron tres lavados con agua estéril auto clavada conteniendo un número igual, la cual, se lavaron 30 segundos por espacio de caja.
- Como segundo procedimiento se usó hipoclorito de sodio al 15% sumergiendo los nódulos por 5 minutos y haciendo 3 lavados y luego repitiendo el proceso por segunda y última vez.

3.8. Metodología de aislamiento de *Rhizobium*

3.8.1. Aislamiento de *Rhizobium*

Para el aislamiento de *Rhizobium* se usó el método de dilución 1/10, 1/100, 1/1000 este método se usó para obtener mayor probabilidad de reducción a la concentración de contaminante, para este proceso previamente se autoclavaron 4 tubos de ensayo de 15ml conteniendo agua estéril uno con 3ml y los demás tubos con 9ml, pinzas de disección, puntas de 1ml para pipetas y azas triangulares (Vincent, 1970).

Con el mechero encendido se procedió a tomar los nódulos esterilizados con una pinza de disección flameada, que se los coloco dentro del tubo con 3ml de agua estéril. Con un barilla de vidrio se procedió a aplastar los nódulos hasta que quedaron triturados y desprendieron un líquido que torno el agua a un color café claro, para proceder agitarlo y así quede una mezcla homogénea.

Para la dilución con una pipeta tomamos 1ml del concentrado de la sustancia de los nódulos ya triturados para vaciarlo en uno de los tubos con 9ml de agua y con la misma pipeta mezclar el líquido que ya ha sido mezclado, se tomó 1ml de ese tubo que se lo vertió al segundo que tenía 9 ml, y se repitió el mismo proceso con el tercero.



Figura 3. Trituración de nódulos.

3.8.2. Siembra de *Rhizobium*

Se usó el medio (EL MARC) el cual contiene 1,5g de extracto de levadura manitol 10g/L, MgSo₄ 0,20g/L, K₂HPO₄ 0,50g/L NaCl 0,20g/L, FeCl₃ 1ml, agar 15g/L con indicador de Congo para poder teñir de rojo las bacterias que son gram positiva, el *Rhizobium* no absorberá el indicador, puesto que, es una bacteria gram negativa, formando colonias de color blanco o crema.

Con la pipeta se toma 1ml de cada dilución que se lo coloca en las cajas con medio El MARC, se sumergió el aza triangular en alcohol que se flameo para luego dispersar la gota del inóculo por toda la caja en forma de círculos, una vez cerrada las cajas se esperó a que seicara el inóculo en el medio para proceder a sellarla con Parafilm, después de este procedimiento se cubre las cajas con papel de empaque o con cartulina negra, debido a que, el *Rhizobium* se desarrolla mejor en oscuridad, puesto que, si penetrara la luz requerida puede llegar a confundirse y absorber el indicar. Mientras que existen otros microorganismos contaminantes que absorben el rojo Congo en la oscuridad, sin embargo, el caso del *Rhizobium* es lo opuesto como ya se ha mencionado (Vincent, 1970).

Luego se procedió a poner las cajas Petri en la incubadora de dos a ocho días a 28°C, se observó el desarrollo de algunas cepas en un período corto de dos días y otras con desarrollo más tardío en el período de cuatro a cinco días. En este procedimiento se coloca las cajas con la tapa hacia abajo para que la humedad no caiga sobre las cepas, debido a la condensación del medio.



Figura 4. Siembra de nódulos triturados.

3.8.3. Purificación y selección de cepas

Cuando se habla de purificación se dice que es un canal de limpieza para llevar al máximo el potencial de pureza, es por ello, que para la purificación de cepas se revisaron las cajas cada dos días para ir descartando las que muestren índices de contaminación, más tarde se seleccionaron las cajas que mostraron colonias de color y características de *Rhizobium*, también se escogieron tres cepas del banco de Cibe para poder multiplicarlas.

Para poder purificar las cepas se usaron dieciséis cajas con medio (EL MARC) cuatro por cada cepa, en la cual, se la realizó en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada con cloro al 15% y alcohol al 98 % una vez encendido el mechero se flameo un aza que se tomó parte de las colonias y se lo trasladó a las cajas sembrándolos en forma de zigzag, las cajas sembradas se cubrieron con papel Kraft para que con mayor rapidez los rizobio crezcan.

En el transcurso de un día a la cepa de rizobio se pudo observó indicios de crecimiento y en 48 horas, o sea dos días, se apreció su crecimiento completo.



Figura 5. a).-Aislamiento de *Rhizobium* b).- Purificación de cepa c).-Multiplicación.

3.9. Metodologías de pruebas de infectividad de *Rhizobium*

3.9.1. Preparación de Tinción de Gram

La tinción de gram se realizó con cada una de las cepas obtenidas, que ayudan a diferenciar las bacterias gram negativas de las positivas por medio de la coloración que adquieren cuando son sometidas a esta prueba. Se realizó esta demostración con la finalidad de probar la efectividad de la bacteria.

Para su preparación:

- Se esterilizó un porta objetos, que se le colocó una gota de la muestra en un mechero que luego fue flameada para que esta se fijara.
- Se dejó enfriar el porta objetos y se le colocó una gota de cristal violeta por un minuto, luego fue lavada con agua.
- Se procedió a colocar una gota de Lugol por un minuto y se lavó con alcohol por 30 segundos, luego con agua por 30 segundos se dejó secar.
- Finalmente, se puso una gota de safranina por un minuto y se lavó con agua.

Una vez que se realizó la tinción, las muestras fueron llevadas a un microscopio en la que se pudo apreciar colonias de color rosado, indicador esencial en la que se demostró que nuestras bacterias son gram negativas.

3.9.2. Crecimiento de Cepas en medio líquido

Como medio líquido se usó el medio *Imar* sin indicador de rojo congo y sin agar.

Para el crecimiento de las cepas con medio líquido se usó ocho frascos de vidrio de 250 ml con un ph de 6,8 a 7. A cada frasco se le otorgó un tapón de algodón que fue sellado con papel aluminio y esterilizados en autoclave. Para este cultivo se utilizó cajas petris con colonias de *Rhizobium* que posterior

se les añadió 2ml de agua destilada previamente colocado en autoclave, se removió las colonias de la bacteria con una aza triangular y a través de pipeteo lo unificó con el agua para poder trasladarlos al medio. Los frascos fueron envueltos con papel Kraft para colocarlos en el shaker, además el desarrollo de la bacteria se hace más efectivo. Al cabo de siete días se pudo observar crecimiento bacteriano en forma de una bola blanca en el centro del medio líquido.



Figura 6. Medios líquidos inoculados con *Rhizobium*.

3.9.3. Preparación de jarras de Leonard modificadas

Para fabricación de las jarras se usó botellas de plástico de 750 ml, por cada jarra se necesitaba de una botella que se cortó en dos partes, se requirió realizar un modelo comenzando desde el pico hasta la zona de corte, que fue 15 cm más ancha que el resto de la botella. Se realizó un corte con un estilete en 360° cuidadosamente, una vez cortados quedará una parte en forma de copa y otra en forma de vaso.

Para la esterilización de las botellas se preparó un balde de agua con 10% de cloro, en la que, se sumergió las botellas por cinco minutos para luego cepillarlo y así eliminar o combatir partículas de polvo. Después se sumergió en dos baldes de agua para quitar el cloro, se dejó secar aproximadamente por 10 minutos para verter 75% de alcohol y de este modo completar una limpieza profunda.

Se tomó la parte de la botella que tenía forma de copa, colocando una mecha de algodón de 20cm pasándola por el pico de la botella hasta la mitad de esta, dentro de la botella y sobre el algodón se colocó 350 g de arena. En la parte de la botella restante (la forma de vaso) se colocó medio de *sandman* 250ml por cada jarra. Se incrustó la parte del cuello de botella con la mecha de algodón en la parte con forma de vaso, bajando hasta el fondo de la botella tocando la solución para conectarla con la arena.

