

Artículo Original

## Caracterización de endófitos simbióticos aislados de leguminosas nativas de la Amazonía peruana

[Characterization of symbiotic endophytes isolated of native legumes from Peruvian amazon]

Becker A. Reyna<sup>1\*</sup>, Patricia del Carmen Barrera<sup>2\*</sup>, Álvaro Tresierra-Ayala<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dirección Regional de Salud Loreto. Dirección de Salud Ambiental. Leticia N° 574, Iquitos, Perú.

<sup>2</sup>Certificaciones y Calibraciones SAC. Gabriela Mistral N° 15038, Lima, Perú

<sup>3</sup>Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Iquitos, Perú.

\*E-mail de contacto: beckerelo\_reas@hotmail.com; pbarrera07@gmail.com

---

### RESUMEN

Se aisló y determinó la capacidad infectiva y efectiva en FBN de 10 cepas endófitas, de tres especies de leguminosas (macrosimbiontes): *Inga edulis* C. Mart.; *Desmodium adscendens* (Sw.) DC.; *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks., aisladas de bosques primarios, secundarios e intervenidos. De las 10 cepas aisladas se logró identificar genotípicamente 06. Las 10 cepas aisladas (microsimbiontes) fueron inoculadas en sus respectivos tratamientos (macrosimbiontes) en condiciones controladas, reportándose infectividad (nódulos) en 4 de estos. Se registró diferencia significativa en las cepas IeBS-C1 y IeBS-C2 frente al control empleado, pero ambas tienen la misma efectividad (CFN) con o sin la presencia de los endófitos simbióticos. Se registró diferencia significativa en las cepas IeBI-C1 y IeBI-C2 frente al control empleado, porque ambas tienen mejor efectividad (CFN) con la presencia de los endófitos simbióticos. No se registró diferencia significativa en las cepas DaBS-C1, DaBS-C2, DaBI-C1 y DaBI-C2 frente al control empleado, todas tienen la misma efectividad (CFN) con o sin la presencia de los endófitos simbióticos.

**Palabras clave:** macrosimbionte, microsimbionte, FBN, CFN, infectividad, efectividad

### ABSTRACT

Was isolated and determined the infectivity and effective capacity BNF of 10 endophytes strains, of three species of legumes (macrosymbiont): *Inga edulis* C. Mart.; *Desmodium adscendens* (Sw.) DC.; *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks., isolated from primary forests, secondary and intervened forest. Of the 10 isolates was identified by genotyping 06. The 10 isolates (microsymbiont) were inoculated on their respective treatments (macrosymbiont) under controlled conditions, reporting infectivity (nodules) in 4 of these. There were significant differences in the strains IeBS-C1 and IeBS-C2 used versus control, but both have the same effectiveness (NFC) with or without the presence of endophytes symbiotic. There were significant differences in the strains IeBI-C1 and IeBI-C2 used versus control, because both have better effectiveness (NFC) with the presence of endophytes symbiotic. No significant differences in the strains DaBS-C1, DaBS-C2; DaBI-C1 and DaBI-C2 used versus control, all have the same effectiveness (NFC) with or without the presence of endophytes symbiotic.

**Keywords:** macrosymbiont, microsymbiont, BNF, NFC, infectivity and effective

## INTRODUCCIÓN

La selva baja peruana representa actualmente para el Perú y el mundo una de las más ricas formaciones de vida de la tierra. El actual conocimiento científico de su flora, fauna y ecología es insuficiente (Kalliola 1998). En nuestra Amazonía, los estudios a nivel microbiano, en países en desarrollo como el Perú, son escasos debido al costo que significa su realización. La fijación biológica del nitrógeno (diazotrofia) es un proceso muy antiguo. En el caso de los rizobios, el nitrógeno es fijado dentro de estructuras especializadas, los nódulos, que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las leguminosas (Lloret y Romero, 2005).

