

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“SELECCIÓN DE CEPAS DE RIZOBIO AISLADAS DE TREBOL NATIVO  
(*Trifolium amabile*), EN CONDICIONES DE SOLARIO E INVERNADERO,  
AYACUCHO 2750 msnm. 2009.”**

sis Para Obtener el Título Profesional de

**INGENIERA AGRONOMA**

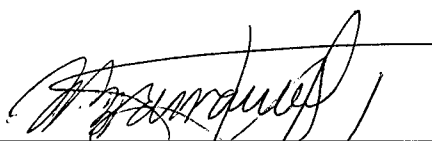
Presentado por  
**YESSENIA ATAUJE CAMASCA**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2011**

**“SELECCIÓN DE CEPAS DE RIZOBIO AISLADAS DE TREBOL  
NATIVO (*Trifolium amabile*), EN CONDICIONES DE SOLARIO  
E INVERNADERO, AYACUCHO 2750 msnm. 2009”**

Recomendado : 16 de mayo de 2011  
Aprobado : 03 de junio de 2011



**M.Sc. ING. FERNANDO NICOLÁS BARRANTES DEL AGUILA**  
**Presidente del Jurado**



**DRA. NERY LUZ SANTILLANA VILLANUEVA**  
**Miembro del Jurado**



**ING. WILFREDO DANIEL GONZALES GUZMAN**  
**Miembro del Jurado**



**BLGA. ROBERTA ESQUIVEL QUISPE**  
**Miembro del Jurado**



**M.Sc. ING. RAÚL JOSÉ PALOMINO MARCATOMA**  
**Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias**

## *DEDICATORIA*

*Quiero dedicarle este trabajo  
A Dios que me ha dado la vida y fortaleza  
para terminar este proyecto de investigación,  
A mis Padres Victoria y Roger por estar ahí cuando más los  
necesité y A mi hija Yhazumi Itzhel por darme valor y fortaleza  
en los momentos más difíciles.*

## AGRADECIMIENTO

*Quiero expresar mi agradecimiento*

*A mi Asesora de Tesis, Dra. Nery Santillana Villanueva por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.*

*Agradezco a Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones.*

*Esta tesis está dedicada a mis padres Victoria Camasca Guevara y Roger Atauje Crisostomo, a quienes agradezco de todo corazón por su amor, cariño, comprensión y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.*

*A mi esposo Alfredo por su cariño, comprensión y constante estímulo.*

*A mi hija Yhazumi Itzhel por su paciencia y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.*

*A mis hermanos Percy, Luis Miguel y Diana por el apoyo y la compañía que me brindan. Sé que cuento con ellos siempre.*

# INDICE

## INTRODUCCION

## CAPITULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

	PAGINA
1.1 ORIGEN DELTRÉBOL ( <i>Trifolium sp.</i> )	01
1.2 TAXONOMÍA	02
1.3 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	02
1.4 SUELO	04
1.5 IMPORTANCIA DEL TRÉBOL	05
1.6 NITRÓGENO EN LA PLANTA	05
1.7 ABSORCION DE NITROGENO POR LA PLANTA	06
1.8 FERTILIZACIÓN NITROGENADA	07
1.9 SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i> - LEGUMINOSA	08
1.9.1 GENERALIDADES	08
1.9.2 PROCESO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL N <sub>2</sub> Y FACTORES QUE AFECTAN	09
1.10 <i>Rhizobium</i>	12
1.11 LOS NÓDULOS	13
1.12 EFECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Rhizobium.</i>	16
1.13 MÉTODOS DE SELECCIÓN Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Rhizobium.</i>	18
1.14 SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i> EN CONDICIONES DE SOLARIO	20
1.15 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Rhizobium</i> EN CONDICIONES DE INVERNADERO	20

## **CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1	EN SOLARIO	22
2.1.1	UBICACIÓN	22
2.1.2	DESCRIPCIÓN DEL SOLARIO	22
2.1.3	TRATAMIENTOS	23
2.1.4	MATERIALES	23
2.1.4.1	Cepas de Rizobio	23
2.1.4.2	Plantas indicadoras	24
2.1.4.3	Solución nutritiva	24
2.1.4.4	Semillas	24
2.1.5	DISEÑO EXPERIMENTAL	24
2.1.6	INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO	25
2.1.6.1	Preparación de la solución nutritiva de Jensen	25
2.1.6.2	Desinfección de las semillas	26
2.1.6.3	Siembra e inoculación de las semillas pre-germinadas en los tubos de ensayo.	27
2.2	EN INVERNADERO	28
2.2.1	UBICACIÓN	28
2.2.2	CARACTERÍSTICAS Y PROCEDENCIA DEL SUELO	28
2.2.3	TRATAMIENTOS	30
2.2.5	MATERIALES	30
2.2.5.1	Cepas de <i>Rizobio</i>	30
2.2.5.2	Planta indicadora	30
2.2.5.3	Medio de cultivo	31
2.2.5.4	Semillas	31
2.2.6	DISEÑO EXPERIMENTAL	31
2.2.7	INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO	31

2.2.7.1 Siembra	32
2.2.7.2 Inoculación	32
2.2.7.3 Conducción del experimento	32
2.2.8 VARIABLES EN ESTUDIO	33
2.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34

### **CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1 EN CONDICIONES DE SOLARIO	35
3.1.1 TREBOL ROJO	35
3.1.2 TREBOL BLANCO	39
3.1.3 TREBOL NATIVO	42
3.2 EN CONDICIONES DE INVERNADERO	46
3.2.1 TREBOL ROJO	46
3.2.2 TREBOL BLANCO	50
3.2.3 TREBOL NATIVO	53

### **CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

4.1 CONCLUSIONES	59
4.2 RECOMENDACIONES	60
RESUMEN	62
LITERATURA CITADA	63
ANEXOS	69

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1:</b> Análisis Fisicoquímico de suelo procedente de la Comunidad de Ccarhuaccpampa.	29
<b>Tabla 3.1:</b> Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco y numero de nódulos de plantas de Trébol Rojo inoculadas con cepas de rizobio.	37
<b>Tabla 3.2:</b> Prueba de Duncan (0.05) de la altura, peso fresco, Peso seco y numero de nódulos de plantas de Trébol Rojo inoculadas con diferentes cepas de rizobio.	38
<b>Tabla 3.3:</b> Análisis de Variancia del Trébol Blanco inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de solarío.	40
<b>Tabla 3.4:</b> Prueba de Duncan (0.05) de plantas de Trébol Blanco inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de solarío.	41
<b>Tabla 3.5:</b> Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco y numero de nódulos de plantas de Trébol Nativo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de solarío.	44
<b>Tabla 3.6:</b> Prueba de Duncan (0.05) de plantas de Trébol Nativo inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de solarío.	45

<b>Tabla 3.7:</b> Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso Seco, peso raíz y numero de nódulos del Trébol Rojo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.	48
<b>Tabla 3.8:</b> Prueba de Duncan (0.05) de plantas de Trébol Rojo inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.	49
<b>Tabla 3.9:</b> Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso Seco, peso de raíz y numero de nódulos de Trébol Blanco inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.	51
<b>Tabla 3.10:</b> Prueba de Duncan (0.05) para la selección de cepas de rizobio en Trébol Blanco, en condiciones de invernadero.	52
<b>Tabla 3.11:</b> Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso Seco, peso de raíz y numero de nódulos de Trébol Nativo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.	54
<b>Tabla 3.12:</b> Prueba de Duncan (0.05) para la selección de cepas de rizobio en Trebol Nativo, en condiciones de invernadero.	55

## INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de los fertilizantes químicos ha conllevado a elevar los costos de producción de muchos alimentos y otros derivados de la agricultura, haciéndolos poco competitivos en el mercado. En la actualidad, para las explotaciones agropecuarias, es importante establecer un equilibrio, entre la rentabilidad económica, la productividad y la sustentabilidad ambiental.

La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de las plantas leguminosas 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 (URZÚA, 2000).

Numerosas variedades de especies gramíneas y leguminosas constituyen las principales fuentes de forrajes verdes en la sierra de las praderas alto andinas del Perú, especies como el trébol rojo, trébol blanco, trébol nativo y muchos otros que son de mucha importancia por su alta productividad, valor forrajero y su persistencia, aun bajo un intenso pastoreo. Los sistemas agrícolas se relacionan con las actividades microbianas que ocurren en el suelo, se destaca la asociación leguminosa – *Rhizobium*, cuyo resultado es la formación de nódulos en las raíces, en

las cuales, el nitrógeno atmosférico molecular es fijado a compuestos nitrogenados que las plantas utilizan para desarrollarse.

Uno de los factores para el éxito de su implantación es la presencia del *Rhizobium* adecuado, es decir que esté efectivamente inoculado con la cepa específica. Se sabe que las cepas de *Rhizobium* tienen diferentes grados de efectividad en la fijación del nitrógeno atmosférico, por ello la necesidad de seleccionar cepas de *Rhizobium* específicas, altamente efectivas y competitivas (BLÁSQUEZ, 1978).

Por las razones expuestas se realizó la presente investigación con el objetivo general de evaluar cepas de rizobio aisladas de trébol nativo (*Trifolium amabile*), en condiciones de solarío e invernadero.

Los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de 60 cepas de rizobio aisladas del trébol nativo (*Trifolium amabile*), utilizando como plantas indicadoras el trébol rojo (*Trifolium pratense*), el trébol blanco (*Trifolium repens*) y el trébol nativo (*Trifolium amabile*) en condiciones de solarío.
2. Evaluar la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de las cepas seleccionadas, en condiciones de invernadero, utilizando como plantas indicadoras el trébol rojo (*Trifolium pratense*), el trébol blanco (*Trifolium repens*), y el trébol nativo (*Trifolium amabile*) y suelo de Ccarhuaccpampa.

## **CAPITULO I**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **1.1 ORIGEN DELTRÉBOL (*Trifolium sp.*)**

Se piensa que el origen del trébol rojo se ubica en Asia Menor y en el Sureste de Europa. Según historiadores mencionados por HUGHES *et al.* (1974), citado por DURAND (2008), se ha cultivado en Europa desde el siglo III o IV D.C.

RUÍZ (1987), citado por DURAND (2008), indica que al Perú introdujeron hace aproximadamente 80 años, en la región de Cerro de Pasco y Junín, a través de los técnicos de la Copper Corporation y en el norte del país en la región de Porcón (Cajamarca), a través de los Gildemeister y SIPA. Posteriormente se sembraron nuevas variedades en las localidades de Ayacucho, Puno, Huancayo y Cajamarca (Convenios con los Gobiernos de Suiza, Holanda, Nueva Zelanda y Bélgica).

Según RZEDOWSKI y RZEDOWSKI (2001), el área de origen del trébol nativo (*Trifolium amabile*) está comprendida desde el norte de México a Costa Rica, hasta Sudamérica (Perú, Bolivia, Ecuador, Argentina - Trópicos); mientras el área de origen del trébol blanco (*Trifolium repens*), indicado por VILLASEÑOR y ESPINOSA (1998), es Europa y Mediterráneo.

## 1.2 TAXONOMÍA:

WILLIAMS (1987), describe la taxonomía del trébol (*Trifolium* sp.) de la siguiente manera:

Clase	: Angiospermas
Sub clase	: Dicotiledóneas
Orden	: Rosales
Familia	: Fabaceas o Leguminosae
Sub Familia	: Papilionaceas
Tribu	: Trifoliadas
Género	: <i>Trifolium</i>
Especie	: <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Trifolium amabile</i>

## 1.3 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

Según THOMAS (1987), el trébol rojo es una planta herbácea, formada por numerosos tallos, con hojas que nacen en una corona, las flores están formadas en cabezuelas (racimos compactos), el número de flores por inflorescencia puede variar de 100 a 130 por cabezuelas, su color suele definirse como rosa púrpura o granate. Las semillas son

pequeñas en forma de dedo pulgar, con una longitud de 1.5 a 2.5mm y color variable de amarillo oliva a púrpura. Los tallos y hojas son vellosos o tiene pubescencias, cada hoja está dividida en tres folíolos, generalmente con una mancha clara característica en el centro de cada folíolo. El trébol rojo tiene un sistema radicular pivotante, con muchas ramificaciones secundarias.

LANE (2000), indica que el trébol blanco (*Trifolium repens*) es una especie herbácea perenne. De porte rastrero, alcanza una altura de 10 cm. Su hábito estolonífero hace de ella una leguminosa de excelente adaptación al pastoreo en zonas templadas de todo el mundo. Se propaga por estolones y semillas. El sistema radicular es ramificado en su raíz principal, además presenta raíces adventicias de carácter estolonífero. Las hojas son pecioladas y trifoliadas; sus folíolos son ovales, con una mancha blanca, y sin ninguna vellosoidad (tampoco en pecíolos ni tallos). Los estolones se encuentran abrazados por estípulas membranosas de las hojas. Las inflorescencias son capítulos globulares de 1.5 a 2 cm de ancho, conteniendo de 50 a 200 flores blancas o blanco-rosadas. Estos capítulos se encuentran sobre un pedúnculo de 7 cm. Las flores son de tipo papilionáceo. Los frutos contienen tres o cuatro semillas en forma de corazón, sumamente pequeñas y de color variable del amarillo al marrón-rojizo. La semilla tiene forma redondeada con una protuberancia que coincide con la posición de la futura radícula. La cubierta seminal forma una gruesa capa suberizada alrededor de la

semilla. Presenta hilo: cicatriz correspondiente al antiguo punto de enganche a la pared del ovario.

*Trifolium amabile* es una planta perenne de raíz pivotante algo engrosada bien desarrollada; tallo sub erguido o procumbente; hojas compuestas trifoliadas, los folíolos anchamente ovoides, redondeados en el ápice, con pedicelo de 2mm de largo; estípulas acuminadas o mucronadas; inflorescencia en umbela simple con 8-14 flores de color rosado-rojizo; fruto en vaina subglobosa, redondeado-elíptico, con 1 ó 2 semillas (DURAND, 2008).