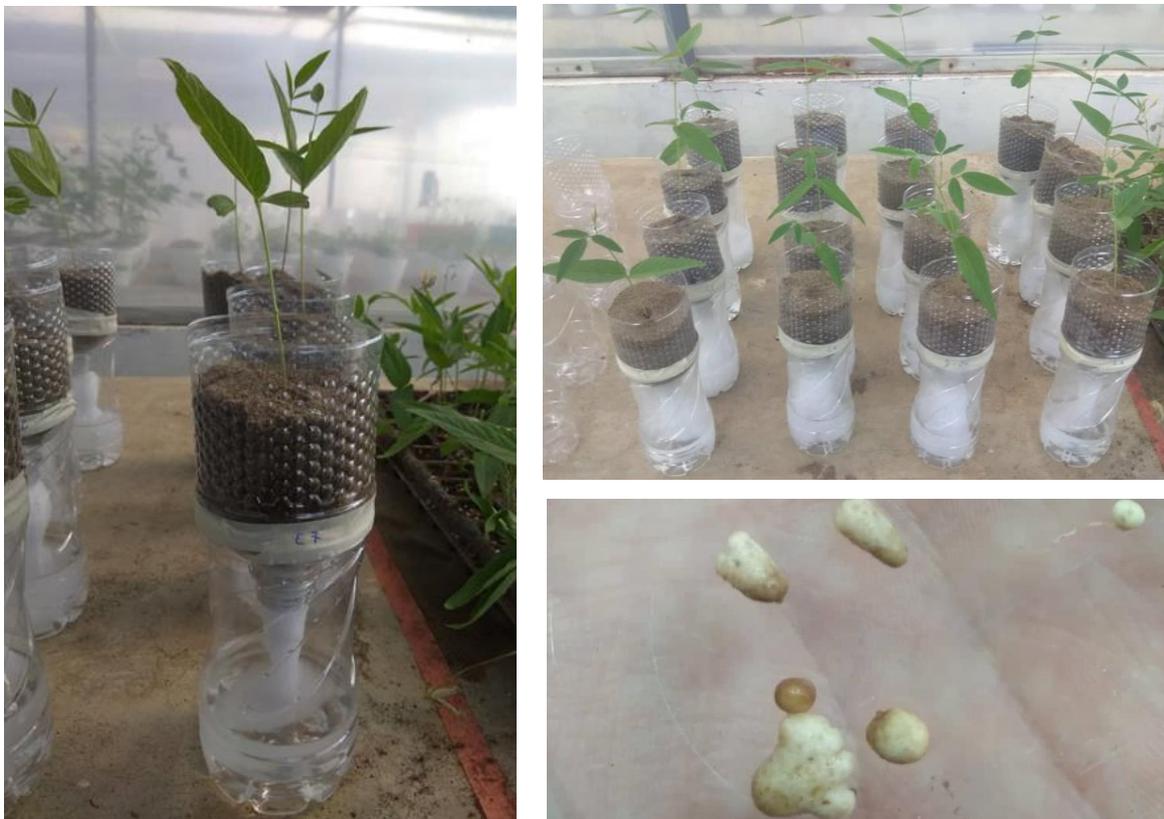


Figura 7. Jarras de Leonard, nódulos obtenidos a partir de las jarras.

3.10. Método específico para manejo de experimento

3.10.1. Esterilización de arena de río

Para la preparación se usaron 70lb de arena de río, en el primer proceso se la pasó por dos tamices para que de esta manera no incluyera restos de piedras o material orgánico, además, el proceso de tamizaje ayudó a que el sustrato este más suelto debido a las partículas de arena diminutas.

En el segundo proceso, la arena se colocó en un molde de aluminio y por encima se empleó láminas de aluminio para poder por una hora autoclavar, para poder eliminar cualquier rastro de contaminación se autoclavó dos veces, o sea una vez más.

3.10.2. Semillero con micorrizas

Para la preparación semillero se usó un banco de conglomerado grupo de micorrizas que son propiedad del cibe, las cuales fueron mezcladas con sustrato y se colocaron en un semillero de propileno.

Como base de sustrato semillero se usó para mezclar proporciones de arena al 40% con turba al 60%, ambas se mezclan para añadir las micorrizas que luego se remueven de las raíces y se mezclan en la arena que estaban sujetas las raíces. Por cada 100g de arena había un total de 300 esporas de micorriza y se usaron 300g para el semillero. Se mezcló y se regó para ser colocadas las semillas de *Cajanus cajan*. Finalmente, en dos semanas se observa que las plántulas están desarrolladas, dado que, se realizará el trasplante.

3.10.3. Preparación de sustrato para experimento

Como sustrato se usó turba al 25% y arena al 75%, en la que, la arena tuvo que ser tamizada, esterilizada en autoclave por una hora con una presión del 15%. El proceso de esterilización en autoclave se lo realizó dos veces por cada 25lb de arena, se mezcló todo y se lo colocó en fundas de polietileno de hasta 2kg, en consecuencia, se obtuvo sesenta fundas.

3.10.4. Trasplante e inoculación de *Rhizobium*-Micorriza

Para la inoculación de micorrizas se inoculó cincuenta fundas colocando 200g de arena micorrizada, los primeros 100g se los colocó en el centro del sustrato, el restante fue puesto en la superficie y humedecido para que se fije mejor,

En cuanto a la inoculación de la plántula se usó medio líquido con inoculante de *Rhizobium* el cual tuvo un tiempo de crecimiento bacteriano en el medio de 2 semanas, Se coloca 10 ml del inoculo en un frasco previamente esterilizado, se saca las plántulas del semillero y se sumergen las raíces en el medio por un minuto el cual brevemente se procede a trasplantar en el sustrato micorrizado.

3.11. Hipótesis

Todos los nódulos de *Rhizobium* pueden ser micorrizados y mejorar la producción de leguminosas cuando se encuentran en simbiosis.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Parámetros agronómicos de la interacción *Rhizobium*-Micorriza

En cuanto a los niveles de clorofila se observó un desarrollo menos favorable en los controles sin micorriza y sin *Rhizobium* CT mientras que el control con micorriza CTM obtuvo un desempeño mejor que CT pero en comparación con los tratamientos que fueron inoculados con *Rhizobium* se evidencio que las cepas C,C4 y C7 obtuvieron un mejor desarrollo no concuerdan con los obtenidos por (Fernandez, 2012). El cual afirma que las plantas de frijol sin inoculo de *Rhizobium* obtuvieron mejores niveles de clorofila. En cuanto a los tratamientos se evidencio que las plantas con mejor nivel de clorofila fueron las que estuvieron sometidas a SD contrario al tratamiento con ST (figura 8).

Cuadro 2. Variables agronómicas evaluadas de la interacción *Rhizobium*-Micorriza a la onceava semana.

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ($p < 0,05$); \pm desviación estándar.