Las leguminosas son una familia grande y diversa de plantas con flores, constituyen la segunda familia en importancia alimenticia humana y animal. Son las únicas plantas superiores (macrosimbiontes), capaces de establecer asociaciones simbióticas con bacterias del orden *Rhizobiales*. Dentro de este contexto, las especies del género *Desmodium* son herbáceas de uso medicinal. Las especies del género *Inga* sirven como fuente de alimentación de un gran número de especies animales (Lloret y Romero, 2005).

El género *Ormosia* tiene una importancia económica considerable en el poblador amazónico debido al empleo de las semillas de éstas en artesanías. Además, estos tres géneros ayudan a nitrificar los suelos en los cuales se desarrollan (Lloret y Romero, 2005). Nuestros suelos amazónicos no son aptos para la práctica de una agricultura intensiva, es por esto que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es una de las alternativas más promisorias para la agricultura de bajos insumos en regiones tropicales como subtropicales por la capacidad de fijar nitrógeno contribuyendo con el balance de nutrientes en los diferentes ecosistemas (Hara y Oliveira 2004).

Las características propias de los ecosistemas amazónicos nos llevaron a pensar en la posibilidad de aislar endófitos simbióticos a partir de nódulos formados en estas leguminosas nativas, a fin de ser caracterizados mediante bioensayos de inoculación en plántulas de dichas leguminosas. Es así que el objeto del presente estudio fue caracterizar

endófitos simbióticos aislados de leguminosas nativas de bosques primarios, secundarios e intervenidos de la Amazonía Peruana de la Amazonía Peruana, determinando la infectividad y efectividad de éstos microsimbiontes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase campo

Durante esta fase se realizó la recolección de especímenes biológicos en el Km. 31,5 de la carretera Iquitos-Nauta (Ex Fundo UNAP), y en la Comunidad Bora de Padre Cocha, Río Nanay. De estos lugares se colectaron y seleccionaron las semillas de las especies de *Desmodium adscendens* (Sw.) DC, *Inga edulis* C. Mart. y *Ormosia coccinea* (Aubl.) Jacks. (figura 01), tomando en consideración el tipo de bosque del cual fueron extraídas.

### Fase de laboratorio

Se efectuó en los laboratorios del IVITA-UNMSM y del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP.

Se aisló un total de 10 cepas: cuatro cepas por cada especie de *D. adscendens* (Sw.) DC e *I. edulis* C. Mart., (Dos por cada tipo de bosque: secundario e intervenido); y dos cepas de *O. coccinea* (Aubl.) Jacks. (2 por bosque primario). Se empleó un individuo para cada cepa, el mismo que contaba con el número mínimo de nódulos requeridos para la fase de aislamiento en laboratorio (30-50 nódulos) (Acuña, 1996). Se lavó los nódulos en agua destilada estéril, luego se desinfectó con etanol al 95% y HgCl<sub>2</sub> al 0,1% para preparar el macerado respectivo, posteriormente se sembró en agar YEM e incubadas por 24 horas. Después de incubar las muestras, se evaluó las placas en las cuales se pudo apreciar el desarrollo de colonias blanquecinas (a veces translúcidas), de aspecto mucoso (figura 02).

Así mismo se evaluó el crecimiento de las colonias teniendo en consideración ciertos criterios físicos como: forma, color, tiempo de crecimiento, procedencia. Luego se procedió a repicar colonias características en agar PSY, preparándose una suspensión bacteriana en PSY líquido, conservada en congelación (-70), en tubos de plásticos estériles con tapa rosca, con glicerol líquido, para luego ser inoculadas

en semillas de sus macrosimbiontes respectivos, y ser enviadas para su respectiva identificación genotípica, que se realizó en el laboratorio de microbiología del suelo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada-España).