#### **1.4 SUELO**

El trébol rojo, gracias a su gran adaptabilidad, prospera en condiciones muy diversas, inclusive a pH extremos y a variada humedad; no obstante, prefiere los terrenos ricos en P, K y Ca (WILSIE, 1966, citado por DANIEL, 1995). Su mayor utilización es en corte, pudiendo ser al pastoreo. Agregan IBAÑEZ y AGUIRRE (1983), referido por DANIEL (1995), que el trébol se desarrolla óptimamente dentro de un pH 5.5 a 7.5.

El pH adecuado para el trébol blanco en suelos minerales está entre 5.8 y 6.0, mientras en suelos de turba de 5.5 a 5.8; es necesario asegurar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, incluidos los oligoelementos y evitar niveles tóxicos de Al intercambiable y Mn. El trébol blanco variedad Ladino necesita suelos fértiles, buena humedad, se ve perjudicada por las temperaturas bajas, en suelos ácidos responden bien

al encalado y al abono fosforado, SEGURA *et al* (1967), citado por BLÁSQUEZ (1978).

SCHIEL (1964), citado por BLÁSQUEZ (1978), menciona que si las cepas selectas en el laboratorio no responden en el campo en parecida medida debe corregirse los defectos edáficos.

### **1.5 IMPORTANCIA DEL TRÉBOL**

El género *Trifolium*, comprende aproximadamente unas 250 especies y tan solo 25 tienen importancia agrícola; son hierbas perennes y/o anuales, adaptadas casi a todos los climas frescos y húmedos (RODRIGUEZ, 1984).

Según BEINGOLEA (1975), referido por DANIEL (1995), el trébol es una fuente alimenticia especialmente segura y útil en proteínas para la alimentación animal; además valiosa para producir el heno, ensilaje y pasto verde, radicando su mayor importancia en la agricultura, como mejorador del suelo.

### **1.6 NITRÓGENO EN LA PLANTA.**

RODRIGUEZ (1984), señala que el N se encuentra en la planta cumpliendo importantes funciones bioquímicas y biológicas; es un elemento muy móvil, el N mineral ( $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4$ ) en el interior de las células, pasa a contribuir en la constitución de las bases nitrogenadas

para las distintas funciones fisiológicas. El N ingresa en la formación de los aminoácidos, a continuación, ingresan en la síntesis de los prótidos del vegetal, constituyéndose en un elemento plástico por excelencia. El mismo autor indica que el N se halla en la formación de hormonas, ácidos nucleídos y de la clorofila.

BLACK (1975), mencionado por CALDERÓN (2003), indica que después del agua, las proteínas son los constituyentes principales del protoplasma; desde el punto de vista del funcionamiento del N, las proteínas protoplasmáticas son importantes porque actúan juntos, no solo se auto sintetizan, sino que también sintetizan a los otros compuestos orgánicos de la planta.

### **1.7 ABSORCIÓN DEL NITRÓGENO POR LA PLANTA.**

GROS, *et al* (1981), citado por DANIEL (1995), indican que normalmente la planta no puede utilizar como nutriente el N del aire, menos el orgánico; absorbe el N por medio de las raíces en estado mineral (nítrico y/o amoniacal).

DUGGAN (2007), señala que las plantas pueden absorber el N tanto como amonio y como nitrato. Sin embargo, cuando lo hacen en forma de nitratos, deben luego reducirlos (a través de la enzima nitrato reductasa y con gasto de energía) a amonio y luego el amonio puede incorporarse en la biosíntesis de proteínas. El tipo de raíz y su

profundidad determinará la zona de aprovechamiento del N, considerando el riesgo de lixiviación que genera su gran movilidad en el suelo.

## **1.8 FERTILIZACIÓN NITROGENADA**

SELKE (1968), citado por DANIEL (1995), plantea que las leguminosas no son capaces de absorber el N directamente del aire, pero si mediante, la intervención de las bacterias radicícolas, que les facilita el aprovechamiento del N. después de haberse unido a las raíces.

Al realizar prueba sobre el efecto del nitrógeno en la nodulación, la FAO (1985), citado por DANIEL (1995), encontró que los altos niveles de N restringía el desarrollo de los nódulos; sin embargo, en los climas tropicales a menudo se usan pequeñas cantidades de fertilizantes nitrogenados para estimular el crecimiento vegetativo en leguminosas. Por su parte BOJORQUEZ (1974), indicado por DANIEL (1995), en un ensayo conducido en el IVITA (Huancayo) a 3,300 msnm., sobre niveles de N en pastos cultivados bajo pastoreo, halló que la adición de los abonos nitrogenados tienen sus respuestas más notables en los meses donde la temperatura es baja, debido a la inhibición de la actividad microbiana, por lo que están disponibles solo los elementos minerales aplicados al suelo.

En un estudio realizado del comportamiento de seis asociaciones de pastos cultivados para pastoreo, abonados y sin abonar en la puna de

Ayacucho a 3550 msnm., RUIZ y VOGEL (1974), mencionado por DANIEL (1995), obtuvieron rendimientos promedios conformados por el *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Trifolium repens* y *Trifolium pratense* (variedades Kenland y Lakeland), obteniéndose rendimientos de 4.229 (con abono) y 2.263 (sin abono) de Kg M.S./Ha/año.

Según DONAHUE, *et al.* (1981), citado por DANIEL (1995), la fijación simbiótica del N<sub>2</sub> por la bacteria, puede añadirse, dependiendo del tipo de leguminosa desde 50 a 280 Kg/Ha de N, lo que comúnmente es requerido por las plantas.

La cantidad de N<sub>2</sub> fijado, depende de la especie de planta y las condiciones edáficas como: aireación, humedad, pH, temperatura y niveles adecuados de Ca, K, Mo, Co y Se. Se reduce por la presencia de concentraciones elevadas del N soluble NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> o urea, (Universidad Politécnica – Cátedra XVI, 1982).

## **1.9 SIMBIOSIS *RHIZOBIUM* LEGUMINOSA.**

### **1.9.1 GENERALIDADES.**

IZAGUIRRE *et al.* (2007), señalan que la mayor contribución del proceso de fijación biológica del N<sub>2</sub> ocurre por la asociación simbiótica de plantas de la familia leguminosae con bacterias pertenecientes a diversos géneros (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y otros géneros recientemente descritos como simbioses como *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* y

*Phyllobacterium*); Asimismo, indican que la simbiosis puede ser ampliamente identificada por la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas.

RONALD (1993), citado por CALDERÓN (2003), menciona que la asociación *Rhizobium*- Leguminosa es responsable para que cerca del 40% de la fijación de nitrógeno se realice por medios biológicos; para que exista una alta fijación de nitrógeno se debe contar con ciertos factores que intervienen en la simbiosis de *Rhizobium* – leguminosa, como son: la efectividad, capacidad hospedante, factores del medio ambiente; así como los factores genéticos que determinan la compatibilidad entre la cepa de *Rhizobium* y la leguminosa; por su parte GATICA (2005), corrobora esta información indicando que la eficiencia de la fijación de N<sub>2</sub> por simbiosis, es principalmente una función del genotipo del hospedero, del genotipo del *Rhizobium* y de factores ambientales.

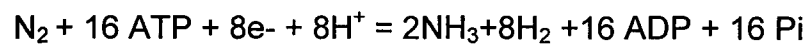
### **1.9.2 PROCESO DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL N<sub>2</sub> Y FACTORES QUE AFECTAN**

MADIGAN *et al.* (1997), Entre otros, indican que la fijación biológica del N<sub>2</sub> en leguminosas es un proceso altamente complejo y que incluye múltiples etapas; inicialmente las semillas en germinación exudan diversas moléculas, unas atraen químicamente a los rizobios, otras estimulan el crecimiento de las bacterias en la rizósfera de la planta hospedera y otras activan diversos genes de la bacteria responsables por el inicio de la nodulación. Los genes de nodulación activados inducen a la

bacteria a producir otras moléculas que a su vez activan genes de la planta hospedera responsable por dar continuidad al proceso de nodulación. Se establece entonces un verdadero diálogo entre la bacteria y la planta hospedera, incluyendo la activación de varios genes y desencadenando procesos específicos que permiten a la bacteria entrar en la raíz, formar un cordón de infección y provocar el crecimiento de las células del córtex de la planta hospedera hasta la formación del nódulo, la bacteria pasa por una serie de transformaciones como la pérdida de los flagelos. Diversas enzimas son sintetizadas, destacándose la nitrogenasa responsable por el proceso de fijación del  $N_2$  propiamente dicho, además de las proteínas necesarias para el funcionamiento perfecto de la nitrogenasa y de los procesos metabólicos de la bacteria. Una proteína característica de la simbiosis es la leghemoglobina, cuya función es semejante al de la hemoglobina de la sangre humana, o sea, del transporte del oxígeno en las concentraciones necesarias. La simbiosis se manifiesta por la aparición de nódulos en las raíces, donde se albergan las bacterias.

En los nódulos el amonio sintetizado son rápidamente incorporados, iones hidrogeno ( $H^+$ ) abundantes, en las células de las bacterias, ocurriendo la transformación a iones amonio ( $NH_4^+$ ) que son distribuidos para la planta hospedera e incorporados en diversas formas de N orgánico, como los ureidos, aminoácidos e amidas (IZAGUIRRE *et al.* 2007).

La fijación simbiótica de Nitrógeno (FSN), producto de la asociación *Rhizobium* – Leguminosa consiste, a grandes rasgos, en la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> por acción de la enzima nitrogenasa y su incorporación a la biósfera. La fórmula que expresa esta reacción bioquímica es la siguiente:



En términos globales, la importancia de la FSN radica en que puede aportar anualmente 80 x 10<sup>6</sup> toneladas de N a la biosfera, aproximadamente (GATICA, 2005).

CUBERO (1983), mencionado por DANIEL (1995), indica que la presencia del N mineral en el suelo, afecta a la fijación, en parte al causar una rápida senescencia en el nódulo; algunas formas como nitrato, son más inhibitoras que otras. La falta de nodulación y fijación del N<sub>2</sub> en un determinado suelo, puede deberse a la micro flora que existe, las estirpes ineficaces del *Rhizobium*, compiten con los eficaces; por consiguiente este efecto, reduce la nodulación. En otros casos, las estirpes ineficaces provocan la nodulación, pero no fijan el nitrógeno (FAO, 1978).

Los factores ambientales como acidez (menor a 4.5), toxicidad de aluminio y manganeso, disponibilidad de fósforo en el suelo, temperatura ambiente y competencia con cepas nativas, afectan significativamente la capacidad de nodulación y fijación biológica del nitrógeno (GRAHAM, 1990).

El nitrógeno combinado y, en particular el nitrato retardan la formación de nódulos. Así, se ha observado que cuando se inoculó soya en un suelo con alto contenido de niveles de  $\text{NO}_3$ , con una cepa efectiva de *Bradyrhizobium japonicum*, las plantas no inoculadas no producían nódulos, mientras que el inicio de la nodulación se atrasó en las plantas inoculadas. La nodulación ocurrió entre el día 42 y 62 después de la siembra, coincidiendo con la disminución del  $\text{NO}_3$  en el perfil del suelo (BARRIENTOS *et al.* 1995), asimismo los mismos autores señalan que el desarrollo de la parte aérea afecta la fijación de nitrógeno, ya que la formación, desarrollo y funcionamiento de los nódulos depende de los fotosintatos para su funcionamiento

### **1.10 *Rhizobium***

ROMERO (1994), citado por IZAGUIRRE (2007), menciona que un rizobio tiene los siguientes caracteres distintivos: bacilos Gram negativos de tamaño mediano que miden de 0.5 a 0.9 micras de ancho por 1.2 a 3 micras de largo, no esporulados, aerobios, heterótrofos, son móviles y usan carbohidratos produciendo a veces ácido pero no gas, se desarrollan muy pobremente en agar glucosa peptonado, lenta pero decididamente mejor en un medio de agar con extracto de levadura, malta y otras materias vegetales para dar colonias características, por lo general acuosas o blancas; pueden reducir los nitratos a nitritos, pero no aprovechan los nitritos, temperatura óptima es de 25 – 30°C.

FERRERA (1993), citado por DURAND (2008), manifiesta que la capacidad para formar nódulos por las leguminosas es una prueba concluyente para identificar a un *Rhizobium*, es la base mas aceptable para la ubicación taxonómica de su género, el conocimiento microbiológico y bioquímica de las especies del género *Rhizobium* permite reconocerlas y agruparlas con base en su actividad y comportamiento en los diferentes medios de cultivo; el mismo autor señala que las bacterias del género *Rhizobium*, Familia Rhizobiaceae, son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos, que están en una misma clasificación en virtud de su capacidad para nodular plantas del grupo leguminosae.

### **1.11 LOS NÓDULOS**

CIAT (1987) y otros indican que los nódulos son el asiento principal del proceso de fijación de nitrógeno, y que son de tamaño y forma variable según las plantas (especies); asimismo indican que la forma de un nódulo es constante para cada especie de planta y depende de la ubicación del meristemo respectivo, así el resultado de la actividad de un meristemo nodular apical son las formas alargadas o cilíndricas (alfalfa, arveja, tréboles), de un meristemo desigual de múltiple localización (*Lupinus*, etc.), de un meristemo continuo, esféricos (soja). Ellos mencionan que la forma y distribución de los nódulos en las leguminosas anuales son : grandes, carnosos, esféricos, periformes, claviformes o

flavelados, aislados o distribuidos en el sistema radicular, ya sea en las raíces exomorfas o laterales, y que las plantas perennes tienden a producir nódulos pequeños, alargados y arracimados muy distribuidas en las partes jóvenes del sistema radicular, formando numerosos nódulos; el numero de nódulos de una planta oscila entre algunas unidades y varios millares; concluyendo que la simple presencia de nódulos no es garantía de una fijación suficiente de nitrógeno.

La nodulación da una idea de la actividad del *Rhizobium*; las cepas efectivas forman nódulos en las raíces principales, primaria y corona, con nódulos grandes, rosados y con buena cantidad de leg-hemoglobina y relativamente poco numerosos fijan buena cantidad del N; lo que no sucede con las cepas inefectivas, que producen nódulos pequeños, blancos y redondos, ubicados en las raíces laterales, no fijan el N y/o fijan muy poco (MACKIE, 1970, citado por BLÁSQUEZ ,1978).