CEPAS	TRATAMIENTO	ALTURA	CLOROFILA	PSM TOTAL
C	SD	73,8 \pm 1,91 E	47,2 \pm 1,12 F	573,14 \pm 39,47 D
C4	SD	78,6 \pm 1,91 E	43 \pm 1,12 F	589,28 \pm 39,47 D
C7	SD	75,6 \pm 1,91 E	42,4 \pm 1,12 F	550,4 \pm 39,47 D
CT	SD	40,8 \pm 1,91 A	30,2 \pm 1,12 B	357,94 \pm 39,47 A
CTM	SD	53 \pm 1,91 B	36 \pm 1,12 D	248,5 \pm 39,47 B
C	ST	62 \pm 1,91 D	40,2 \pm 1,12 E	534,44 \pm 39,47 D
C4	ST	64,4 \pm 1,91 D	38,6 \pm 1,12 E	527,7 \pm 39,47 D
C7	ST	61,8 \pm 1,91 D	40,4 \pm 1,12 E	526,64 \pm 39,47 D
CT	ST	42,4 \pm 1,91 A	28,8 \pm 1,12 A	385,46 \pm 27,91 A
CTM	ST	54 \pm 1,91 C	34,4 \pm 1,12 C	273,6 \pm 27,91 C

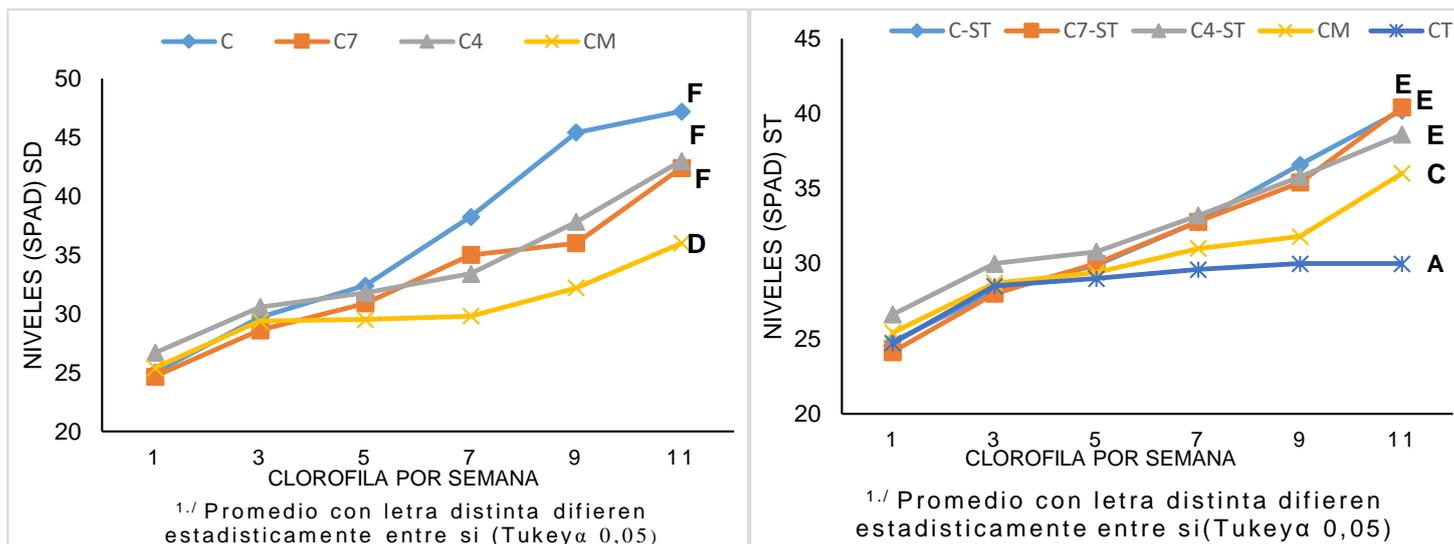


Figura 8. Concentración de clorofila de *Cajanus cajan* en simbiosis de *Rhizobium*-Micorriza en 11 semanas (tabla 1A).

4.1.1. Crecimiento

Con respecto a la variable de altura entre los tratamientos se visualizó un efecto positivo en el crecimiento de las plantas que estuvieron bajo la nutrición de SD que por el contrario de las plantas que estuvieron en tratamiento con ST. Por lo que se refiere al mejor desarrollo en crecimiento se pudo determinar que las plantas inoculadas con *Rhizobium* mejoraron su crecimiento por encima de los tratamientos sin inoculo (tabla 2), la cepa C4 en tratamiento de SD registro un porcentaje elevado en comparación a CT y CM en tratamientos de SD y ST concuerdan con los reportados por (Perez, 2019) afirma que las plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium* obtuvieron un incremento en el crecimiento de la altura comparándolas con las que no estuvieron inoculadas. (figura 9 y 10).

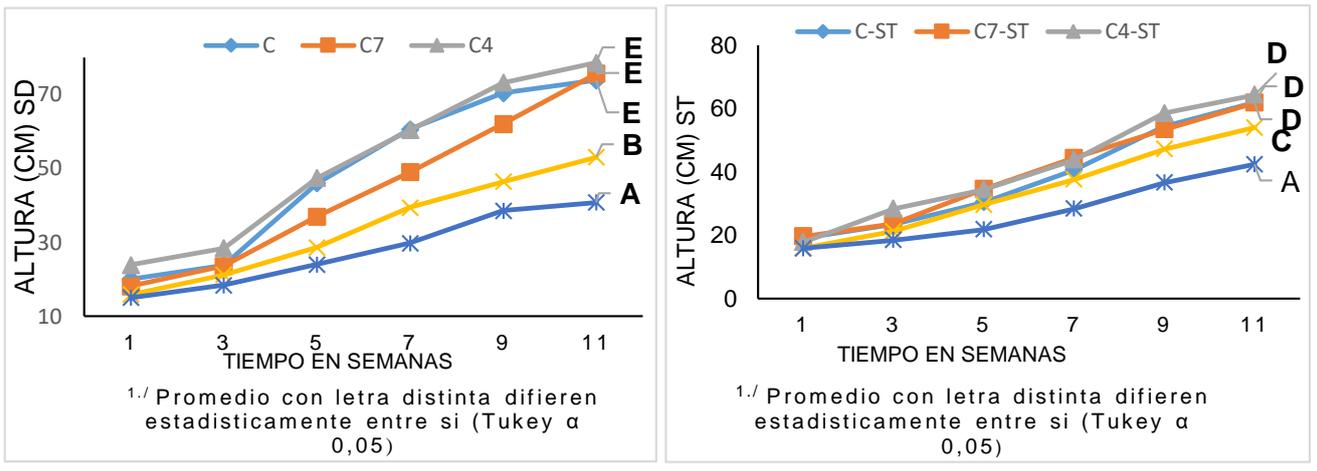


Figura 9. Diferencias en crecimiento en tratamientos de SD y ST (tabla 2A).