Para la selección de las semillas se tuvo en cuenta la fenología de la especie (Tiempo de floración y fructificación), el tiempo de germinación en laboratorio mediante bioensayos, importancia experimental y científica de la especie. Para asegurar que semillas de *Desmodium adscendens*, *Inga edulis* y *Ormosia coccínea* estuvieran libres de cualquier otro microorganismo del medio se procedió a lavarlos con agua destilada estéril y desinfectarlos con etanol al 96% y peróxido de hidrógeno al 15%. Asegurando su germinación en oscuridad a 28 °C durante 48 horas y por 18 días para el caso de *Ormosia coccínea*. Así mismo para asegurar la interrelación entre los macro y microsimbiontes se empleó una solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), constituida por Macroelementos y Microelementos necesarios para el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

Para la preparación de los inóculos bacterianos, las cepas aisladas fueron sembradas por duplicado en dos placas de Agar YEM e incubadas durante 2-3 días a temperatura ambiente. Se cosechó y preparó suspensiones bacterianas en suero fisiológico estéril, que debieron poseer una turbidez similar al tubo 2 del nefelómetro de Mc Farland.

#### *Fase experimental*

Para la inoculación de las plántulas germinadas, se tuvieron en cuenta semillas que mostraron un grado de crecimiento uniforme, para luego ser colocadas en macetas estériles rellenas con arena blanca que.

Cada planta fue regada diariamente con la solución mineral modificada de Rigaud y Puppo (1975). Todas las plantas seleccionadas fueron inoculadas con 1 ml de una suspensión de la cepa adecuada ( $6 \times 10^8$  cels/ml de inóculo). Las macetas se trasladaron a un ambiente abierto a fin de proporcionarles condiciones climáticas naturales.

Las plantas fueron cosechadas según la especie de leguminosa y los días se contabilizaron desde el momento de la siembra e inoculación, según se detalla a continuación: *Desmodium adscendens* a los 50 días; *Inga edulis* a los 70 días; *Ormosia coccínea* a los 120 días.

Se experimentó con un total de 15 tratamientos (10 experimentales y 5 controles. El número de repeticiones por tratamiento (individuos) fue de 10 por cada tipo de bosque.

#### *Procesamiento de datos*

Para determinar algunos parámetros fisiológicos de las plantas inoculadas, se tuvo en cuenta el número de nódulos (NN), el peso seco de nódulos (PSN), así como el peso seco de la planta (PSP). Datos que sirvieron para evaluar la eficiencia de las cepas aisladas en la fijación de nitrógeno.

Para el análisis estadístico se empleó un análisis de varianza (ANOVA), mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con base de un diseño de 3 tratamientos (02 experimentales y 01 control) por especie de leguminosa y 10 repeticiones por tratamiento, para evaluar el grado de significancia de una cepa con otra con referencia a la capacidad fijadora de nitrógeno, según el tipo de ecosistema de la cual fue aislada, empleando el programa estadístico SPSS.



**Figura 01.** Forma de semillas: A) *Desmodium adscendens*, B) *Inga edulis*, C) *Ormosia coccínea*



**Figura 02.** Colonias características de microsimbiontes

## RESULTADOS

### *Aislamiento de endófitos simbióticos de plantas leguminosas*

En la tabla 01, se describe las características morfológicas de los nódulos seleccionados para el aislamiento de las cepas, según el tipo de bosque en la cual fueron encontradas las especies de leguminosas: Número de nódulos por planta (NN/P), Promedio de diámetro (DN), longitud (LN) y peso fresco de cada nódulo (PN).

Las 10 cepas aisladas tuvieron un tiempo de crecimiento Rápido (dentro de las 24 horas), las colonias aisladas eran pequeñas, translúcidas, mucosas y blanquecinas.

### *Determinación de la infectividad y efectividad de endófitos simbióticos de plantas leguminosas*

- *Determinación de la infectividad*

En la tabla 02, se muestra la identificación genotípica de cada una de las cepas aisladas, mediante la técnica de PCR y la capacidad infectiva de las mismas.