RONALD (1993), citado por CALDERÓN (2003), señala que los nódulos pueden ser de dos tipos, dependiendo de la especie hospedante: determinada e indeterminada. Por su parte GRAN (1989), indica que los nódulos determinados tienen un meristemo de vida corta y son de forma esférica. Los nódulos indeterminados tienen un meristemo persistente y son de forma alargada y pueden ser ramificados.

FREIRE (1964), citado por IZAGUIRRE (2007), indica que realizó un experimento en condiciones de campo para demostrar el efecto de la nodulación en el trébol subterráneo, al mismo tiempo ensayar la eficiencia de varios inoculantes; encontrando que la nodulación no presentaban diferencias marcadas entre tratamientos; en las parcelas testigo, encontró nodulación debido a la difusión del inoculo y/o por la existencia de las razas nativas, excepto en algunas que no mostraron formación de nódulos.

GOI (1992), mencionado por DOBEREINER (1997), señala que sin excepción las leguminosas pueden emplear el N del suelo efectivamente, aunque parece que existe alguna especialización entre leguminosas para el amonio y el nitrato; mientras CARROLL (1985), citado por DURAND (2008), menciona que cuando la leguminosa esta suministrada con suficiente N (fertilizante o del suelo), la nodulación es suprimida; en leguminosas ya noduladas se inhibe la fijación de  $N_2$ , constituye un aspecto esencial de la simbiosis leguminosa - *Rhizobium*, el cual evita que los rizobios se vuelven parasíticos. Se han creado leguminosas sin la capacidad de regular su fijación de  $N_2$ , mediante mutaciones genéticas con métodos químicos, y se aprecia el alto costo de la nodulación descontrolada en estos genotipos.

## 1.12 EFECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS CEPAS DE *RHIZOBIUM*

Para que exista una clara fijación de nitrógeno se debe contar con ciertos factores que intervienen en la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa, como son la efectividad, capacidad hospedante, factores del medio ambiente, así como factores genéticos que determinan la compatibilidad entre la cepa de *Rhizobium* y la leguminosa.

URZÚA (2000), menciona las propiedades de las simbiosis:

**a) Especificidad**, o propiedad por la que el microbio infecta selectivamente a la planta hospedadora. La magnitud de la misma varía de unas simbiosis a otras, y así, por ejemplo, ciertas leguminosas tienen requerimientos muy concretos para “su rizobio”, mientras que otras aceptan un espectro más amplio, y, viceversa, un determinado rizobio puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de 27 especies, o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias. MEGIAS *et al.* (1993) señalan que los genes nod ABC son los responsables por la especificidad hospedera. Estos genes están involucrados en la síntesis y transporte de pequeñas moléculas de lipopolisacáridos que son reconocidos de una manera específica por la planta hospedera. Otros autores como BRELLES Y BOIARDE (1992), citados por SANTILLANA (1995), indican que las lectinas del hospedero y varios metabolitos de bajo peso molecular contribuyen en la especificidad hospedera. Se propone que la lectina producida por el trébol sea una proteína que sirva

de puente entre carbohidratos similares de la superficie de los pelos radiculares de la planta y del rizobio, por su parte DENAIRE *et al.* (1996), indica que la variabilidad en la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno de las cepas en combinación con los diferentes genotipos de plantas puede estar relacionada con la alta especificidad hospedera que presentan algunas cepas de rizobio.

**b) Infectividad**, o capacidad del microbio para invadir la planta hospedadora.

**c) Efectividad**, o capacidad para que en el nódulo se lleve a cabo la secuencia de un proceso que conduzca a la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco. Hay una gran variedad entre las razas de microbio infectivo, que va desde totalmente infectivo, a otras altamente infectivas.

Según SILVESTER *et al.* (1987) una cepa es efectiva (habilidad para fijar N) cuando ésta presenta infectividad (habilidad para infectar las raíces de las plantas), persiste y crece en el suelo, tolera las condiciones locales, compite por sitios de infección con otros organismos de la rizosfera y, manifiesta estabilidad genética; por su parte MADIGAN *et al.* (1997), señala que las cepas efectivas forman nódulos mayores, rojizos, y fijan nitrógeno atmosférico; mientras que las cepas no efectivas forman nódulos de menor tamaño, color verde blancuzco y sin capacidad de fijar nitrógeno. Estos nódulos se ubican en todo el sistema radicular en mayor cantidad (sin pigmento leg-hemoglobina).

FREIRE (1992), indica que de cinco cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, dos cepas fueron efectivas en una sola especie de trébol, otras dos cepas, en dos especies de trébol y una sólo cepa fue efectiva en tres variedades de trébol. Asimismo, el mismo autor encontró que dos cepas aisladas de *Trifolium subterraneum* y *Trifolium fragiferum* respectivamente, no formaron nódulos en *Trifolium riograndense*. De la misma forma se señala la variabilidad de comportamiento entre cepas de *Rhizobium* en una misma especie o cultivar. El mismo autor señala que de cinco especies de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii evaluadas en plantas de *Trifolium repens*, sólo dos, fueron efectivas y tres fueron inefectivas. Asimismo ANDRADE (1986) encontró que el 68% de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii aisladas presentaron baja efectividad, 24% mediana efectividad y sólo el 8% presentó buena efectividad cuando fueron evaluadas en *Trifolium riograndense*. Las diferencias entre las cepas de rizobio en cuanto a la eficiencia fijadora de N<sub>2</sub> puede deberse a que algunas cepas poseen el sistema enzimático hidrogenasa, que puede reciclar el H<sub>2</sub> liberado durante la reducción del N<sub>2</sub>, aumentando así la eficiencia energética del sistema tal como informan PALACIOS *et al.* (1990) y FERNÁNDEZ *et al.* (2005).

### **1.13 MÉTODOS DE SELECCIÓN Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LAS CEPAS DE RHIZOBIUM.**

Los métodos y criterios de selección y evaluación de las cepas de rizobio empleados en otros países son muy semejantes al utilizado en el

Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Pastos, puesto que muchos de los criterios y métodos utilizados actualmente provienen de otros países y lo que el laboratorio a hecho es integrarlo y adecuarlo a sus condiciones.

SCHIEL (1964), señala que la selección de cepas de *Rhizobium* se realiza en cultivos artificiales, que permiten poner en manifiesto la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas que compiten, no se hace selecciones en el campo, porque dice que los resultados no pueden hacerse extensivos a todo el país, que solo conseguirá seleccionar suelos para que prospere cepas adaptadas a condiciones óptimas, menciona que si las cepas selectas en el laboratorio no responden en el campo debe corregirse los defectos edáficos. El mismo autor informa que, la selección se realiza iniciando una pre-selección que incluye una prueba de virulencia y observaciones del crecimiento de las plantas, como color, vigor, nodulación, calidad de nódulos, cantidad de leg- hemoglobina, porcentaje de nitrógeno de la parte aérea y la cantidad total de proteína.

HERRERA Y ZEMELMAN (1965), citado por BLÁSQUEZ (1978), mencionan que la selección de cepas de *Rhizobium* se realiza en tres lugares: en el laboratorio, en el invernadero y en el campo, o sea la primera selección en el laboratorio en base a cultivos en agar, se usa el peso verde sin método estadístico para medir la eficiencia, para separar las mejores y pasar al invernadero, en esta etapa recién se hace el

análisis estadístico, después las mejores del invernadero se pasan al campo, y ahí es donde se realizan todas las repeticiones, la evaluación lo realizan por el peso seco de la parte aérea, porcentaje de nitrógeno y la cantidad de nitrógeno total.

#### **1.14 SELECCIÓN DE CEPAS DE *RHIZOBIUM* EN CONDICIONES DE SOLARIO.**

Además de la verificación de la pureza en el laboratorio y habilidad de formar nódulo, una gran colección de cepas puede ser dividida rápidamente (6 a 8 semanas), en cepas buenas y malas en lo que respecta a la fijación del nitrógeno, utilizando el método de “cultivos en tubos”, que permite la comparación de un gran número de cepas con todas las probables plantas huésped, el peso verde de la planta da alguna idea de la habilidad de cada cepa de fijar nitrógeno, para una planta huésped en particular.

#### **1.15 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE *RHIZOBIUM* EN CONDICIONES DE INVERNADERO.**

GARCIA (1979), señala que en el desarrollo de las plantas, se toman en cuenta: la altura y color de las plantas, y no así el número de hojas por ser trabajoso y requerir tiempo para su conteo. La cantidad de peso seco de la parte aérea, por ser una medida indirecta del nitrógeno fijado por la simbiosis. El porcentaje de nitrógeno, que indica el contenido real de nitrógeno fijado por la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, pero

para su análisis requiere: laboratorio, personal, material, equipo especializado y tiempo, es recomendado solo en lugares en que se tenga estas facilidades. La formación de nódulos es un criterio sumamente importante para evaluar la efectividad de las cepas, el mismo autor indica que se debe considerar sólo el porcentaje de plantas noduladas, ubicación de nódulos Leg-hemoglobina y cantidad relativa de nódulos; y no así el número y peso seco de los nódulos, por ser dificultoso o inexacto y tener problemas en el muestreo y contaje de nódulos.

La eficiencia de las cepas de rizobio es evaluada directamente a través del contenido de N-total o indirectamente por la medida del peso de la materia seca de la planta. Generalmente las cepas con alta actividad fijadora de nitrógeno, determinan mayor producción de materia seca y/ mayor concentración de N-total. KOZUSNY-ANDREANI (2000) y URZÚA *et al.* (2001) encontraron alta correlación de N-total de las plantas con la materia seca.

Aunque las características de nodulación no están directamente relacionadas con la fijación de nitrógeno y que para cada combinación leguminosa – rizobio el nivel óptimo de nodulación es diferente, estas evaluaciones son útiles cuando se analizan conjuntamente con otros criterios. Por lo general el valor de la masa seca de nódulos es directamente proporcional a la eficiencia de la fijación de nitrógeno (ARAUJO, 1994 y RODRÍGUEZ *et al.* 2004).

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 EN SOLARIO**

##### **2.1.1 UBICACIÓN**

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería (PIPG) de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, ubicado en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho a una altitud de 2750 msnm.

##### **2.1.2 DESCRIPCIÓN DEL SOLARIO**

El solarío tiene las siguientes dimensiones: 100cm de largo, 50cm de ancho y 86cm de altura; la cual tiene 6 divisiones, en ambos lados de cada división presentan lámparas fluorescentes de 30 Watts que permite una iluminación homogénea, al centro de cada división se colocó una gradilla de madera con capacidad para 36 tubos de 25 x150mm, lugar en la cual se desarrollaron las plantas.

La temperatura del solarío se mantuvo entre 18 y 23 °C. Cabe indicar que el laboratorio careció de un regulador automático de temperatura y para mantener un ambiente favorable durante las 24 horas se prendieron los fluorescentes de noche y se apagaron de día.

### **2.1.3 TRATAMIENTOS**

- ☞ 61 cepas de rizobio aisladas de Trébol nativo (*Trifolium amabile*).
- ☞ 03 especies de trébol: Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y Trébol nativo (*Trifolium amabile*).
- ☞ 01 Control sin inocular.

### **2.1.4 MATERIALES**

#### **2.1.4.1 Cepas de Rizobio**

Las cepas de Rizobio, fueron aislados del trébol nativo (*Trifolium amabile*), procedente de los pastizales de la comunidad de Ccarhuaccpampa, del distrito de Paras, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho. Los nombres de los pastizales se indican a continuación: Elkani (E), Huillcani (H), Melqui (M) y Qesera (Q).

Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E13, E14, E15, E17, E19, E20, E21, E22, E23, E24, H1, H2, H3, H6, H11, H15, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M15, M16, M25,

Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q10, Q11, Q13, Q15, Q16, Q20, Q22, Q23, Q25, Q27, Q28.

#### **2.1.4.2 Planta indicadora**

Como planta indicadora se utilizaron: Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y el Trébol nativo (*Trifolium amabile*); se implantó dos plantas/ tubo.

#### **2.1.4.3 Solución nutritiva**

Se utilizó la Solución nutritiva de Jensen

#### **2.1.4.4 Semillas**

Se utilizaron semillas de: Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y el Trébol nativo (*Trifolium amabile*); estas semillas fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA-Ayacucho).

#### **2.1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El experimento fue conducido en el diseño Completamente al Azar con tres repeticiones por tratamiento. Los análisis estadísticos, con los resultados de las variables evaluadas, se procesaron realizando los análisis de variancia (ANVA) y la prueba de significación de Duncan para observar diferencias entre tratamientos.

## 2.1.6 INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

### 2.1.6.1 Preparación de la solución nutritiva de Jensen.

Para la siembra de plantas en tubos se utilizó la solución nutritiva de Jensen, cuya composición es la siguiente:

#### Reactivos:

##### Solución Stock:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.31gr.
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.01gr.
CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01gr.
KCl	0.041gr.
CaCl <sub>2</sub>	0.001gr.

**Todos estos reactivos se disuelven en 250 ml. de agua destilada**

##### Elementos:

CaHPO <sub>4</sub>	1.0gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2gr
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2gr
NaCl	0.2gr.
FeCl <sub>3</sub>	0.1gr.
Sol. Stock	5.0ml.
Agar Difco	5.5gr.
Agua destilada	995.0ml.
pH	6.5

**Preparación:**

- En 495ml de agua destilada, se disolvió todos los elementos indicados en la fórmula. El  $\text{CaHPO}_4$  es de difícil disolución aun empleando calor, por lo que se diluyó lo más que se pueda y el precipitado se distribuyó homogéneamente a todos los tubos.
- En 500 ml restantes se disolvió el Agar, una vez disuelto se mezcló con los elementos. El medio fue distribuido en tubos de 25 x 150mm a razón de 15ml por tubo, luego se procedió a esterilizar a 121 °C x 30 minutos.

**2.1.6.2 Desinfección de las semillas**

La desinfección de semillas se realizó empleando la siguiente técnica:

- Escoger semillas sanas y de tamaño uniforme.
- Colocar las semillas en frascos estériles.
- Luego desinfectar sucesivamente con clorox comercial al 2% por 3 minutos.
- Seguidamente se lavan con agua destilada estéril 6 a 7 veces.
- Las semillas desinfectadas se colocan en placas petri con papel filtro previamente esterilizadas durante una hora en autoclave y humedecidas.
- Luego se ponen a germinar a temperatura ambiente durante 48 horas.