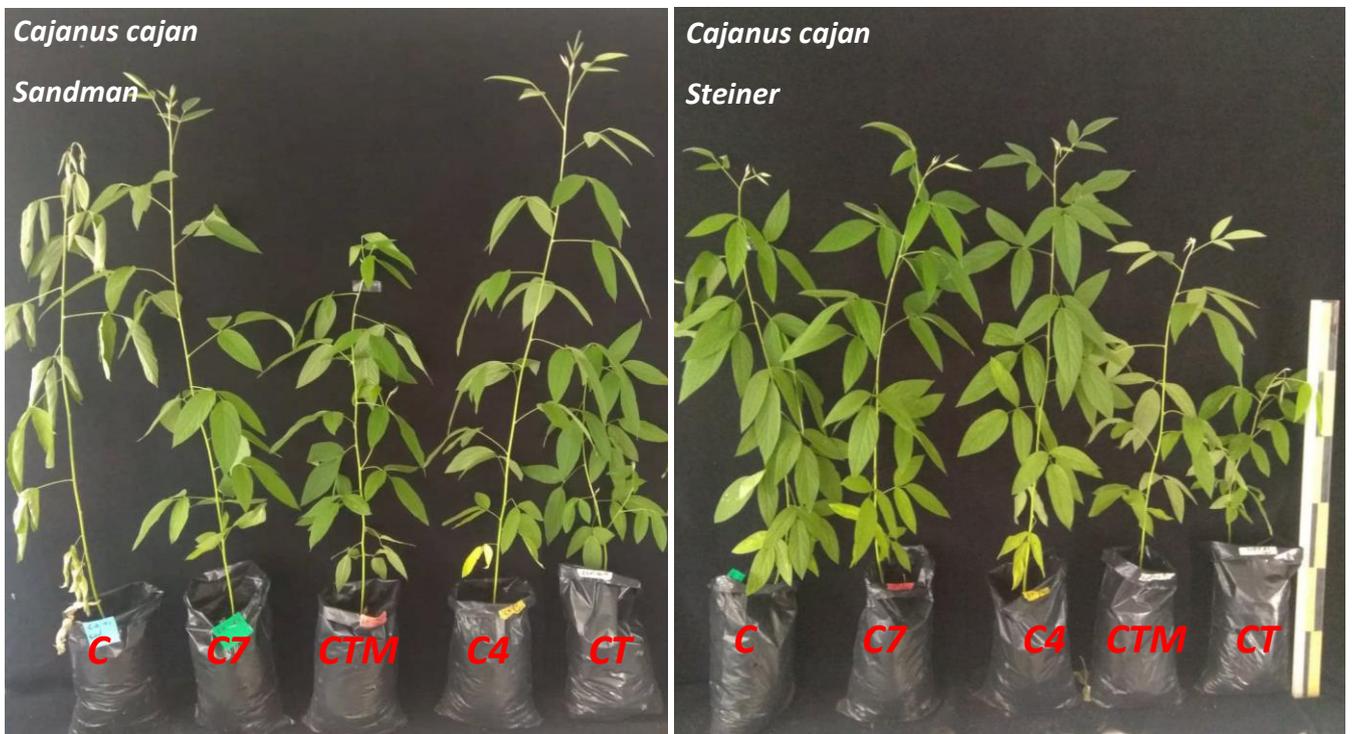


Figura 10. Longitud de plantas de frejol de palo con dos soluciones nutritivas en simbiosis de *Rhizobium*-Micorriza de 11 semanas.

4.1.2. Biomasa seca total generada por plantas de frejol de palo inoculadas con *Rhizobium*-Micorriza en tratamientos de SD y ST

Los resultados en base a biomasa total obtenidas de las plantas que crecieron en base a la solución nutritiva de SD y ST fueron muy buenos en rendimientos general sin embargo de todos estos el que obtuvo mayor biomasa fue C4 con SD en comparación con CT con SD (tabla2), (Quintana, 2016) indica que las plantas sometidas a condiciones de salinidad, redujeron el área foliar, así como otros componentes de crecimiento, debido, tal vez, al desajuste osmótico o al efecto tóxico, ocasionado por el NaCl (figura11).

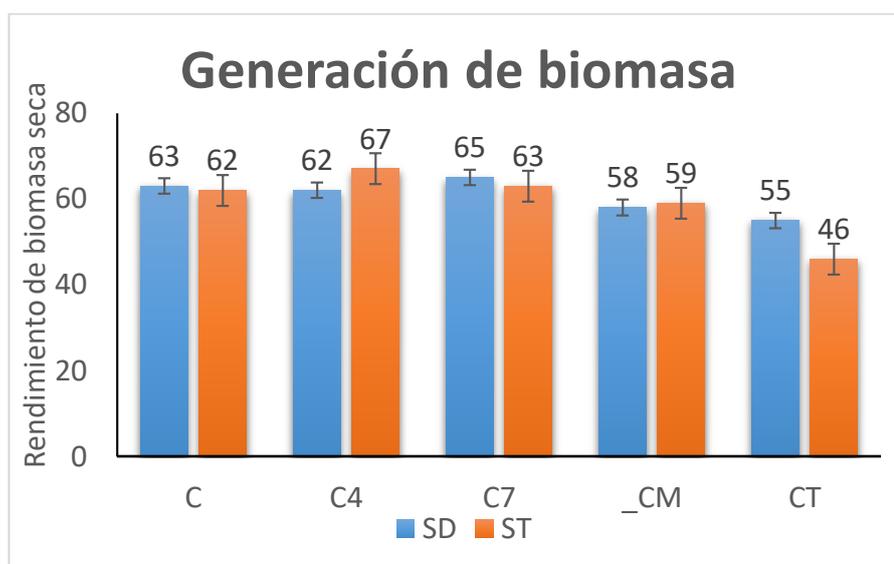


Figura 11. Biomasa total obtenida para ver el desarrollo general de *Cajanus cajan* (tabla3A).

Cuadro 3. Micorrización evaluadas en raíces y suelo.

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de

Cepas	TRATAMIENTO	% MIC	PROM E/100g S
C	SD	31,4± 1,06 D	195,6± 4,45 C
C4	SD	25,2± 1,06 C	204,6± 4,45 C
C7	SD	26± 1,06 D	190± 4,45 C
CT	SD	0± 1,06 A	0± 4,45 A
CTM	SD	24,6± 1,06 C	178,6± 4,45 B
C	ST	23± 1,06 C	192,8± 4,45 C
C4	ST	23,2± 1,06 C	185 ± 4,45 C
C7	ST	23± 1,06 C	179± 4,45 B
CT	ST	0± 1,06 A	0± 4,45 A
CTM	ST	21,4± 1,06 B	181± 4,45 B

Tukey (p<0,05); ± desviación estándar.

4.2. Promedio de micorrización en raíces de *Cajanus Cajan*

Por lo que se refiere a la micorrización en las raíces, se observó mayor número en las plantas que también estuvieron inoculadas con *Rhizobium*, con respecto a las tratamientos C,C4,C7 que estuvieron bajo el factor de SD alcanzaron niveles de micorrización mayores a 25 % en 11 semanas(tabla3), Dichos resultados son mejores que los de (Pachacama, 2011) quien obtuvo porcentajes máximos de 17% de micorrización en cultivos de *Hordeum vulgare* (Cevada). El tratamiento con mejores niveles de micorrización fue SD en comparación a los controles de cada tratamiento, donde se puede apreciar mejor rendimiento en las plantas inoculadas con los dos microorganismos (figura12 y 13).

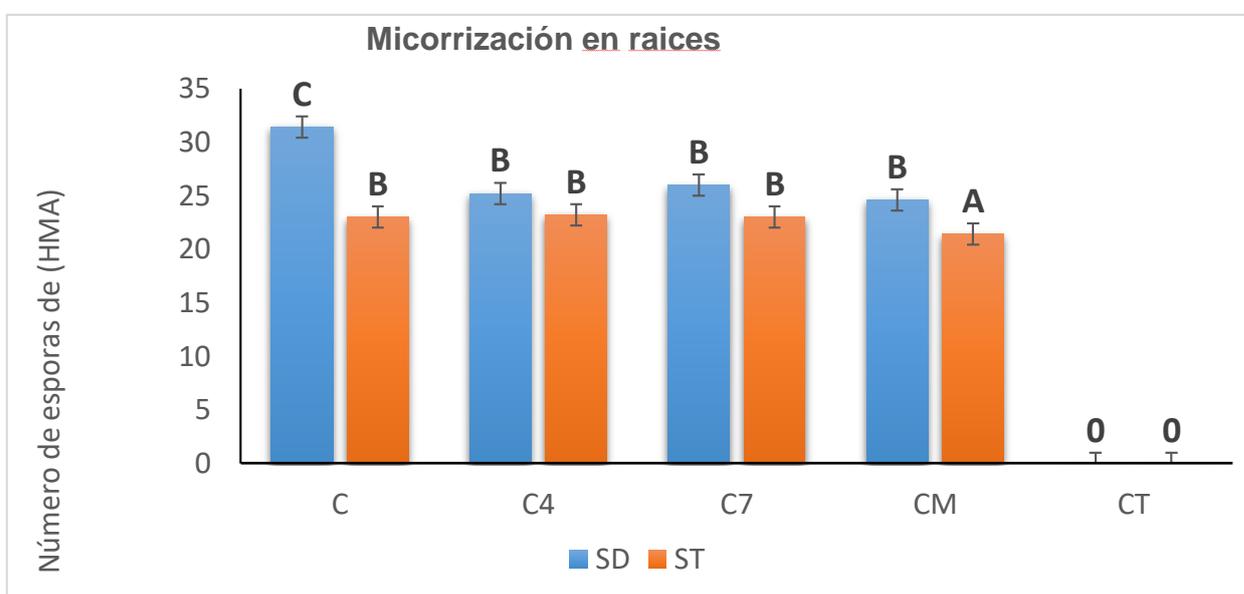


Figura 12. Porcentaje de micorrización en raíces de frejol de palo en simbiosis con *Rhizobium* en 11 semanas (tabla4A).