**Tabla 01.** Características morfológicas de los endófitos según el Tipo de bosque.

Cepas	Características de Nódulos	NN/P	Prom DN (mm)	Prom LN (mm)	Prom PN (g)
IeBS-C1 (P)	Redondeados, medianos, de textura rugosa, de color marrón claro; distribuidos en raíces primarias y secundarias.	30	7	9	0,05
IeBS-C2 (P)	Redondeados, medianos, de textura rugosa, de color marrón claro, distribuidos en raíces primarias y secundarias.	15	7	9	0,09
IeBI-C1 (I-N)	Nódulos redondeados, medianos, de textura rugosa; de color crema claro con pequeñas manchas marrones, distribuidos en raíces primarias y secundarias.	12	6	9	0,008
IeBI-C2 (I-N)	Redondeados, ovoides y alargados, medianos, de color crema claro, distribuidos en raíces secundarias.	60	7	9	0,010
DaBS-C1 (I-N)	Medianos, amarronadas, de textura rugosa, distribuidos en raíces primarias y secundarias	12	5	2	0,009
DaBS-C2 (I-N)	Medianos, amarronadas, de textura rugosa, distribuidas mayormente en raíces primarias.	15	5	2	0,012
DaBI-C1 (I-N)	Relativamente pequeños de color crema, redondeados, de textura lisa, distribuidos numerosamente en raíces primarias, secundarias y terciarias.	250	4	2	0,016
DaBI-C2 (I-N)	Relativamente pequeños de color crema claro, redondeados, de textura lisa, distribuidos numerosamente en raíces primarias y secundarias.	80	4	2	0,014
OcBP-C1 (P)	Medianos, alargados, de color crema y marrón, de textura rugosa, distribuidas en raíces secundarios y terciarios.	I	13	2	0,04
OcBP-C2 (P)	Medianos, alargados, de color crema y marrón, de textura rugosa, distribuidas en raíces secundarios y terciarios.	I	12	2	0,06

(P): Padre Cocha-Río Nanay

I: Indeterminado

(I-N) : Km. 31.5 Iquitos-Nauta

**Tabla 02.** Identificación e infectividad de cepas aisladas de campo

Planta	Cepa	Colonias identificadas	Nº de nódulos	Infectividad	
				Positiva	Negativa
<i>Inga edulis</i>	IeBS-C1	<i>Rhizobium tropici</i>			1
<i>Inga edulis</i>	IeBS-C2	<i>Rhizobium gallicum</i>			1
<i>Inga edulis</i>	IeBI-C1	<i>Burkholderia sp.</i>	1	1	
<i>Inga edulis</i>	IeBI-C2	<i>Rhizobium sp.</i>	1	1	
<i>Desmodium adscendens</i>	DaBS-C1	1: <i>Staphylococcus sp</i> 2: <i>Microbacterium sp</i> 3: <i>Bacillus pumilus</i>	2	1	
<i>Desmodium adscendens</i>	DaBS-C2	4.1: <i>Bacillus cereus</i> , 4.2: <i>Bacillus firmus</i> 5: <i>Arthrobacter oxydans</i>			1
<i>Desmodium adscendens</i>	DaBI-C1	6.1: <i>Staphylococcus sp</i> 6.2: <i>Microbacterium sp</i> 7.1: <i>Bacillus cereus</i> 7.2: <i>Acinetobacter baylyi</i>	2	1	
<i>Desmodium adscendens</i>	DaBI-C2	8: <i>Bacillus sp.</i>			1
<i>Ormosia coccínea</i>	OcBP-C1	12.2: <i>Bacillus subtilis</i> 12.1.2: <i>Bacillus sp</i> 12.3: <i>Bacillus megaterium</i> 13.1.1: <i>Bacillus mycoides</i> 13.1.2: <i>Bacillus sp</i> 13.2: <i>Bacillus pumilus</i>			1
<i>Ormosia coccínea</i>	OcBP-C2	14: <i>Burkholderia tropicalis</i> 18: <i>Bacillus thuringiensis</i> 19: <i>Burkholderia mimosarum</i>			1
Total	$\Sigma = 10$		6	4	6
%	$\Sigma = 100\%$			40 %	60 %