### **2.1.6.3 Siembra e inoculación de las semillas pre-germinadas en los tubos de ensayo**

Una vez depositado el medio de cultivo en los tubos de ensayo, se procedió a sembrar las semillas pre-germinadas; para lo cual se tomó el aza de kole, previamente sometido a la llama de un mechero, con la cual se cogió la semilla pre-germinada y se depositó insertando la raíz dentro del medio de cultivo. La siembra se realizó el 20 de abril de 2009 en la que se utilizó dos semillas pre-germinadas por tubo; la inoculación se realizó el 27 de abril de 2009, una semana después de la siembra, en la que se aplicó 1mL de la cepa de rizobio a evaluarse.

### **1.1.6.4 VARIABLES EN ESTUDIO**

La evaluación de las plantas de trébol rojo se realizó el 27 de julio de 2009; mientras que las plantas de trébol blanco y trébol nativo fueron evaluadas el 10 y 17 de agosto de 2009 respectivamente.

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

#### **Altura de la planta:**

La altura de la planta se consideró desde la base del tallo de la planta hasta la parte terminal, para este fin se utilizó una regla milimétrica de longitud de 30 cm.

#### **Peso fresco y peso seco de la parte aérea:**

**Peso fresco.**- para obtener esta variable se cortó a 1cm del cuello de la planta con tijera de podar, luego se pesó en la balanza digital de 3 decimales, una vez pesado se colocó en un papel

molde la cual tenía su identificación que incluía la cepa y número de repetición.

**Peso seco.**- la muestra obtenida como peso fresco, se llevó a una estufa, en la cual permaneció 24 horas a una temperatura constante de 65°C, seguidamente se procedió a pesar en la balanza digital.

### **Número de nódulos**

Los nódulos de la parte radicular fueron contados uno por uno, se han contabilizado todos los nódulos observables.

## **2.2 EN INVERNADERO**

### **2.2.1 UBICACIÓN**

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería (PIPG) de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNSCH a una altitud de 2750 msnm.

La temperatura del Invernadero se mantuvo entre 20 a 30 °C. Y la humedad HR° = 50 - 60%.

### **2.2.2 CARACTERÍSTICAS Y PROCEDENCIA DEL SUELO**

En el presente trabajo de investigación, el suelo utilizado fue traído de la comunidad campesina de Ccarhuaccpampa, ubicada en el distrito de Paras, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho.

Geográficamente está ubicado a una latitud de 13°25'3.78" S y longitud 74°54'21.06" WO, la altitud es de 4116.8 msnm. Este suelo se

caracteriza por estar compuesto en su mayoría por especies de porte bajo con predominancia de *Trifolium amabile* y otros del cual se tomó una muestra para ser analizado en el laboratorio de Suelos de PIGPA-UNSCH.

De acuerdo al análisis físico-químico del suelo evaluado (Tabla 1) presenta un pH ácido de 5.5 y 11.1% de materia orgánica que corresponde a un nivel alto por lo tanto es un suelo orgánico. Para el caso de nitrógeno total se encontró el valor de 0.54% que corresponde a un valor muy alto. Para el caso de fósforo disponible se tuvo el valor de 2.9 ppm que es un nivel muy bajo; el valor de potasio disponible fue de 77.3 ppm que es un valor bajo. Para el caso de la CIC se encontró valores de 24 meq/100 gr., que nos indica valores de CIC altos para todos los pastizales de puna; la capa arable de este suelo es de 26.2 cm de profundidad; la clase textural del suelo es Franco-Arcilloso, con una pendiente menor de 10 %.

**Tabla 2.1: Análisis Físico – Químico de suelo procedente de la Comunidad de Ccarhuaccpampa.**

Clase textural	Prof. (Cm)	Pendiente (%)	pH H <sub>2</sub> O	M.O (%)	N.total (%)	P (ppm)	K (ppm)	CIC (Meq/100)
Franco-arcilloso	26.2	<10	5.5	11.1	0.54	2.9	77.3	24

**Fuente:** Laboratorio de suelos NICOLÁS ROULET del Programa de Pastos y Ganadería. Ayacucho-Perú. 2009.

### **2.2.3 TRATAMIENTOS**

- 37 cepas de rizobio seleccionados en solarío.
- 03 especies de trébol: Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y Trébol nativo (*Trifolium amabile*).
- 01 Control sin inocular.
- 04 Cepas control provenientes del Laboratorio de Rhizobiología.

### **2.2.5 MATERIALES**

#### **2.2.5.1 Cepas de *Rhizobium***

Las cepas de *Rhizobium* a evaluarse en condiciones de invernadero fueron:

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E17, H2, H3, H6, H11, M4, M5, M6, M8, M11, M12, M13, M15, M25, Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q8, Q9, Q10, Q11, Q23, Q25, Q27, Q28, cepas control (T107, T154, T2 y t4).

#### **2.2.5.2 Planta indicadora**

Como planta indicadora, se utilizaron el Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y Trébol nativo (*Trifolium amabile*); estableciéndose dos plántulas/ maceta.

### **2.2.5.3 Medio de cultivo**

Para el presente experimento se utilizó el medio de cultivo "Levadura Manitol Agar", el cual sirvió para la multiplicación de las cepas de *Rhizobium*.

### **2.2.5.4 Semillas**

Se utilizaron semillas de: Trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli), Trébol blanco (*Trifolium repens* Var. Ladino) y Trébol nativo (*Trifolium amabile*); estas semillas fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA-Ayacucho).

## **2.2.6 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El experimento fue conducido en el diseño Completamente al Azar con tres repeticiones por tratamiento.

## **2.2.7 INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO.**

Para la instalación y conducción del ensayo, se utilizó macetas de polietileno y bolsas de plástico con capacidad de 1Kg; enumerados por unidad experimental. En cada maceta o bolsa se colocó 1Kg de suelo, el cual fue mezclado con Súper Fosfato Triple a razón de 0.219 Kg / 360 Kg suelo; según HORBER (1984) el requerimiento nutricional del trébol es 396-63-450 NPK. El Súper Fosfato Triple se añadió por que se encontraba en menor proporción en el suelo.

### **2.2.7.1 Siembra**

La siembra se realizó el 06 de noviembre de 2009, en la que se sembró 4 a 5 semillas por maceta; transcurrido 1 mes de crecimiento se procedió al desahije, dejando dos plántulas por maceta en forma equidistante; la germinación de las semillas fue uniforme.

### **2.2.7.2 Inoculación**

Se inoculó cuando las plantas presentaron las primeras hojas trifoliadas, utilizando 1 mL de suspensión densa, medio en la cual las cepas están inmersas, la concentración fue de  $10^8$  bacterias por mL.

### **2.2.7.3 Conducción del experimento**

Durante la conducción del experimento se realizaron las siguientes labores culturales:

#### **Riego:**

Se regó a capacidad de campo y de acuerdo a las necesidades requeridas por las plantas.

#### **Control fitosanitario:**

Para el control de plagas y enfermedades se empleó control químico (caldo sulfocálcico) y manual, en la que se presentó el oídium con una incidencia menor a 5%.

## **2.2.8 VARIABLES EN ESTUDIO**

La evaluación de las variables, se realizó durante los meses de abril y mayo de 2010. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

### **Altura de la planta:**

La altura de la planta se consideró desde la base del tallo de la planta hasta la parte terminal, para este fin se utilizó una regla milimétrica.

### **Peso fresco y peso seco de la parte aérea:**

**Peso fresco.**- Para obtener la variable peso fresco, se cortó a 1cm del cuello de la planta con tijera de podar, luego se pesó en la balanza digital de 3 decimales, una vez pesado se colocó en un papel molde, la cual se identificó con el tipo de cepa y número de la repetición.

**Peso seco.**- La muestra obtenida como peso fresco, se llevó a una estufa, en la que permaneció durante 24 horas a una temperatura constante de 65°C, seguidamente se procedió a pesar en una balanza digital.

**Peso seco de la raíz.**- La parte radicular se colocó en un papel molde, previa identificación, la cual se llevó a una estufa a 65°C durante 24 horas, en seguida se procedió a pesar en una balanza digital.

### **Número de nódulos**

Los nódulos de la parte radicular fueron contados uno por uno, contabilizándose todos los nódulos observables.

### **2.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó el análisis de variancia (ANVA) y la prueba de significación de Duncan ( $P < 0.05$ ) para observar diferencias entre tratamientos.

## **CAPITULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 EN CONDICIONES DE SOLARIO**

##### **3.1.1 TRÉBOL ROJO**

En la tabla 2, del análisis de variancia del trébol rojo se observa diferencias altamente significativas en todas las variables evaluadas como: altura, peso fresco, peso seco y número de nódulos, lo que indica que en el experimento existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

En la Tabla 3, la prueba de Duncan, para la altura de planta, indica que las cepas E3, E6, E15, E17, E21, H3, M4, M8, M12, Q2, Q4, Q9 y Q11 superaron con diferencias significativas al testigo sin inocular. Al evaluar el peso fresco y peso seco no se encontró diferencias significativas entre las cepas inculadas y el testigo sin inocular, sin embargo, las cepas E2, E17 y M25 superaron en valores al testigo sin inocular. La cepa Q8 superó en valores de peso fresco al testigo y la cepa

Q16 superó en valores de peso seco al testigo sin inocular, pese a que en peso fresco era inferior al testigo. La evaluación de la nodulación indica que la mayoría de cepas superaron con diferencias significativas al testigo que no presentó nodulación al igual que las cepas E20, M1, M3, M11 y M13, mientras que las cepas E1, E2, E3, E4, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E21, E23, H1, M2, M6, M8, M12, M16, M25, Q8, Q13, Q15, Q16 presentaron entre 1 y 16 nódulos, por lo que presentaron diferencias significativas con el testigo.

MADIGAN *et al.* (1997), señalan que las cepas que no son efectivas forman nódulos de menor tamaño, color verde blancuzco y sin capacidad de fijar nitrógeno. Estos nódulos se ubican en todo el sistema radicular en mayor cantidad (sin pigmento leg-hemoglobina). Por su parte CIAT (1987), menciona que el número de nódulos de una planta oscila entre algunas unidades y varios millares; concluyendo que la simple presencia de nódulos no es garantía de una fijación suficiente de nitrógeno.

Considerando la evaluación de todas las variables se puede indicar que las cepas E2, E17, M25 y Q8 se comportaron como efectivas en trébol rojo.

**Tabla 3.1:** Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco y número de nódulos de plantas de Trébol Rojo inoculadas con cepas de rizobio.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso seco (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM
Cepas	61	0,6466 **	4,3739 **	9,3992 **	532,53 **
Error	124	0,1811	1,4542	2,4386	168,49
Error Total	185	0,2877	5,8281	11,8379	701,02
C.V		1,01%	7,50%	14,00%	33,40%

**Tabla 3.2:** Prueba de Duncan (0.05) de la altura, peso fresco, peso seco y número de nódulos de plantas de Trébol Rojo inoculadas con diferentes cepas de rizobio.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Nº Nódulos
1	E1	6,37 c-k	45 a-h	19 a-g	16 g-t
2	E2	5,13 n-v	62 a-b	31 a-c	1 r-t
3	E3	6,7 b-i	49 a-f	25 a-d	2 o-t
4	E4	5,8 g-r	37 b-m	22 a-f	4 m-t
5	E5	5,97 e-p	43 a-i	10 h-o	22 b-l
6	E6	6,83 a-g	28 h-q	10 h-o	20 c-m
7	E7	5,27 l-v	36 b-m	14 f-l	50 a-b
8	E8	6,3 c-l	32 d-p	11 g-o	15 d-o
9	E10	5 p-v	35 c-n	13 f-l	25 a-h
10	E11	6,3 c-l	30 g-q	10 h-o	12 e-r
11	E13	5,1 o-v	34 d-p	17 c-i	1 o-t
12	E14	6,5 c-j	34 e-q	13 f-l	7 i-t
13	E15	6,97 a-f	42 a-j	19 a-h	6 k-t
14	E17	7,3 a-d	51 a-d	30 a-b	9 f-t
15	E19	5,47 j-u	39 a-l	17 c-i	2 o-t
16	E20	5,93 e-q	25 l-s	8 k-s	0 s-t
17	E21	7,43 a-c	20 o-v	4 t-u	3 n-t
18	E22	6,23 c-m	25 j-s	6 m-t	5 l-t
19	E23	6,4 c-j	25 j-s	6 l-t	10 f-t
20	E24	6,33 c-k	21 n-u	7 k-s	14 e-s
21	H1	6,9 a-g	13 v	6 o-u	8 h-t
22	H2	5,6 i-t	23 m-u	10 h-o	16 d-p
23	H3	6,77 a-h	24 l-t	9 i-q	52 a
24	H6	6,1 e-n	29 g-q	13 f-l	22 b-l
25	H11	5,97 e-q	22 n-u	9 i-q	19 c-l
26	H15	5,7 h-r	19 p-v	6 n-u	15 d-o
27	M1	4,97 q-v	21 n-u	7 k-s	0 r-t
28	M2	5,03 o-v	14 t-v	3 u	1 q-t
29	M3	5,7 h-s	31 d-p	5 q-u	0 q-t
30	M4	7,03 a-e	24 l-s	7 k-s	27 a-i
31	M5	6,37 c-j	28 g-q	9 i-q	22 c-l
32	M6	5,87 f-q	28 i-q	12 f-n	9 g-t
33	M8	6,7 c-i	24 l-s	8 k-s	36 a-d
34	M9	5,77 g-r	26 k-s	5 q-u	1 p-t
35	M10	7 a-f	29 g-q	6 n-u	18 c-n
36	M11	5,87 f-q	34 c-n	10 h-o	0 s-t
37	M12	7,07 a-e	33 d-o	11 g-o	2 o-t
38	M13	4,5 v	41 a-k	13 f-l	0 t
39	M15	5,3 k-v	37 b-m	8 k-s	15 e-r
40	M16	4,83 s-v	31 d-p	7 k-s	9 h-t
41	M25	4,67 u-v	56 a-c	33 a	6 i-t
42	Q1	5,1 o-v	27 i-q	8 k-s	14 d-q
43	Q2	7,9 a-b	26 j-s	9 i-q	30 a-h
44	Q3	6,03 e-o	27 i-q	9 i-q	42 a-c
45	Q4	6,8 a-h	37 b-m	12 f-n	50 a-b
46	Q5	5,07 o-v	29 f-q	11 g-o	25 a-i
47	Q6	4,9 r-v	25 l-s	5 q-u	30 a-f
48	Q7	4,9 r-v	16 r-v	5 q-u	11 e-s
49	Q8	5,27 m-v	62 a	25 a-e	6 j-t
50	Q9	7 a-f	29 g-q	20 d-j	33 a-e
51	Q10	6 e-o	27 i-r	9 i-q	35 a-e
52	Q11	7,97 a	23 n-u	8 k-s	29 b-l
53	Q13	5,97 e-q	19 p-v	5 q-u	10 g-t
54	Q15	4,73 t-v	34 d-o	18 b-i	1 r-t
55	Q16	5,13 n-v	46 a-g	26 a-d	4 m-t
56	Q20	5,3 k-v	18 q-v	9 i-q	16 d-o
57	Q22	6,37 c-j	14 u-v	8 k-s	17 c-n
58	Q23	6,17 d-m	23 j-s	12 f-n	29 a-g
59	Q25	5,87 f-q	16 r-v	11 g-o	24 a-j
60	Q27	5,87 f-q	21 n-u	10 h-o	17 c-n
61	Q28	6,2 d-m	22 n-u	11 g-o	23 b-k
62	Testigo	5,47 j-u	50 a-e	24 a-e	0 t

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

### 3.1.2 TRÉBOL BLANCO

En la Tabla 4, del análisis de variancia del trébol blanco se observó como en el caso del trébol rojo, diferencias altamente significativas en las variables evaluadas: altura, peso fresco, peso seco y el número de nódulos, estos resultados indican que en el experimento existen diferencias entre los tratamientos evaluados.