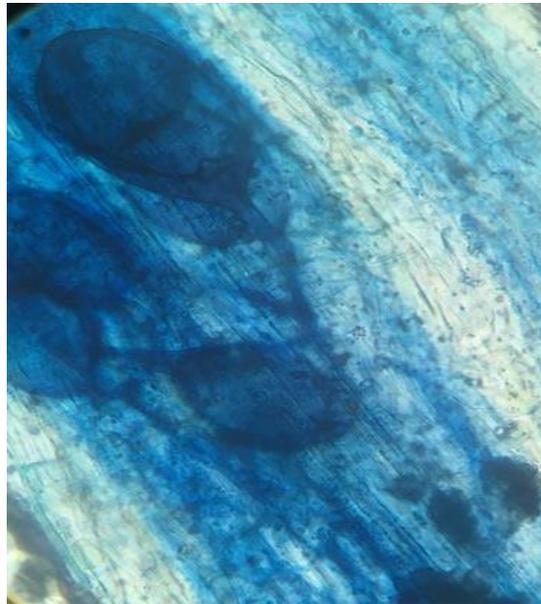
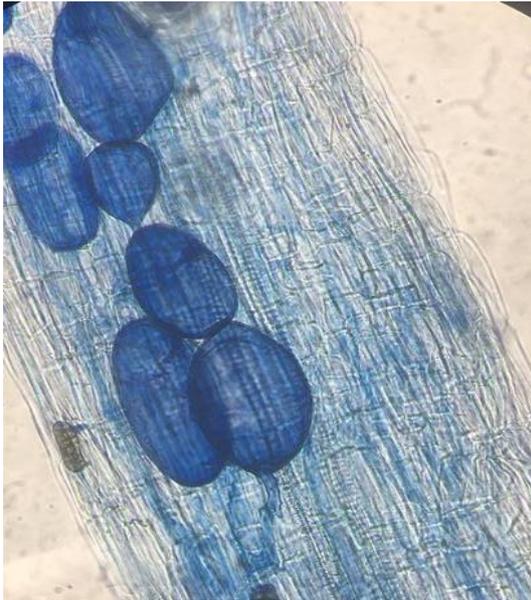


Figura 13. Estructuras infectivas de los HMA observadas a las 11 semanas experimentación con lente 40x en plantas de frejol de palo.

4.3. Población de micorrizas en 100g de suelo

Acercas de la población de hongos micorrícicos arbuscular (HMA) se realizó un conteo para determinar la población en 100 g de suelo, se encontró un promedio de más de 200 esporas en la cepa C4 del tratamiento SD (tabla 3), En comparación a (Pachacama, 2011) quien obtuvo 150 esporas de (HMA) por cada 100 g de suelo. Para los datos obtenidos de manera general se observa que no hay diferencia significativa de número de esporas en los tratamientos con inoculo de Rhizobium-Micorriza en comparación con los que solo tenían inoculo de micorriza que tuvieron menor cantidad de número de esporas (figura 14).

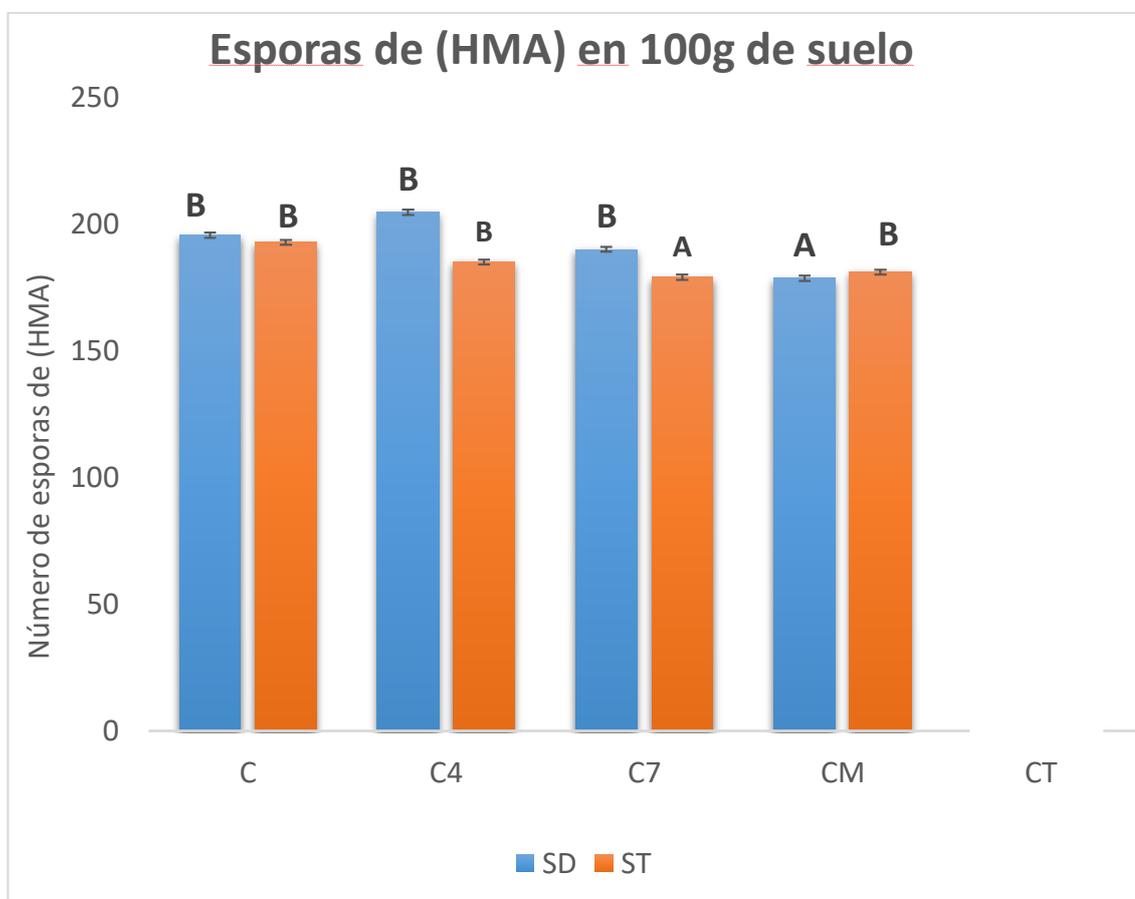


Figura 14. Número de esporas de HMA en 100g de suelo de cada tratamiento (tabla 5A).

4.4. Número de nódulos

Con respecto a los números de nódulos se realizó un conteo en la rizosfera en el que se pudo determinar que la cepa que tuvo un menor desempeño en la formación de nódulos fue la C7 con los factores de SD y ST con respecto a las cepas C4 y C que obtuvieron un promedio de 15 a 16 nódulos (tabla4) al momento de eliminación de la planta lo cual afirma lo descrito por (Pommeresche, 2017) que el rendimiento de la cepa de Rhizobium es bueno cuando esta presenta más de 15 nódulos.(figura15 y 16).

Cuadro 4. Numero de nódulos y micorrización evaluadas dentro de nódulos.