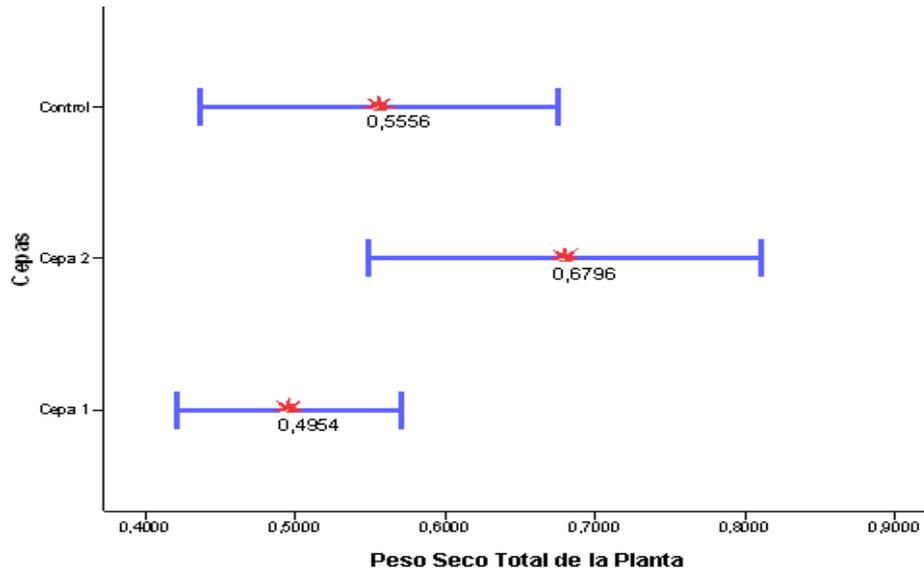
**Fuente:** Laboratorio microbiología molecular de suelos-CSIC. España (2007-2008)

- *Determinación de la efectividad*

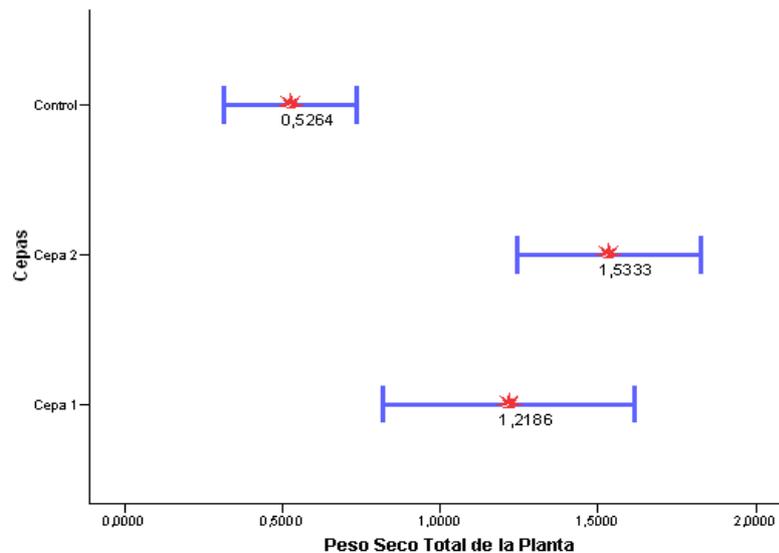
A) Efectividad de endófitos simbióticos en la especie *Inga edulis* C. Mart.

En la figura 03 se muestra los valores promedios de peso seco total (unidad de comprobación de fijación de nitrógeno), considerando un intervalo de confianza (IC) del 95%. Al comparar la efectividad de fijación de nitrógeno (FN) de los endófitos simbióticos (cepa 1 y cepa 2), frente al tratamiento control (sin presencia del endófito simbiótico); se encontró diferencias significativas ( $F=3,642$ ,  $gl=2,27$ ,  $p=0,040$ ), donde la prueba de comparaciones múltiples de Tukey demuestra que ambas cepas presentan diferente capacidad de FN ( $p=0,035$ ); aunque la eficacia de FN del tratamiento control es similar a la cepa 1 ( $p=0,666$ ) y cepa 2 ( $p=0,195$ ), lo cual indica que a los 70 días, *Inga edulis*, tiene la misma capacidad de FN con o sin la presencia de los endófitos simbióticos.