La prueba de Duncan  $_{0.05}$ , para la altura de planta (Tabla 5), indicó que todas las cepas superaron con diferencias significativas al testigo sin inocular, excepto las cepas E7, E10, E13, M1, M2, M3, M13, M16, M25, Q5, Q6, Q7, Q15.

Los resultados de la prueba de Duncan $_{0.05}$  del peso fresco y peso seco de las plantas de trébol rojo, no mostraron diferencias significativas entre las cepas evaluadas y el testigo. Al evaluar la nodulación se encontró que las cepas E1, E3, E4, E5, E6, E7, E10, E11, E14, E22, E23, E24, H3, M4, M6, M8, Q1, Q2, Q4, Q5, Q11, Q23, Q25, Q27 presentaron el mayor número de nódulos, mientras que el testigo no presentó nodulación.

En esta variedad de trébol, debido a que ninguna de las cepas superó al testigo en peso fresco y peso seco de la parte aérea, fueron consideradas como inefectivas.

**Tabla 3.3:** Análisis de Variancia del Trébol Blanco inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de solarío.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso seco (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM
Cepas	61	0,5435 **	2,5477 **	7,121 **	269,90 **
Error	124	0,1832	1,3671	4,3539	107,4
Error Total	185	0,7267	3,8248	11,47	377,3
<b>C.V</b>		<b>1,03%</b>	<b>10,30%</b>	<b>26,20%</b>	<b>33,80%</b>

**Tabla 3.4:** Prueba de Duncan<sub>0.05</sub> de plantas de Trébol Blanco inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de solarío.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Nº Nódulos
1	E1	6,4 a-d	14 a-f	8,7 a-d	25 a-c
2	E2	5,1 h-p	13 b-i	6,84 a-g	4 g-p
3	E3	6,5 a-b	14 a-f	8,51 a-d	10 c-m
4	E4	5,4 c-p	12 c-j	7,11 a-f	19 b-i
45	E5	5,7 a-n	14 a-f	5,04 c-i	12 c-l
6	E6	6,4 a-b	12 c-j	6,95 a-g	14 b-k
7	E7	5 k-s	11 c-k	5,77 c-h	15 b-h
8	E8	5,9 a-k	9 e-m	6,84 a-g	7 d-p
9	E10	4,6 o-r	11 c-l	5,94 b-h	16 b-h
10	E11	6 a-j	12 c-j	7,11 a-f	14 b-j
11	E13	4,8 n-r	13 a-h	7,56 a-f	6 e-p
12	E14	6,1 a-f	14 a-f	7,83 a-f	9 c-o
13	E15	6,7 a	11 c-k	6,46 a-h	5 j-p
14	E17	6,8 a	12 c-j	6,95 a-g	7 d-p
15	E19	5,1 f-q	12 c-j	6,65 a-g	5 e-p
16	E20	5,4 b-o	13 a-h	7,83 a-f	12:00 PM
17	E21	6,6 a	10 c-l	5,24 c-h	4 i-p
18	E22	6 a-j	9 e-m	2,71 h-j	1 c-m
19	E23	6,1 a-g	8 h-n	2,71 h-j	21 a-d
20	E24	5,9 a-k	5 n	1,44 j	14 c-k
21	H1	6,4 a-c	6 m-n	1,44 j	4 f-p
22	H2	5,1 g-p	10 c-l	4,93 c-i	3 j-p
23	H3	6,1 a-f	8 i-n	2,88 g-j	28 a-b
24	H6	5,9 a-l	8 i-n	4,16 c-i	5 e-p
25	H11	5,4 c-p	7 j-n	2,88 g-j	7 d-p
26	H15	5,1 i-q	8 i-n	2,71 h-j	4 f-p
27	M1	4,3 q-r	20 a-b	14,49 a	12:00 PM
28	M2	4,2 s-r	9 f-n	4,16 c-i	12:00 PM
29	M3	4,8 m-r	12 c-i	7,66 a-f	12:00 PM
30	M4	6 a-i	8 i-n	3,3 f-i	17 a-f
31	M5	5,9 a-k	9 d-l	4,31 c-i	6 e-p
32	M6	5,1 g-q	10 c-l	4,38 c-i	18 a-g
33	M8	6,1 a-h	8 i-n	3,63 d-i	15 b-h
34	M9	5 j-q	10 c-l	5,65 c-h	3 k-p
35	M10	5,8 a-m	7 k-n	2,15 i-j	12:00 PM
36	M11	5,1 f-p	10 c-l	5,77 c-h	1 o-p
37	M12	6 a-i	7 l-n	6,69 a-g	12:00 PM
38	M13	4,5 p-r	9 g-n	4,16 c-i	4 h-p
39	M15	5,3 d-p	11 c-k	6,21 a-h	1 o-p
40	M16	4,8 m-r	10 c-l	5,43 c-h	12:00 PM
41	M25	4,7 o-r	10 c-l	4,64 c-i	4 h-p
42	Q1	5,1 h-q	15 a-c	7,49 a-f	10 c-n
43	Q2	6,4 a-c	15 a-c	8,54 a-d	2 m-p
44	Q3	6 a-j	14 a-f	8,4 a-e	8 d-p
45	Q4	6,6 a	15 a-c	7,11 a-f	33 a
46	Q5	5 k-q	11 a-c	9,38 a-c	33 a
47	Q6	4,8 n-r	10 c-l	5,52 c-h	8 d-p
48	Q7	4,9 l-r	9 c-l	4,64 c-i	5 e-p
49	Q8	5,3 e-p	10 c-l	3,91 c-i	1 n-p
50	Q9	6 a-j	10 c-l	4,38 c-i	6 e-p
51	Q10	6 a-j	10 c-l	9,43 a-c	6 d-p
52	Q11	6,6 a	14 h-n	3,91 c-i	10 c-m
53	Q13	5,9 a-k	12 a-e	8,17 a-e	7 d-p
54	Q15	4,7 o-r	13 b-i	6,21 a-h	6 e-p
55	Q16	5,1 f-p	8 b-h	5,52 c-h	2 l-p
56	Q20	5,3 d-p	11 c-k	3,42 e-i	6 e-p
57	Q22	6,4 a-c	11 c-k	5,59 c-h	7 d-p
58	Q23	6,2 a-e	11 c-k	5,31 c-h	17 a-e
59	Q25	5,9 a-k	9 e-m	3,78 d-i	15 c-l
60	Q27	5,9 a-k	9 e-m	4,16 c-i	12 c-l
61	Q28	6,1 a-i	12 c-j	6,08 a-h	4 h-p
62	Testigo	4,2 s-r	24 a	13,97 a-b	o. p

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

### 3.1.3 TRÉBOL NATIVO

De acuerdo al análisis de variancia (tabla 6), la alta significación estadística en las variables evaluadas como altura de planta, peso fresco, peso seco; señala que en el experimento existe diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de rizobio, excepto para el caso de número de nódulos, ya que todos los tratamientos evaluados no presentaron nodulación.

Para determinar qué cepas tienen mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico, se realizó la prueba de Duncan<sub>0.05</sub> (tabla 7), para la altura de planta, en el que se observa que las cepas E2, E3, E5, E7, E8, E11, E14, E20, H1, H2, H3, H11, M2, M3, M8, M9, M10, M11, M25, Q1, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q16, Q20, Q22, Q23, y Q27 superaron con diferencias significativas al testigo sin inocular. Al evaluar el peso fresco y el peso seco, ninguna de las cepas evaluadas supero significativamente al control.

Los resultados obtenidos indican que las cepas evaluadas fueron inefectivas en condiciones de solarío ya que las plantas inoculadas no presentaron nodulación tampoco superaron en peso al control sin inocular. Los resultados obtenidos posiblemente se deben al deficiente crecimiento de las plantas en las condiciones del ensayo.

URZÚA (2000), indica que una de las propiedades de la simbiosis es la especificidad, o propiedad por la que el microbio infecta selectivamente a la planta hospedadora. La magnitud de la misma varía de unas simbiosis a otras, y así, por ejemplo, ciertas leguminosas tienen requerimientos muy concretos para “su rizobio”, mientras que otras aceptan un espectro más amplio, y, viceversa, un determinado rizobio puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de 27 especies, o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias.

RONALD (1993), citado por CALDERÓN (2003), manifiesta que para que exista una alta fijación de nitrógeno se debe contar con ciertos factores que intervienen en la simbiosis de *Rhizobium* – leguminosa, como son: la efectividad, capacidad hospedante, factores del medio ambiente; así como los factores genéticos que determinan la compatibilidad entre la cepa de *Rhizobium* y la leguminosa.

GERARDO *et al.* (1991), mencionan que los factores nutricionales pueden afectar la producción de nitrógeno en tres formas: directamente en el inicio y desarrollo de los nódulos, en la eficiencia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa o en el metabolismo y desarrollo de la planta.

**Tabla 3.5:** Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco y número de nódulos del Trébol Nativo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de solarío.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso seco (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM
Cepas	61	2,88 **	2,11 **	4,075 **	0
Error	124	0,583	1,23	3,77	0
error total	185	3,466	3,34	7,84	0
<b>C.V</b>		<b>2,04%</b>	<b>13,40%</b>	<b>6,70%</b>	<b>0,00%</b>

**Tabla 3.6:** Prueba de Duncan<sub>0.05</sub> de plantas de Trébol Nativo inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de solarío.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Nº Nódulos
1	E1	2,2 l-u	6,5 b-h	3,33 a-d	0
2	E2	2,8 a-m	6,3 c-i	3,33 a-f	0 b
3	E3	3 a-j	7,6 a-e	3,67 a-d	0 c
4	E4	1,6 v-x	6,3 c-i	3,33 a-d	0 d
5	E5	3,1 a-g	5,5 c-i	2,33 a-f	0 e
6	E6	2,2 l-t	5,9 c-i	3,00 a-f	0 f
7	E7	3,1 a-h	6,0 c-i	2,67 a-f	0 g
8	E8	2,8 a-m	4,6 f-j	2,00 a-f	0 h
9	E10	1,8 p-x	5,6 c-i	3,33 a-d	0 i
10	E11	3 a-k	6,5 b-h	3,67 a-d	0 j
11	E13	2,2 l-t	6,6 a-h	3,00 a-f	0 k
12	E14	3,3 a-d	7,0 a-f	3,67 a-e	0 l
13	E15	2,1 m-w	5,9 c-i	3,33 a-d	0 m
14	E17	1,7 s-x	6,3 c-i	3,00 a-f	0 n
15	E19	2,2 i-s	6,0 c-i	2,67 a-f	0 o
16	E20	3,2 a-f	6,8 a-g	3,67 a-d	1
17	E21	1,8 r-x	5,2 c-j	2,00 a-f	0 q
18	E22	2,1 m-v	4,9 e-j	2,00 a-f	0 r
19	E23	2,3 h-s	4,2 h-k	1,00 b-f	0 s
20	E24	1,6 u-x	2,9 k	0,33 e-f	0 t
21	H1	2,4 d-q	3,3 j-k	0,33 c-f	0 u
22	H2	3,3 a-e	5,2 c-j	2,33 a-f	0 v
23	H3	2,6 b-n	4,0 i-k	1,33 b-f	0 w
24	H6	1,6 v-x	4,3 g-k	1,67 b-f	0 x
25	H11	3,1 a-g	4,0 i-k	1,00 b-f	0 y
26	H15	1,5 x	4,3 g-k	1,33 b-f	0 z
27	M1	2,4 f-r	10,0 a-b	6,00 a	0
28	M2	3,5 a-b	4,8 e-j	2,00 a-f	0 b
29	M3	2,5 d-p	6,3 c-i	2,67 a-f	0 c
30	M4	1,5 x	4,3 g-k	1,33 b-f	0 d
31	M5	2,2 j-t	4,6 f-j	1,67 b-f	0 e
32	M6	1,4 x	4,8 e-j	1,67 d-f	0 f
33	M8	3 a-l	4,3 g-k	1,33 b-f	0 g
34	M9	2,5 c-o	5,3 c-i	2,00 b-f	0 h
35	M10	3,6 a	3,9 i-k	1,00 f	0 i
36	M11	2,5 d-q	5,5 c-i	2,00 a-f	0 j
37	M12	1,8 r-x	3,9 i-k	1,00 b-f	0 k
38	M13	1,5 x	4,6 f-j	1,33 a-f	0 l
39	M15	2,3 g-r	5,9 c-i	2,33 a-f	0 m
40	M16	1,8 o-x	5,9 c-i	2,67 a-f	0 n
41	M25	3,5 a-b	5,3 c-i	1,67 b-f	0 o
42	Q1	2,5 d-o	7,3 a-f	4,33 a-b	1
43	Q2	1,4 x	7,8 a-d	4,00 a-d	0 q
44	Q3	1,9 n-x	7,9 a-c	4,00 a-c	0 r
45	Q4	2,4 e-r	7,3 a-f	3,67 a-d	0 s
46	Q5	3,4 a-c	7,9 a-c	4,00 a-c	0 t
47	Q6	3,1 a-i	5,9 c-i	3,00 a-f	0 u
48	Q7	3,1 a-g	5,2 c-j	2,00 a-f	0 v
49	Q8	2,5 d-o	4,7 e-j	2,00 g	0 w
50	Q9	3,1 a-i	5,2 c-j	1,33 a-f	0 x
51	Q10	1,5 w-x	5,2 c-j	2,00 a-f	0 y
52	Q11	2,3 g-r	4,3 g-k	2,00 a-f	0 z
53	Q13	1,6 u-x	7,5 a-e	4,67 a-b	0
54	Q15	2,2 l-u	6,5 b-h	3,33 a-f	0 b
55	Q16	3,1 a-h	7,9 a-c	4,33 a-b	0 c
56	Q20	3,8 a	4,6 f-i	1,33 b-f	0 d
57	Q22	3,2 a-f	5,9 c-i	2,67 a-f	0 e
58	Q23	2,6 b-n	5,6 c-i	2,00 a-f	0 f
59	Q25	1,7 t-x	4,6 f-j	1,00 b-f	0 g
60	Q27	3,5 a-b	5,8 c-i	2,67 a-f	0 h
61	Q28	2,2 k-t	5,3 c-i	2,33 a-f	0 i
62	Testigo	1,8 q-x	10,3 a	5,33 a	0 j