CEPAS	TRATAMIENTO	% MIC NODULOS	NUMERO DE NODULOS
C	SD	6,2± 0,27 C	16± 0,77 D
C4	SD	5,2± 0,27 C	15± 0,77 D
C7	SD	3 ± 0,27 B	11± 0,77 B
CT	SD	0 ± 0,27 A	0 ± 0,77 A
CTM	SD	0 ± 0,27 A	0 ± 0,77 A
C	ST	3 ± 0,27 B	13± 0,77 D
C4	ST	2,7± 0,27 B	12± 0,77 C
C7	ST	2,2 ± 0,27 B	10 ± 0,77 B
CT	ST	0 ± 0,27 A	0 ± 0,77 A
CTM	ST	0 ± 0,27 A	0 ± 0,77 A

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ($p < 0,05$); ± desviación estándar

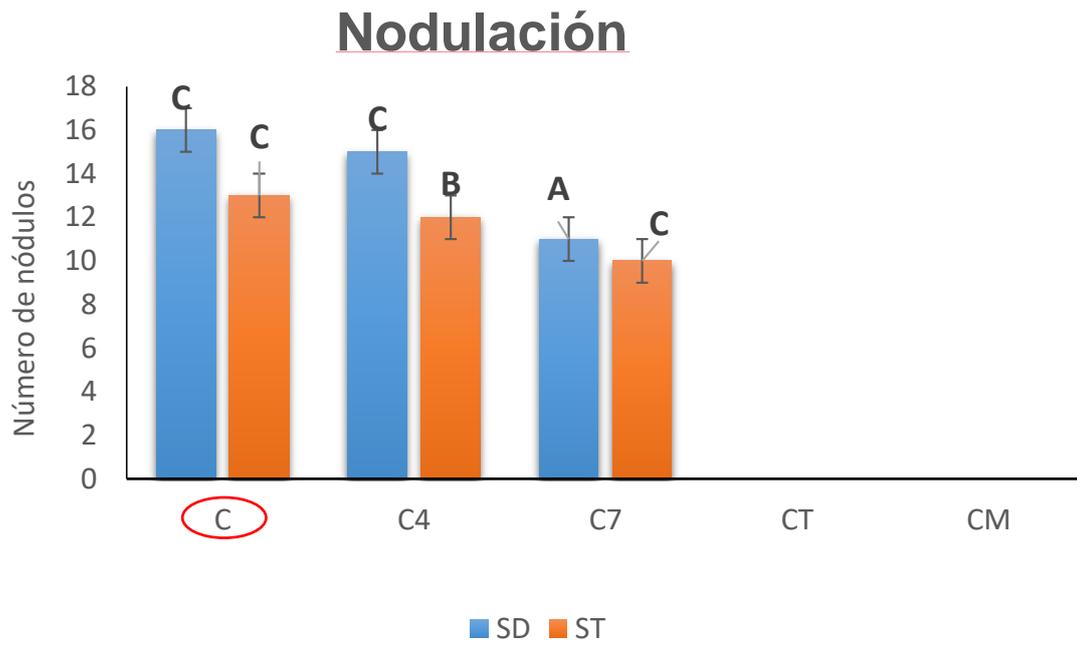


Figura 15. Promedio de numero de nódulos obtenidos de la onceava semana de cada tratamiento(tabla6A).



Figura 16. Nódulos removidos de sustrato para conteo.

4.5. Simbiosis *Rhizobium*-Micorriza

Por lo que se refiere a la simbiosis *Rhizobium*-Micorriza se obtuvo resultados muy eficaces logrando comprobar la simbiosis entre dichos microorganismos y *Cajanus cajan*, resultados que se pueden observar en el rendimiento de la planta como microscópicamente al encontrar esporas de (HMA) dentro de los nódulos de *Rhizobium* donde se pueden observar las vesículas del hongo dentro del nódulo haciendo un recorrido en circular por los bordes (figura17).

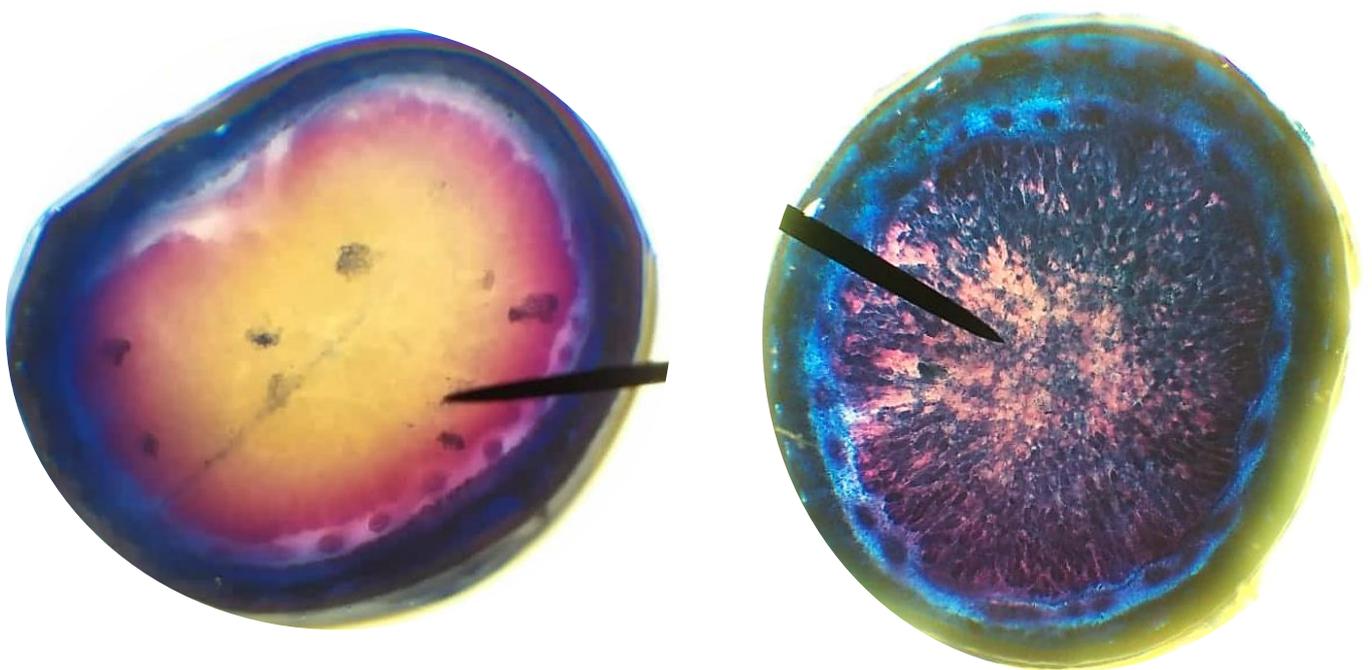


Figura 17. Vesículas de micorrizas dentro de nódulos de *Rhizobium*.

4.6. Conteo de esporas de (HMA) dentro de nódulos

En cuanto a la micorrización dentro de los nódulos de *Rhizobium* se pudo observar que la cepa C en tratamiento con SD obtuvo mejores resultados con un promedio de 6 vesículas de (HMA) en 10 nódulos (tabla 4) en comparación con el tratamiento ST y con la cepa C7 del tratamiento SD (figura 18).