En la figura 04 se muestra los valores promedios de peso seco total de *Inga edulis* de Bosque Intervenido, considerando un IC del 95%. Comparando la efectividad de FN de los endófitos simbióticos, frente al tratamiento control; se encontró diferencias altamente significativas ( $F=14,178$ ,  $gl=2,27$ ,  $p=0,000$ ), donde la prueba de comparaciones múltiples de Tukey demuestra que tanto la cepa 1 ( $p=0,004$ ) como la cepa 2 ( $p=0,000$ ) se diferencian del control, resultando ser relativamente eficientes durante el periodo de evaluación (70 días). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey demuestra que ambas cepas presentan la misma capacidad de FN ( $p=0,252$ ).



**Figura 03.** Valores Promedio con IC del 95% del peso seco total de *Inga edulis* procedente de bosque secundario.

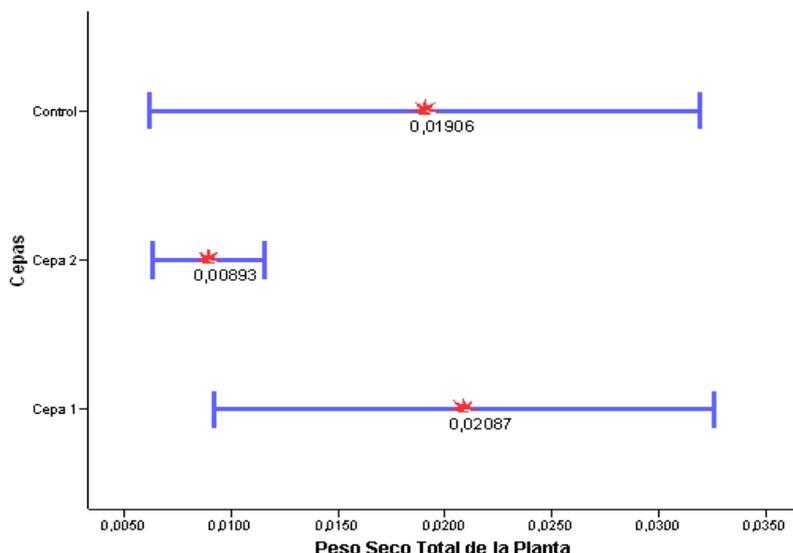


**Figura 04.** Valores Promedio con IC del 95% del peso seco total de *Inga edulis* procedente de bosque intervenido.

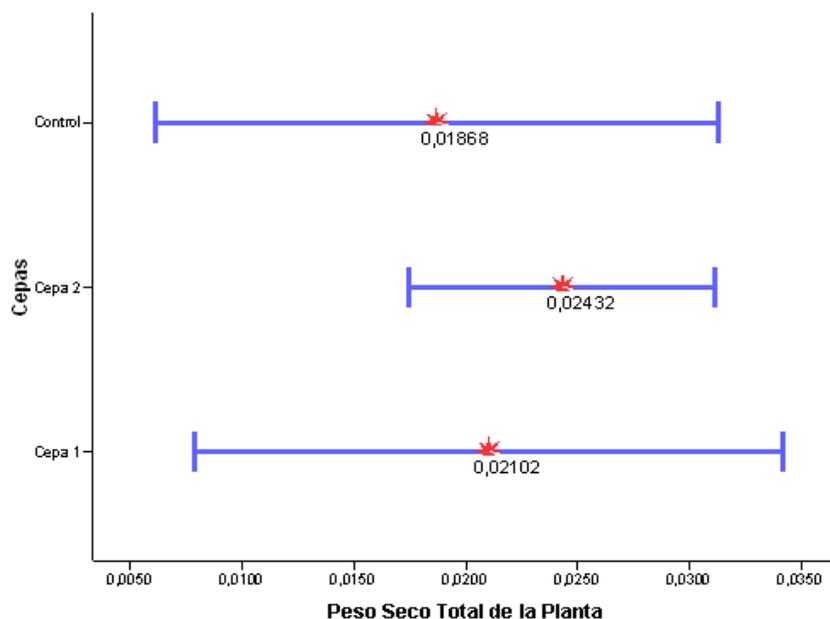
#### B) Efectividad de endófitos simbióticos en la especie *Desmodium adscendens* (Sw.) DC.