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

## **3.2 EN CONDICIONES DE INVERNADERO**

### **3.2.1 TRÉBOL ROJO**

El análisis de variancia del trébol rojo (Tabla 8) reportó diferencias altamente significativas en todas las variables evaluadas como: la altura, peso fresco, peso seco, peso de la raíz y el número de nódulos, lo que nos señala que alguna o varias cepas de rizobio resultaron eficientes en la fijación de nitrógeno atmosférico.

La prueba de Duncan<sub>0,05</sub>, para la altura (Tabla 9) indicó que las cepas E2, E3, E8, M5, M6, M11, M12, M13, M25, Q1, Q5, Q8, Q9, Q23, T154 y 2 superaron con diferencias significativas al control sin inocular. Los resultados de peso fresco y peso seco mostraron que la cepa T154 fue la única que superó al control sin inocular, sin embargo, las cepas M5, M8, M11, M25, Q11 superaron en valores de peso fresco al control, mientras que las cepas E2, E3, E8, H3, M5, M11 M13, M25, Q5, Q8, Q9, Q11 superaron en valores de peso seco al control. Los resultados del peso de la raíz indicaron que las cepas E2, M8, M13, M25, Q4, T107, T154, 2 y 4 superaron con diferencias significativas al control. La evaluación de la nodulación mostró que todas las cepas superaron con diferencias significativas al control excepto la cepa E10 que presentó número de nódulos similares al control.

Los resultados obtenidos en las diferentes variables evaluadas indican que las cepas E2, M5, M8, M11, M25, Q11, y T154 se

comportaron como efectivas por superar con diferencias significativas al control sin inocular.

En condiciones de solarío, utilizando como planta indicadora el trébol rojo, las cepas M5, M8, M11 y Q11 resultaron ser ineficientes; las mismas cepas al ser probadas en condiciones de invernadero resultaron ser eficientes; contrariamente las cepas E17 y Q8 que se comportaron como efectivas en condiciones de solarío, resultó ser inefectiva en condiciones de invernadero (E17) y medianamente efectiva (Q8); esto se debió probablemente a algún defecto edáfico como el cambio de acidez del medio de 6.5 (solución nutritiva de Jensen) a 5.5 pH del suelo. Las cepas E2 y M25 fueron eficientes en ambas condiciones (solarío e invernadero).

SCHIEL (1964), citado por BLÁSQUEZ (1978), señala que la selección de cepas de *Rhizobium* se realiza en cultivos artificiales, que permiten poner en manifiesto la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas que compiten, asimismo menciona que si las cepas selectas en el laboratorio no responden en el campo debe corregirse los defectos edáficos.

Los factores ambientales como acidez (menor a 4.5), toxicidad de aluminio y manganeso, disponibilidad de fósforo en el suelo, temperatura ambiente y competencia con cepas nativas, afectan significativamente la

capacidad de nodulación y fijación biológica del nitrógeno (GRAHAM, 1990).

**Tabla 3.7:** Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco, peso raíz y número de nódulos del Trébol Rojo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raiz (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM	CM
Cepas	41	1,1893 **	13,014 **	8,3537 **	9,2187 **	12,7161 **
Error	84	0,3223	3,333	3,5312	1,0751	2,7797
Error Total	125	1,5117	16,347	11,885	10,2838	15,4957
C.V		5,04%	5,67%	7,14%	4,25%	7,69%

**Tabla 3.8:** Prueba de Duncan (0.05) de plantas de Trébol Rojo inoculadas con diferentes cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raíz (mg/planta)	Nº Nodulo
1	E1	17 e-k	4166 d-k	957 c-j	228 k-m	484.33 a-e
2	E2	19 c-i	12844 a-b	1564 a-e	850 b-c	198.67 n
3	E3	24 a-c	5483 b-j	1302 a-f	608 c-e	343.33 b-j
4	E4	15 h-l	2553 i-m	699 c-m	365 e-k	725 a-b
5	E5	15 h-l	1388 l-n	489 g-n	296 g-m	167.67 f-m
6	E6	15 i-l	2314 i-n	741 c-m	275 h-m	227.33 e-l
7	E7	15 h-l	1118 m-n	384 j-n	205 l-n	215.67 d-k
8	E8	18 d-j	4156 d-k	1083 b-h	292 g-m	160 j-m
9	E10	13 k-l	1211 m-n	432 h-n	420 e-i	56.33 o
10	E11	13 k-l	1089 m-n	343 k-n	522 d-f	131.33 h-m
11	E17	14 j-l	4266 d-k	830 c-l	267 i-m	142.33 k-n
12	H2	16 f-l	3957 d-k	854 c-k	265 i-m	479 a-g
13	H3	18 d-j	3048 f-l	1134 b-g	137 n	193.33 e-l
14	H6	12 l	1270 l-n	317 m-n	361 f-k	414.67 a-d
15	H11	16 f-l	2700 g-m	693 c-m	250 j-m	184 h-m
16	M4	13 k-l	1301 l-n	386 i-n	188 m-n	191 g-m
17	M5	27 a	9326 a-d	1661 a-d	502 d-f	384.33 a-i
18	M6	20 b-g	4519 c-k	887 c-j	207 l-n	142.67 g-m
19	M8	13 k-l	8498 a-e	992 c-i	1279 a-b	216.33 f-m
20	M11	27 a	12844 a-b	2569 a-b	798 b-d	474.33 a-h
21	M12	18 d-j	2428 i-m	534 f-n	274 h-m	356.33 b-k
22	M13	21 a-e	4872 c-k	1045 b-h	1202 b	628.67 a-d
23	M15	14 i-l	2084 k-n	565 f-n	452 e-h	263.67 f-m
24	M25	23 a-d	10757 a-c	1730 a-c	1114 b	321.67 c-k
25	Q1	21 a-e	6633 b-g	703 c-m	387 e-j	115.33 i-m
26	Q2	15 f-l	2193 j-n	438 g-n	528 d-f	305.33 c-k
27	Q3	15 h-l	3667 e-k	624 e-m	226 k-m	193 g-m
28	Q4	15 i-l	2335 i-n	451 g-n	1070 b	180.67 i-m
29	Q5	20 b-f	4581 c-k	1031 b-h	513 d-f	463 a-f
30	Q8	22 a-e	5598 b-i	1334 a-f	532 d-f	678.67 a-c
31	Q9	20 b-f	2472 i-m	1076 b-h	430 e-i	805.67 a
32	Q10	15 g-l	2600 h-m	575 f-n	364 e-k	292.33 d-k
33	Q11	15 h-l	7133 a-f	1305 a-f	449 e-h	314.67 d-k
34	Q23	25 a-c	951 n	235 n	463 e-g	159.67 e-l
35	Q25	15 h-l	1154 m-n	304 m-n	324 f-l	109 l-n
36	Q27	15 i-l	2193 j-n	539 f-n	971 b	181.33 e-l
37	Q28	15 h-l	1400 l-n	342 k-n	299 g-m	225.67 f-m
38	T107	15 i-l	3972 d-k	1357 a-f	1084 b	188.33 g-m
39	T154	20 c-h	16255 a	3036 a	1930 a	99 m-n
40	2	26 a-b	2368 i-m	653 d-m	1014 b	417.67 a-h
41	4	15 i-l	2173 k-n	325 l-n	1265 a-b	354.33 d-k
42	Test.	13 k-l	6364 b-h	1003 c-h	497 d-f	33 o

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

### 3.2.2 TRÉBOL BLANCO

El análisis de variancia del trébol blanco (tabla 10), reportó diferencias altamente significativas en las variables evaluadas como la Altura, peso seco, peso de la raíz y el número de nódulos, excepto en la variable del peso fresco donde se observó solamente diferencia significativa.

Las diferencias estadísticas altamente significativas entre cepas indican que alguna o varias de ellas son cepas efectivas, infectivas y eficientes en la fijación de  $N_2$ .

Al efectuarse la prueba de Duncan  $_{0.05}$  (tabla 11), para la altura, se determinó que las cepas E17, H6, M4, M6, M8, M15, Q1 y la cepa 2 superaron con diferencias significativas al control. Los resultados del peso fresco indican que las cepas H11, M4, M6, M13, M15, Q11, Q23 y T154 superaron con diferencias significativas al control sin inocular, sin embargo, el resto de cepas superaron en valores al control, excepto las cepas Q3 y Q5. Los resultados del peso seco mostraron que las cepas E8, M6, Q4 y T154 superaron con diferencias significativas al control. Con respecto al peso de la raíz se encontró que las cepas E1, E4, E5, E7, E10, T107 y la cepa 4 superaron al control. La evaluación del número de nódulos mostró que las cepas E1, H2, H3, H6, M5, M6, M13, Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q8, Q9 y la cepa 4 presentaron mayor número de nódulos con relación al control.

Considerando los resultados obtenidos en las diferentes variables, las cepas que se comportaron como efectivas en trébol blanco son: E8, H11, M4, M6, M13, M15, Q4, Q11, Q23, Q27 y T154; cabe resaltar que las cepas Q11 y T154 también fueron eficientes en trébol rojo.

Con relación a la presencia de nódulos en las plantas control, sin inocular, BLÁZQUEZ (1978), al realizar un experimento en la Selección de Cepas de *Rhizobium trifolii* en Trébol Blanco (*Trifolium repens* L. Variedad Ladino) en condiciones de invernadero, encontró que el testigo sin inocular y el testigo sin inocular más nitrógeno, presentaron abundante número de nódulos inefectivos, o sea son de tamaño pequeños, esféricos, blanquecinos y distribuidos en todo el sistema radicular, esto debido a que los suelos de puna contienen en su mayoría cepas nativas de poca efectividad.

**Tabla 3.9:** Análisis de Variancia de la altura, peso fresco, peso seco, peso de raíz y número de nódulos de Trébol Blanco inoculado con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raiz (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM	CM
Cepas	41	0,8332 **	1,9961 *	3,6408 **	5,5687 **	3168,83 **
Error	84	0,4706	2,2923	1,8657	1,5416	325,33
Error Total	125	1,3038	4,2884	5,5066	7,1103	3494,16
C.V		5,83%	4,77%	5,56%	5,87%	14,47%