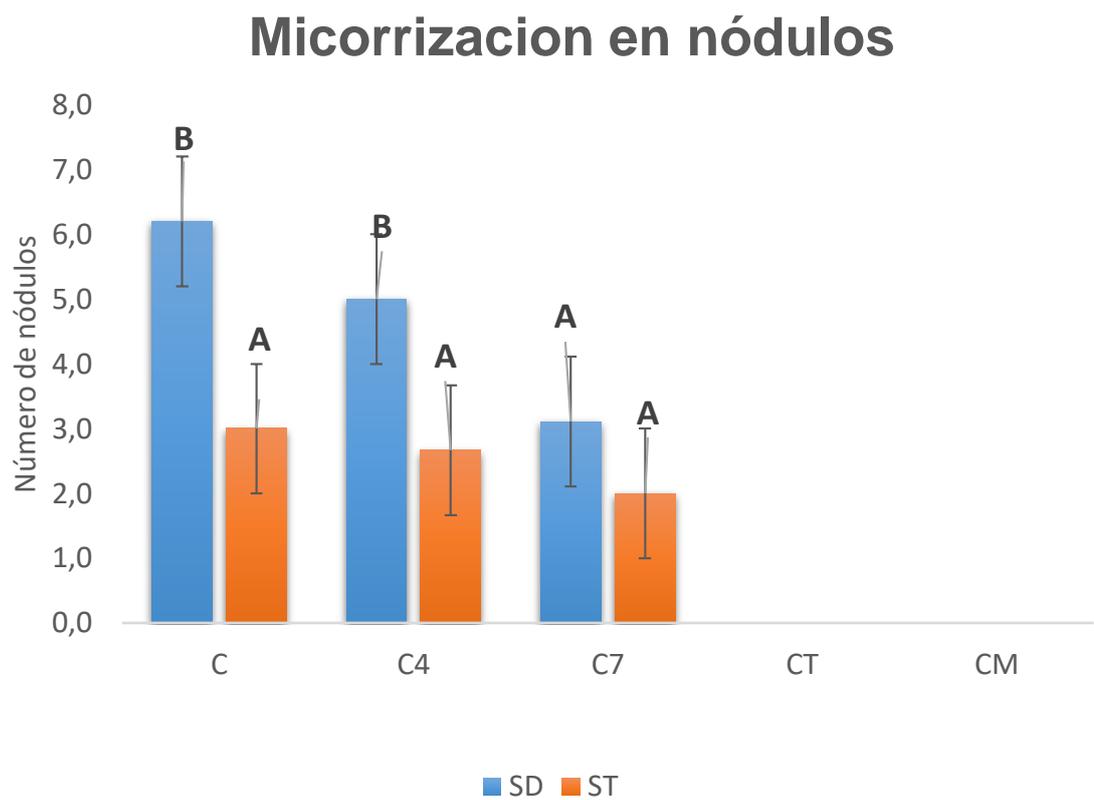


Figura 18. Promedio de vesículas de micorriza en cada 10 nódulos (tabla 7A).



Figura 19. Proceso de conteo de vesículas de (HMA).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.7. CONCLUSIONES

- Se pudo determinar la simbiosis *Rhizobium*-Micorriza en plantas de *Cajanus cajan*, al encontrar vesículas (HMA) dentro de los nódulos de *Rhizobium*.
- Las plantas inoculadas con *Rhizobium*-Micorrizas del tratamiento SD obtuvieron mayor desempeño en todos los parámetros agronómicos, respecto a los controles CT y CTM, al no estar inoculados de dicha simbiosis de microorganismos expresaron un desarrollo bajo.
- La cepa C4 tiene un gran potencial de productividad agronómico por su buen desarrollo de biomasa, altura y su adaptabilidad al trabajar en simbiosis con micorrizas.
- El consorcio *Rhizobium*-Micorriza mejora la capacidad de esporulación de micorrizas aumentando el número de esporas cuando se encuentra en simbiosis.

4.8. RECOMENDACIONES

- Continuar con la búsqueda de Cepas de *Rhizobium* que tengan mayor poder simbiótico con los HMA.
- Utilizar los beneficios de la simbiosis *Rhizobium*-Micorrizas como manejo en incremento de productividad de la agricultura y biorremediación de los suelos.
- Mejorar métodos de producción masiva de *Rhizobium* para usos en la agricultura.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Abed R , et al (2002). Diversidad microbiana de una esterilla microbiana muy contaminada y sus cambios en la comunidad tras la degradación de los compuestos de petróleo (*Applied and enviromental microbiology.*)
- Acuña S. (s.f.). *UNEP Centro de Investigaciones Agronómicas*. El uso de biofertilizantes en la agricultura. *UNEP Centro de Investigaciones Agronómicas*.
- Aguilera L , Olalde, Arriaga y Contreras. (2007). Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo Sum, Redalyc*, 1-8. Universidad Autonoma del estado de Mexico
- Alvarado. (2009). MANEJO DEL SUELO Y LA FERTILIZACION EN EL CULTIVO DE PAPA:EXPERIENCIAS DEL DMSA. Quito, Santa catalina, Ecuador.
- Arias E. (09 de 07 de 2010).MICROORGANISMOS EFICIENTES Y SU BENEFICIO PARA LA AGRICULTURA Y MEDIO AMBIENTE. *Journal de ciencia e ingeniería*
- Asociación vida sana. (s.f.). *Microorganismo en el suelo y biofertilizantes*.
- Barrer. (5 de Mayo de 2009). EL USO DE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES. Colombia.
- Caballero J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas. *Latinnoamerica Microbiología Mexico*
- Calvo S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Dialnet*
- Campaña C, Jerez, Viera y Bernal. (2004). Evaluación de sustratos como alternativas de portadores de la bacteria Rhizobium.Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina
- fernandez E. (2012). Respuesta de la simbiosis tripartita Rhizobium-Leguminosa-Micorriza arbuscular ante vanadio y níquel. *La Referencia Mexico*
- García I. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*. Argentina
- Gomero L ,Velásquez. (1999). Manejo Ecológico de Suelos. *Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímico. Peru*
- González G. (25 de 09 de 2008). Bacterias Solubilizadoras de Fósforo. RIZOBACTER ARGENTINA S.A.
- Grageda, Díaz, Peña y Vera. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas, Scielo*. Mexico
- Guadarrama C, Sánchez, Álvarez y Ramos. (2004). Hongos y plantas beneficios a diferentes escalas a micorrizas arbusculares.Revista Unam. Mexico

- Guerra B. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible .*Dialnet*. Universidad de la Rioja
- Higa y James. (s.f.). Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. *FUNDASES*
- Lewis y Klitgaard. (2002). Leguminosas del Sur de Ecuador *ResearchGate*. Ecuador
- Muñoz, Munive, Bustillas, Rocha. (2015). LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU IMPORTANCIA: Researchgate
- Nápoles, et al. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Scielo
- Pachacama. (18 de marzo de 2011). APLICACIÓN DE UN CONSORCIO DE HONGOS. Repositorio.espe Ecuador
- Perez. (2019). Respuesta del simbiosistema frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y *Rhizobium tropici* CIAT899 ante el efecto alelopático de *Ipomoea purpurea* L. Roth Responses of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and *Rhizobium tropici* CIAT899 symbiosystem to induced allelop. *Revista Argentina de Microbiología*, 47-55.
- Pommeresche, H. (2017). Examen de la actividad de los nódulos en raíces de leguminosas. *fertilcrop*
- Prieto, Agudelo y Varela. (1990). Efectos de varios inoculos de leguminosas en soya y frejol revistas Unal. *Colombia*
- Quintana. (2016). EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE FRÍJOL (*Phaseolusvulgaris* L.) CV ICA CERINZA, BAJO ESTRÉS SALINO . *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* , 87-95.
- Ramírez, Álvaro, Velázquez, Bedmar. (2016). Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica *CSIC*
- Restrepo, et al. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato. revista *Cnic*
- Rodas A, Pinochet. (13 de 12 de 2006). La Agricultura y Microorganismo .*Agricultura*
- Rodriguez. (1993). Manual de fertilización. Colección en Agricultura. En Donoso, *Coleccion en agricultura* (pág. 362). Santiago de Chile.
- Sánchez . (14 de 05 de 2019). Qué son los microorganismos: tipos y características .*Ecología Verde*
- Santillana A, Z. (2005). Capacidad de *Rhizobium* de promover el crecimiento .Scielo
- Sylvester, Kipe, Harris y Valencia. (Diciembre de 1987). Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).Colombia

- Valverde. (2009). MANEJO DEL SUELO Y LA FERTILIZACION EN EL CULTIVO DE PAPA:. Quito, Santa catalina, Ecuador.
- Vargas, & Villazante. (05 de 2014). Clasificacion de los Microorganismos. Revistas Bolivianas. Bolivia
- Vincent. (1970). *Manual for the practical study of root nodules bacteria*. Oxford.
- Viteri, Consenza y Rosas. (1992). CATALOGO DE CEPAS DE RHIZOBIUM Y BRADYRHIZOBIUM. ZAMORANO: ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

Anexos

Cuadro 1A. Análisis de varianza, Concentración de clorofila de *Cajanus cajan* en simbiosis de *Rhizobium*-Micorriza en 11 semanas.