**Tabla 3.10:** Prueba de Duncan (0.05) para la selección de cepas de rizobio en Trébol Blanco, en condiciones de invernadero.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raíz (mg/planta)	Nº Nódulos
1	E1	19 b-l	2731 a-f	360 f-h	338 a-d	264.67 d-g
2	E2	21 a-h	2289 b-f	315 g-j	195 c-i	110.67 j-n
3	E3	19 b-l	2750 a-f	519 b-g	187 d-i	65.33 n-q
4	E4	16 d-l	3041 a-f	473 b-g	521 a	3.33 r
5	E5	20 b-k	2765 a-f	400 e-h	321 a-d	208.33 e-i
6	E6	18 b-l	2547 a-f	504 b-g	129 g-k	120 i-n
7	E7	22 a-f	2525 b-f	460 c-g	353 a-c	132.67 h-l
8	E8	16 d-l	3997 a-d	1136 a	249 b-f	133 h-l
9	E10	19 b-l	2653 a-f	472 b-g	522 a	60 m-q
10	E11	20 b-j	3083 a-f	448 c-g	309 a-e	44 o-q
11	E17	23 a-e	3478 a-e	582 b-g	184 d-i	125.33 i-m
12	H2	16 g-l	2708 a-f	430 d-h	123 h-k	400.67 a-c
13	H3	14 k-l	2282 b-f	221 h-j	302 a-f	310.67 c-f
14	H6	26 a-b	2445 b-f	528 b-g	205 c-i	360.67 a-d
15	H11	16 f-l	4403 a-c	766 a-e	181 d-i	64.33 l-q
16	M4	29 a	4046 a-c	622 a-g	291 a-f	89.67 k-o
17	M5	18 b-l	3157 a-f	506 b-g	117 i-k	459.33 a-b
18	M6	25 a-b	5470 a	893 a-c	129 g-k	472.33 a
19	M8	24 a-c	3319 a-e	564 b-g	86 k	53.33 n-q
20	M11	21 a-h	3095 a-f	356 f-h	122 h-k	136.67 h-l
21	M12	14 l	2250 b-f	455 c-g	231 b-g	173.33 g-k
22	M13	20 b-k	4436 a-c	699 a-f	116 i-k	231.67 e-h
23	M15	29 a	4827 a-b	807 a-d	233 b-g	202.67 f-j
24	M25	21 b-i	2073 c-f	329 g-i	223 b-h	106.33 j-n
25	Q1	23 a-c	2683 a-f	475 b-g	84 k	315.67 a-e
26	Q2	15 h-l	2105 c-f	310 g-j	185 d-i	411 a-c
27	Q3	15 g-l	1509 f	361 f-h	260 b-f	478.67 a-b
28	Q4	20 b-l	3679 a-e	876 a-c	221 b-h	309 c-f
29	Q5	16 e-l	1808 e-f	468 b-g	164 f-j	245.67 d-g
30	Q8	17 c-l	2348 b-f	550 b-g	80 k	340 a-e
31	Q9	19 b-l	2097 c-f	385 e-h	193 c-i	301 b-f
32	Q10	15 i-l	2449 b-f	185 j-i	313 a-e	202 f-j
33	Q11	14 j-l	4086 a-c	557 b-g	309 a-e	77 l-p
34	Q23	22 a-g	4074 a-c	519 b-g	226 b-h	20 q
35	Q25	21 b-h	2972 a-f	174 j	133 g-k	27 p-q
36	Q27	22 a-g	3969 a-d	769 a-e	131 g-k	57 l-q
37	Q28	16 e-l	2653 a-f	426 d-h	206 c-i	119 i-n
38	T107	19 b-l	2951 a-f	558 b-g	384 a-b	129 h-l
39	T154	22 a-h	4648 a-b	928 a-b	216 b-i	126 h-l
40	2	23 a-d	2371 b-f	452 c-g	93 j-k	106 k-o
41	4	19 b-l	2286 b-f	510 b-g	514 a	219 g-i
42	Test.	16 g-l	1858 d-f	418 d-h	168 e-j	108.33j-n

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

### 3.2.3 TRÉBOL NATIVO

En la tabla 12, del análisis de variancia del trébol nativo se observa diferencias altamente significativas en todas las variables evaluadas como: la altura, peso fresco, peso seco, peso de la raíz y el número de nódulos, señalando que en el experimento existe diferencias entre los tratamientos inoculados con las diferentes cepas de rizobio.

La prueba de Duncan (0.05), de la altura (Tabla 13), muestra diferencias significativas de todas las cepas evaluadas, excepto las cepas E3, E4, E5, H2, M5, M25 y Q25 frente al control sin inocular.

Al realizar la prueba de Duncan (0.05) del peso fresco (Tabla 13), se encontró que las cepas E10, E11, E17, M4, M5, M6, M8, M11, M12, M13, M15, Q4, Q8, Q9, Q10, Q11, Q23, Q25, Q27, Q28, T154 y la cepa 2 superaron con diferencias significativas al control sin inocular.

La prueba de Duncan (0.05) del peso seco, indica que los tratamientos E11, E17, M11, Q25 superaron con diferencias significativas al control sin inocular.

La prueba de Duncan (0.05) del peso de la raíz mostró diferencias significativas de las cepas E17, M4, M8, M11, M12, M13, M15, Q2, Q25, Q27, Q28 y T107 frente al control sin inocular.

La evaluación de la nodulación mostró que solamente las cepas E17, M4, M12 y Q27 presentaron nódulos, el resto de cepas juntamente con el control no presentaron nódulos.

Considerando todas las variables evaluadas, las cepas E17, M4, M12, M15, y Q27 se comportaron como efectivas. Las cepas M4, M15 y Q27 también fueron eficientes en trébol blanco.

**Tabla 3.11:** Análisis de Variancia del la altura, peso fresco, peso seco, peso raíz y número de nódulos del Trébol Nativo inoculadas con cepas de rizobio, en condiciones de invernadero.

F.V	GL	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raiz (mg/planta)	Nº. Nódulos
		CM	CM	CM	CM	CM
Cepas	41	0,3178 **	3,1704 **	3,9535 **	18,5689 **	940,3583 **
Error	84	0,0119	1,6929	2,3935	1,9655	38,018
Error Total	125	0,3298	4,863	6,347	20,5344	978,3762
<b>C.V</b>		<b>1,04%</b>	<b>5,32%</b>	<b>8,01%</b>	<b>8,63%</b>	<b>33,99%</b>

**Tabla 3.12:** Prueba de Duncan (0.05) para la selección de cepas de rizobio en trébol nativo, en condiciones de invernadero.

Nº	Cepa	Altura (cm)	Peso Fresco (mg/planta)	Peso Seco (mg/planta)	Peso Raíz (mg/planta)	Nº Nódulos
1	E1	15 c-d	299 g-j	109 c-h	21 n-o	0.00 d
2	E2	14 g-h	347 e-j	124 b-h	22 n-o	0.00 d
3	E3	12 l-m	361 e-j	127 b-h	46 i-m	0.00 d
4	E4	12 l-m	275 h-j	85 e-h	22 n-o	0.00 d
5	E5	13 i-k	278 h-j	88 d-h	24 m-o	0.00 d
6	E6	15 c	266 h-j	62 h-i	23 n-o	0.00 d
7	E7	14 f-g	305 f-j	107 c-h	20 n-o	0.00 d
8	E8	17 a-b	297 g-j	33 i	25 l-o	0.00 d
9	E10	14 f-g	617 a-e	154 a-f	76 f-i	0.00 d
10	E11	15 c	579 a-f	231 a-c	64 h-j	0.00 d
11	E17	16 b	1051 a	301 a	199 a-c	85 b
12	H2	11 m-n	411 c-j	92 d-h	13 o	0.00 d
13	H3	13 j-k	259 i-j	110 c-h	23 n-o	0.00 d
14	H6	14 e-g	380 d-j	172 a-e	37 j-n	0.00 d
15	H11	15 c	365 e-j	78 f-h	20 n-o	0.00 d
16	M4	14 g-j	655 a-e	190 a-d	134 b-g	113 a-b
17	M5	12 m-n	723 a-d	165 a-f	164 a-e	0.00 d
18	M6	17 a-b	584 a-f	137 b-g	90 d-i	0.00 d
19	M8	13 h-k	594 a-e	159 a-f	183 a-c	0.00 d
20	M11	14 d-g	932 a-b	268 a-b	162 a-e	0.00 d
21	M12	15 c	550 a-g	118 c-h	126 b-h	128 a
22	M13	14 g-j	607 a-e	93 d-h	170 a-d	0.00 d
23	M15	14 g-h	571 a-g	167 a-f	269 a	88 b
24	M25	11 n	419 c-j	96 d-h	78 f-i	0.00 d
25	Q1	17 a-b	252 j	64 g-i	19 n-o	0.00 d
26	Q2	15 c	374 d-j	115 c-h	199 a-c	0.00 d
27	Q3	15 c-e	406 c-j	117 c-h	30 k-n	0.00 d
28	Q4	17 a-b	496 b-i	108 c-h	31 k-n	0.00 d
29	Q5	15 c	374 d-j	131 b-h	25 l-o	0.00 d
30	Q8	13 j-k	667 a-e	170 a-f	86 e-i	0.00 d
31	Q9	15 c-f	507 b-h	172 a-e	72 g-i	0.00 d
32	Q10	14 g-h	576 a-f	137 b-g	51 i-k	0.00 d
33	Q11	15 c-d	763 a-c	175 a-e	90 d-i	0.00 d
34	Q23	13 k	668 a-e	169 a-f	71 g-i	0.00 d
35	Q25	75 l-m	639 a-e	222 a-c	148 a-f	0.00 d
36	Q27	14 g-i	571 a-g	95 d-h	267 a	35 c
37	Q28	13 h-k	587 a-f	146 a-f	111 c-h	0.00 d
38	T107	16 b	445 c-j	151 a-f	227 a-b	0.00 d
39	T154	17 a	628 a-e	179 a-e	73 g-i	0.00 d
40	2	15 c	536 b-g	114 c-h	24 l-o	0.00 d
41	4	15 c	434 c-j	171 a-f	27 k-n	0.00 d
42	Test.	12 l	257 j	95 d-h	47 i-l	0.00 d

Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba de significación de Duncan (0.05).

En general se verificó que las cepas de rizobio tienen una amplia variabilidad en lo que se refiere a las características de especificidad, infectividad y efectividad. Al respecto, varios autores señalan que en la simbiosis leguminosa – *Rhizobium*, cada especie bacteriana nodula generalmente con un grupo específico de leguminosa. MEGIAS *et al.* (1993) señalan que los genes nod ABC son los responsables por la especificidad hospedera. Estos genes están involucrados en la síntesis y transporte de pequeñas moléculas de lipopolisacáridos que son reconocidos de una manera específica por la planta hospedera. Otros autores como BRELLES Y BOIARDE (1992), citados por SANTILLANA (1995), indican que las lectinas del hospedero y varios metabolitos de bajo peso molecular contribuyen en la especificidad hospedera. Se propone que la lectina producida por el trébol sea una proteína que sirva de puente entre carbohidratos similares de la superficie de los pelos radiculares de la planta y del rizobio.

En términos prácticos, es deseable que las cepas presenten capacidad de fijar N<sub>2</sub> con el mayor número posible de variedades del hospedero, sin embargo, está documentado que las cepas de *Rhizobium* presentan una especificidad hospedera muy acentuada. FREIRE (1992), indica que de cinco cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, dos cepas fueron efectivas en una sólo especie de trébol, otras dos cepas, en dos especies de trébol y una sólo cepa fue efectiva en tres variedades de trébol. Asimismo, el mismo autor encontró que dos cepas aisladas de

*Trifolium subterraneum* y *Trifolium fragiferum* respectivamente, no formaron nódulos en *Trifolium riograndense*. De la misma forma se señala la variabilidad de comportamiento entre cepas de *Rhizobium* en una misma especie o cultivar. FREIRE (1992), señala que de cinco especies de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii evaluadas en plantas de *Trifolium repens*, sólo dos, fueron efectivas y tres fueron inefectivas. Asimismo ANDRADE (1986) encontró que el 68% de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii aisladas presentaron baja efectividad, 24% mediana efectividad y sólo el 8% presentó buena efectividad cuando fueron evaluadas en *Trifolium riograndense*. En la presente investigación se determinó que el 16% de las cepas evaluadas fueron eficientes en trébol rojo, el 27% en trébol blanco y sólo el 13.5% en trébol nativo.

Asimismo, se observó que sólo el 5% de las cepas evaluadas en condiciones de invernadero fue eficiente en trébol rojo y trébol blanco y el 8%, fue eficiente en trébol blanco y trébol nativo, ninguna de las cepas evaluadas fue eficiente en las tres variedades de trébol evaluadas.

Las diferencias entre las cepas de rizobio en cuanto a la eficiencia fijadora de  $N_2$  puede deberse a que algunas cepas poseen el sistema enzimático hidrogenasa, que puede reciclar el  $H_2$  liberado durante la reducción del  $N_2$ , aumentando así la eficiencia energética del sistema tal como informan PALACIOS *et al.* (1990) y FERNÁNDEZ *et al.* (2005), mientras que la variabilidad en la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno de las cepas en combinación con los diferentes genotipos de plantas puede

estar relacionada con la alta especificidad hospedera que presentan algunas cepas de rizobio (DENAIRE *et al.* 1996).

Considerando que las cepas de *Rhizobium* difieren en cuanto a su eficiencia en la fijación del nitrógeno atmosférico, la evaluación de esa característica constituye una etapa importante en el proceso de selección de cepas, considerando su aplicación en la agricultura, a través de su utilización en inoculantes. Los resultados de la presente investigación permiten señalar que las cepas E2, M5, M8, M11, M25, Q11 y T154 fueron eficientes en trébol rojo, las cepas E8, H11, M4, M6, M13, M15, Q4, Q11, Q23, Q27 y T154 fueron eficientes en trébol blanco y las cepas E17, M4, M12, M15 y Q27 fueron eficientes en trébol nativo.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, para las condiciones en las que se llevó a cabo el trabajo experimental, se plantean las siguientes conclusiones:

- 1.- Se determinó que las cepas de rizobio aisladas de *Trifolium amabile* son capaces de nodular plantas de *Trifolium pratense* y *Trifolium repens*.
- 2.- En condiciones de solarío, las cepas E2, E17, M25 y Q8 fueron eficientes en trébol rojo, mientras que en trébol blanco y trébol nativo ninguno de las cepas evaluadas superaron al control sin inocular.
- 3.- En condiciones de invernadero, se determinó que las cepas E2, M5, M8, M11, M25, Q11 y T154 fueron eficientes en trébol rojo, las cepas

E8, H11, M4, M6, M13, M15, Q4, Q11, Q23, Q27 y T154 fueron eficientes en trébol blanco y las cepas E17, M4, M12, M15 y Q27 fueron eficientes en trébol nativo.

4.- Las cepas Q11 y T154 fueron eficientes en las variedades de Trébol rojo y trébol blanco mientras que las cepas M4, M15 y Q27 fueron eficientes en las variedades de trébol blanco y trébol nativo.

5.- En condiciones de invernadero se determinó que el 16% de las cepas evaluadas fueron eficientes en trébol rojo, el 27% en trébol blanco y sólo el 13.5% en trébol nativo.

## **4.2 RECOMENDACIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere las siguientes recomendaciones:

- 1.- Realizar pruebas en campo para corroborar la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de las cepas E2, M5, M8, M11, M25, Q11, y T154 en trébol rojo (*Trifolium pratense* Var. Queñikeli).
- 2.- Realizar pruebas en campo para determinar la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de las cepas E8, H11, M4, M6, M13, M15, Q4, Q11, Q23, Q27 y T154, en trébol blanco (*Trifolium repens* L. Var. Ladino).

- 3.- Evaluar en condiciones de campo para determinar la eficiencia, en la fijación de nitrógeno atmosférico, de las cepas E17, M4, M12, M15, y Q27, trébol nativo (*Trifolium amabile*).
  
- 4.- Evaluar las 60 cepas utilizadas en el presente experimento, en otras variedades de trébol para determinar su eficiencia y especificidad.
  
- 5.- Realizar pruebas de las 60 cepas de rizobio en suelos esterilizados para determinar su eficiencia y especificidad.

## RESUMEN

“SELECCIÓN DE CEPAS DE RIZOBIO AISLADAS DE TREBOL NATIVO (*Trifolium amabile*), EN CONDICIONES DE SOLARIO E INVERNADERO, AYACUCHO 2750 msnm. 2009.”

La evaluación de la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico de cepas de Rizobio, aisladas de *Trifolium amabile*, en condiciones de solario e invernadero, se condujo en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería (PIPG) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSCH. En condiciones de solario se utilizó 60 cepas de Rizobio y como plantas indicadoras se utilizaron: Trébol rojo Var. Queñikeli, Trébol blanco Var. Ladino y el Trébol nativo; estableciéndose dos semillas germinadas por tubo de ensayo, que contenía Solución nutritiva de Jensen. En invernadero se evaluó 37 cepas seleccionadas en solario más 4 cepas de control. Se utilizó macetas de polietileno y bolsas de plástico de 1Kg de capacidad, considerando dos plántulas por maceta. Se inoculó cuando las plantas presentaron las primeras hojas trifoliadas. El experimento se condujo en un diseño Completamente al Azar con tres repeticiones por tratamiento. En solario se evaluó altura de planta, peso seco y peso fresco de la parte aérea y número de nódulos; para el caso de invernadero se incrementó la variable 'peso seco de la raíz'. De las 60 cepas de *Rhizobium* probadas en condiciones de solario y considerando la evaluación de todas las variables, se determinó que las cepas E2, E17, M25 y Q8 se comportaron como efectivas en trébol rojo (*Trifolium pratense*), al superar en las diferentes variables evaluadas al testigo; en trébol blanco y trébol nativo no se determinaron cepas de rizobio efectivas. En condiciones de invernadero se determinó que las M8, M11, M25, Q11 y T154 fueron eficientes en trébol rojo, las cepas E8, H11, M4, M6, M13, M15, Q4, Q11, Q23, Q27 y T154 fueron eficientes en trébol blanco y las cepas E17, M4, M12, M15 y Q27, en trébol nativo. Las cepas Q11 y T154 fueron eficientes en las variedades de Trébol rojo y trébol blanco mientras que las cepas M4, M15 y Q27 fueron eficientes en las variedades de trébol blanco y trébol nativo.

## LITERATURA CITADA

1. ANDRADE, D. 1986. Selección de Cepas Nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii para *Trifolium riograndense*. Tesis Maestría en Ciencia del Suelo. Universidad Federal de Río Grande del Sur. Porto Alegre - Brasil.
2. ARAUJO, R. 1994. Fijación Biológica del Nitrógeno. *In: Araujo, R. Y Hungría, M. /eds*). 1994. Microorganismos de Importancia Agrícola. Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria, EMBRAPA. 91 – 120.
3. BARRIENTOS, L. D.; PINO I. N. y MÉNDEZ, E. A. 1995. Efectividad y Competitividad de Cepas Nativas de *Rhizobium* Evaluadas en Suelos IX Región. *In: Agricultura Técnica*. Chile. julio - diciembre. pp. 226-232.
4. BLÁSQUEZ, C. M. 1978. Selección de Cepas de *Rhizobium Trifolii* en Trébol Blanco (*Trifolium repens* L. Variedad Ladino) en Condiciones de Invernadero (Huamanga, 2750 msnm.) y Campo (Allpachaka 3500 msnm.) Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.
5. CALDERÓN, W. V. 2003. Inoculación de Cepas Nativas de *Rhizobium sp.* En *Arachis Hypogaea* L. "Maní" en Condiciones de Invernadero. La Merced Chanchamayo- 2002. Tesis Blg. UNSCH. Ayacucho – Perú. 44 p.

6. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Cali.
7. DANIEL, C. R. 1995. Estudio de la Compatibilidad de Fuentes y Niveles de Fertilizante Nitrogenado con el *Rhizobium trifolii* en Trébol Rojo (*Trifolium Pratense*) en Condiciones de Invernadero. Tesis Ing. Agrónomo. UNSCH. Ayacucho-Perú. pp 06.
8. DENAIRE, J.; DEBELLE, F. y PROMÉ, J. 1996. Rhizobium Lipochitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. Annual Review of Biochemistry 65, 503-535.
9. DOBEREINER, J. 1997. Recent Advance *In*: BNF With non-Legume Plant. Soil Biol. Biochem. 29, 911-922.
10. DURAND, F. G. 2008. Fenología de Diez Especies de Pastos Naturales de los Pastizales Altoandinos de la Comunidad de Ccarhuaccpampa – Ayacucho. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú. pp 12.
11. FERNANDEZ, D.; TOFFANIN, A.; PALACIOS, J. e IMPERIAL, J. 2005. Hidrogenase Genes are Uncommon and Highly Conserved *In*: Rhizobium Leguminosarum. FEMS Microbiology Letters 253, 83-88.
12. FREIRE, J. R. 1992. Fijación Delnitrógeno por la Simbiosis Rizobio – Leguminosa. *In*: CARDOSO, E.J.; SIU, M.T.; NEVES, M.C.

1992. Microbiología del Suelo. Campiñas, Sociedad Brasileña de Ciencia del Suelo. pp121 – 136.
13. GARCIA, B. M. 1979. Selección de Cepas de *Rhizobium Trifolii* en Trébol Blanco (*Trifolium repens* L. Variedad Ladino) en Condiciones de Invernadero (Huamanga, 2750 m.sn.m) y Campo (Allpachaka 3500 m.s.n.m)". Tesis Ing. Agrónomo. UNSCH. Ayacucho-Perú.
14. GATICA, R. R. 2005. Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) en Praderas del Sur de Chile. Tesis Ing. Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. pp 3. Disponible en: [www.reinadelasforrajeras.110mb.com/FSN.pdf](http://www.reinadelasforrajeras.110mb.com/FSN.pdf). consultado el 12-10-2010.
15. GERARDO J.; MACHADO, H. y SEGUI, E. 1991. Evaluación y Discriminación de Zonas Para la Selección de Variedades. Pastos y Forrajes. 14:107.
16. GRAHAM, P. 1990. Problemas de la Nodulación y la Fijación del Nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. una Reevaluación. Terra. Vol. 08. Número especial pp 71-82.
17. HORBER, F. 1984. Experiencias en la Fertilización de Pastos Nativos. COTESU-UNSCH. Lima – Perú. Revalidado Proleche Ayacucho Trabajos en Puna.
18. IZAGUIRRE, M. M.; LABANDERA, C. y SANJUAN, J. 2007. Biofertilizantes en Iberoamérica: una Visión Técnica, Científica y

Empresarial. 1<sup>er</sup> Edición. Edit. Imprenta Denad Internacional S.A.  
Montevideo-Uruguay. 101 p.

19. KOZUSNY-ANDREANI, D. 2004. Inoculation of Leguminous With Rhizobia for Rehabilitation of soil Degraded by Cassiterite Minig in the Amazon Region. P.108. *In: Abstracts Latin-american Conference on Rhizobiology. RELAR.*
20. LANE, L. A. 2000. The Pastoral Significance, Adaptive Characteristics, and Grazing Value of White Clover (*Trifolium repens* L.) *in: Dryland Environments in Australia: A Review. Australian Journal of Experimental Agriculture* **40**: 1033-1046.
21. MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER, J. 1997. Biología de los Microorganismos. México. Prentice Hall Iberia, 986 p.
22. MEGIAS, M.; FOLCH, J. y SOUSA, C. 1993. Control of the Expression of Bacterial Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v.9, pp 444-454.
23. PALACIOS, J.; MURILLO, J. y LEYVA, A. 1990. Differential Expresión of Hidrogen Uptake (hups genes) *In: Vegetative and Symbiotic Cells of Rhizobium Leguminosarum. Molecular Genetics* **221**, 363-370.
24. POUND, B. y MARTINEZ, C. L. 1985. Leucaena su Cultivo y Utilización. Londres Overseas Development Administration. pp. 16-

25. RODRIGUEZ, B. C. 1984. La Fijación de Nitrógeno Atmosférico una Biotecnología en la Producción Agraria. 1<sup>er</sup> Edic. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. 65 p.
26. RZEDOWSKI, G. C. y RZEDOWSKI, J. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2da ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
27. SANTILLANA, N. 1995. Evaluación de Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii para la Producción de Inoculantes para Trébol Rojo (*Trifolium pratense*). Tesis Maestría en Microbiología Agrícola y del Ambiente. Universidad Federal de Rio Grande del Sur. Porto Alegre - Brasil.
28. THOMAS, R.G. 1987. The Structure of The Mature Plant. *In*: MJ Baker, WM Williams, eds. *White Clover*. CAB International Wallingford. pp 1-29.
29. URZÚA, H.; URZÚA, J. y PIZARRO, R. 2001. Pre-selección de Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae en Vicia Forrajera, para Abonos Verdes. Ciencia e Investigación. Agraria 28(1), 3-6.
30. URZÚA, H. 2000. Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile: Importante Herramienta Para una Agricultura Sustentable. Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Arequipa, Perú. pp 211-227.

31. VILLASEÑOR R., J. L. y ESPINOSA G., F. J. 1998. Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
32. WILLIAMS, 1987. White Clover Taxonomy and Biosystematics. *In*: MJ Baker, WM Williams, eds. *White Clover*. CAB International Wallingford. pp 323-342.

# **ANEXOS**

**Anexo 01,** La figura 01 muestra los materiales que se utilizaron para la desinfección de las semillas de trébol.



**Fig. 01**

**Anexo 02,** en la figura 02, se aprecia el proceso de lavado de las semillas de trébol.



**Fig. 02**

**Anexo 03,** La figura 03 muestra la germinación de las semillas de trébol en placa petri.



**Fig. 03**

**Anexo 04,** La figura 04 muestra la siembra de las semillas germinadas en los tubos de ensayo, el cual contiene solución nutritiva de Jensen.



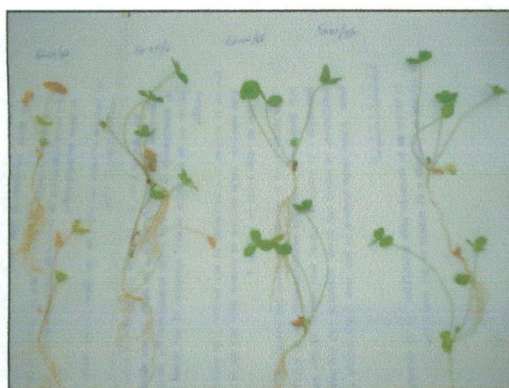
**Fig. 04**

**Anexo 05**, en la figura 05, se observa el crecimiento del trébol en medio de una solución nutritiva de Jensen.

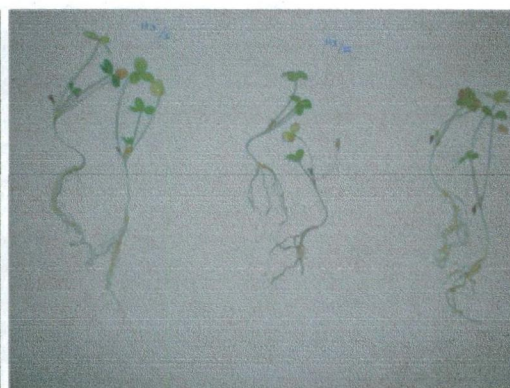


**Fig. 05**

**Anexo 06**, La figura 06 muestra el trébol sin nódulos, mientras que la figura 07 muestra plantas de trébol con presencia de nódulos en la raíz.



**Fig. 06**



**Fig. 07**

**Anexo 07**, en la figura 08, se observa el panorama del crecimiento del trébol rojo; asimismo en la figura 09 se muestra la forma de inoculación al trébol con cepas de *Rhizobium*.



Fig. 08



Fig. 09

Anexo 08, La figura 10 muestra las diferencias entre el testigo y la cepa Q4 en el crecimiento del trébol blanco.



Fig. 10

**Anexo 09**, en la figura 11, se aprecia la respuesta del trébol rojo a la cepa E2, y en la figura 12 la respuesta a la cepa M11.



**Fig. 11**



**Fig. 12**

**Anexo 10**, La figura 13 muestra la eficiencia de la cepa M6 en el crecimiento del trébol blanco.

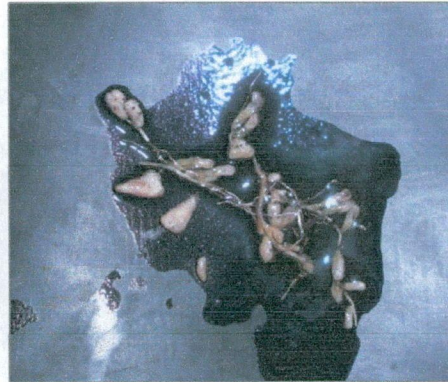


**Fig. 13**

**Anexo 11**, en la figura 14, se observa el desarrollo radicular del trébol rojo, y en la figura 15 los nódulos de la misma planta.



**Fig. 14**



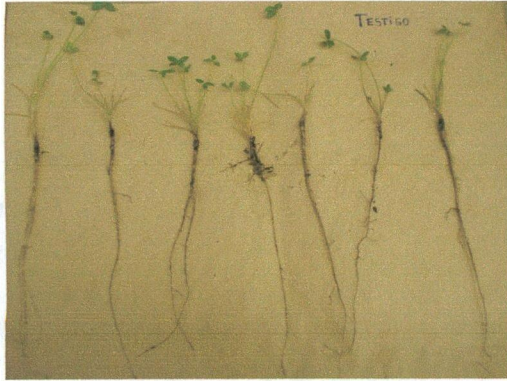
**Fig. 15**

**Anexo 12**, en la figura 16, el trébol nativo no tiene un buen desarrollo.



**Fig. 16**

**Anexo 13,** en la figura 17, se observa que en el testigo del trébol nativo no hay presencia de nódulos; en la figura 18, en la cepa M6 del trébol nativo no hay presencia de nódulos.



**Fig. 17**



**Fig. 18**