Análisis de varianza

semana	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
11	clorofila	50	0,86	0,82	6,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1511,28	9	167,92	26,65	<0,0001
Cepa	1319,08	4	329,77	52,34	<0,0001
tratamientos	134,48	1	134,48	21,35	<0,0001
Cepa*tratamientos	57,72	4	14,43	2,29	0,0764
Error	252,00	40	6,30		
Total	1763,28	49			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,31448

Error: 6,3000 gl: 40

Cepa	tratamientos	Medias	n	E.E.				
CT	ST	28,80	5	1,12	A			
CT	SD	30,20	5	1,12	A	B		
CTM	ST	34,40	5	1,12		B	C	
CTM	SD	36,00	5	1,12			C	D
C4	ST	38,60	5	1,12			C	D E
C	ST	40,20	5	1,12				D E
C7	ST	40,40	5	1,12				D E
C7	SD	42,40	5	1,12				E F
C4	SD	43,00	5	1,12				E F
C	SD	47,20	5	1,12				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 2A. Análisis de varianza de la variable de crecimiento en SD y ST

semana	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
11	Altura (cm)	50	0,90	0,88	7,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7828,32	9	869,81	41,86	<0,0001
Cepa	6491,12	4	1622,78	78,09	<0,0001
tratamientos	691,92	1	691,92	33,30	<0,0001
Cepa*tratamientos	645,28	4	161,32	7,76	0,0001
Error	831,20	40	20,78		
Total	8659,52	49			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,65191

Error: 20,7800 gl: 40

Cepa	tratamientos	Medias	n	E.E	
CT	ST	42,40	5	2,04	A
CTM	SD	53,00	5	2,04	B
CTM	ST	54,00	5	2,04	B
C7	ST	61,80	5	2,04	B C
C	ST	62,00	5	2,04	B C
C4	ST	64,40	5	2,04	C D
C	SD	73,80	5	2,04	D E
C7	SD	75,60	5	2,04	E
C4	SD	78,60	5	2,04	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 3A. Análisis de varianza de la biomasa total obtenida para ver el desarrollo general de *Cajanus cajan*.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PSM T	60	0,70	0,65	20,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	905787,62	9	100643,07	12,92	<0,0001
Cepa	857403,94	4	214350,98	27,52	<0,0001
tratamientos	2876,80	1	2876,80	0,37	0,5461
Cepa*tratamientos	17855,74	4	4463,93	0,57	0,6834
Error	389429,78	50	7788,60		
Total	1295217,41	59			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=175,28482

Error: 7788,5957 gl: 50

Cepa	tratamientos	Medias	n	E.E.			
CT	SD	248,50	5	39,47	A		
CT	ST	273,06	10	27,91	A		
CTM	SD	357,94	5	39,47	A	B	
CTM	ST	385,46	10	27,91	A	B	C
C7	ST	526,64	5	39,47		B	C D
C4	ST	527,70	5	39,47		B	C D
C	ST	534,44	5	39,47			C D
C7	SD	550,40	5	39,47			C D
C	SD	573,14	5	39,47			D
C4	SD	589,28	5	39,47			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)

Cuadro 4A. Análisis de varianza del porcentaje de micorrización en raíces de frejol de palo en simbiosis con *Rhizobium*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% MIC	50	0,96	0,95	11,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5258,32	9	584,26	103,23	<0,0001
cepas	5013,92	4	1253,48	221,46	<0,0001
tratamiento	147,92	1	147,92	26,13	<0,0001
cepas*tratamiento	96,48	4	24,12	4,26	0,0058
Error	226,40	40	5,66		
Total	5484,72	49			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,03731

Error: 5,6600 gl: 40

cepas	tratamiento	Medias	n	E.E.			
CT	ST	0,00	5	1,06	A		
CT	SD	0,00	5	1,06	A		
CTM	ST	21,40	5	1,06		B	
C	ST	23,00	5	1,06		B	C
C7	ST	23,00	5	1,06		B	C
C4	ST	23,20	5	1,06		B	C
CTM	SD	24,60	5	1,06		B	C
C4	SD	25,20	5	1,06		B	C
C7	SD	26,60	5	1,06			C D
C	SD	31,40	5	1,06			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)

cuadro 5A. Análisis de varianza del número de esporas de HMA en 100g de suelo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROM E/100g S	50	0,99	0,98	6,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	287120,00	9	31902,22	321,76	<0,0001
cepas	285815,00	4	71453,75	720,66	<0,0001
tratamiento	462,08	1	462,08	4,66	0,0369
cepas*tratamiento	842,92	4	210,73	2,13	0,0955
Error	3966,00	40	99,15		
Total	291086,00	49			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=21,08321

Error: 99,1500 gl: 40

cepas	tratamiento	Medias	n	E.E.	
CT	SD	0,00	5	4,45	A
CT	ST	0,00	5	4,45	A
CTM	SD	178,60	5	4,45	B
C7	ST	179,40	5	4,45	B
CTM	ST	181,60	5	4,45	B
C4	ST	185,00	5	4,45	B C
C7	SD	190,40	5	4,45	B C
C	ST	192,80	5	4,45	B C
C	SD	195,60	5	4,45	B C
C4	SD	204,60	5	4,45	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

($p > 0,05$)

Cuadro 6A. Análisis de varianza del promedio de numero de nódulos obtenidos de la onceava semana de cada tratamiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
nodulos	50	0,95	0,94	22,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2110,50	9	234,50	79,49	<0,0001
cepas	2063,00	4	515,75	174,83	<0,0001
tratamiento	24,50	1	24,50	8,31	0,0063
cepas*tratamiento	23,00	4	5,75	1,95	0,1210
Error	118,00	40	2,95		
Total	2228,50	49			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,63665

Error: 2,9500 gl: 40

cepas	tratamiento	Medias	n	E.E.		
CT	SD	0,00	5	0,77	A	
CT	ST	0,00	5	0,77	A	
CTM	ST	0,00	5	0,77	A	
CTM	SD	0,00	5	0,77	A	
C7	ST	10,00	5	0,77		B
C7	SD	11,00	5	0,77		B
C4	ST	12,00	5	0,77	B	C
C	ST	13,00	5	0,77	B	C D
C4	SD	15,00	5	0,77		C D
C	SD	16,00	5	0,77		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)

cuadro 7A. Análisis de varianza del promedio de esporas de micorriza de cada 10 nódulos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CAMP OBSERVD U	40	0,94	0,92	21,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	167,38	7	23,91	65,96	<0,0001
cepas	123,28	3	41,09	113,36	<0,0001
tratamientos	27,23	1	27,23	75,10	<0,0001
cepas*tratamientos	16,88	3	5,63	15,52	<0,0001
Error	11,60	32	0,36		
Total	178,98	39			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,23349

Error: 0,3625 gl: 32

cepas	tratamientos	Medias	n	E.E.		
CT	SD	0,00	5	0,27	A	
CT	ST	0,00	5	0,27	A	
C7	ST	2,20	5	0,27		B
C4	ST	2,60	5	0,27		B
C7	SD	3,00	5	0,27		B
C	ST	3,00	5	0,27		B
C4	SD	5,20	5	0,27		C
C	SD	6,20	5	0,27		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)