En la figura 05 se muestra los valores promedios de peso seco total, considerando un IC del 95%. Comparando la efectividad de FN de los endófitos simbióticos, frente al tratamiento control; no se encontró diferencias significativas ( $F=2,055$ ,  $gl=2,27$ ,  $p=0,148$ ), lo cual sugiere que durante el periodo de evaluación (50 días), *Desmodium adscedens*, tiene la misma capacidad de FN con o sin la presencia de los endófitos simbióticos.

La figura 06 muestra los valores promedios de peso seco total, considerando un IC del 95%. Comparando la efectividad de FN de los endófitos simbióticos, frente al tratamiento control; no se encontró diferencias significativas ( $F=0,326$ ,  $gl=2,27$ ,  $p=0,725$ ), lo cual sugiere que durante el periodo de evaluación (50 días), *Desmodium adscedens*, tiene la misma capacidad de FN con o sin la presencia de los endófitos simbióticos.



**Figura 05.** Valores Promedio con IC del 95% del peso seco total de *Desmodium adscendens* procedente del bosque secundario.



**Figura 06.** Valores Promedio con IC del 95% del Peso Seco Total de *Desmodium adscendens* procedente de bosque intervenido.

## DISCUSIÓN

Las especies *Desmodium adscendens* (Sw.) DC. e *Inga edulis* C. (Mart), en condiciones de campo, muestran una nodulación relativamente alta, siendo más elevada en la especie *Desmodium adscendens* (Tabla 1). El clima tropical que presenta nuestra Amazonia condiciona muchos de los procesos físico-químicos que se realizan dentro de ésta. Dichas condiciones ambientales (humedad, lluvia, nubosidad, elevadas temperaturas), posiblemente tuvieron influencia directa en los procesos que engloba el sistema simbiótico leguminosa-simbionte, tales como: la infección,

nodulación y fijación de nitrógeno. Al respecto, Acuña (1996) afirma que una buena inoculación puede resultar en un fracaso debido a la interferencia de factores ambientales en la formación de los nódulos.

Después de ubicar nuestros macrosimbiontes en sus respectivos tipos de bosques, se procedió a contar y seleccionar los nódulos viables empleados para aislar los microsimbiontes, teniendo como referencia los criterios considerados por Peticari (2005), quien afirma que el color rojizo de los nódulos es indicativo de la forma activa de la FBN, el

color blanco indicativo de nódulos no fijadores (ineficientes) y los nódulos de coloración verde, indicativos de paralización de la FBN y comienzo de la senescencia.

Para esterilizar y desinfectar los nódulos se usó agua destilada, etanol al 95% y HgCl<sub>2</sub> al 0,1%, tratando de eliminar cualquier otro microorganismo presente alrededor del nódulo. Este protocolo presentó algunas modificaciones respecto al empleado por Pandey et.al. (2004), quienes utilizaron etanol al 70% y 0,1 de HgCl<sub>2</sub> para la esterilización de los nódulos. Estas modificaciones pueden haber influido en los resultados, ya que se identificó otros microorganismos, propios del suelo, dentro de las cepas utilizadas como inoculantes (tabla 02), resultado que nos hace suponer que para asegurar un buen aislamiento y, consiguientemente, colonias puras, sería necesaria una mayor concentración tanto de etanol como de HgCl<sub>2</sub>. Para la selección de colonias puras se consideró la forma, color y apariencia de las colonias propias del orden rizobial. El repicaje de las colonias características se hizo con la finalidad de eliminar cualquier tipo de contaminantes y así obtener elevadas probabilidades visibles de cultivos puros, siguiendo las recomendaciones de Díaz y Souza (1985), quienes mantuvieron la pureza de sus cepas eliminando cualquier posible brote de contaminación mediante el repicaje de las cepas en medios recién preparados hasta obtener el desarrollo libre de contaminación. Las colonias aisladas en el presente estudio tuvieron un crecimiento rápido y todas eran pequeñas, translúcidas, circulares, blanquecinas y mucosas, resultados que coinciden con los reportados por Holt et al. (1994), quienes mencionan que las bacterias del género *Rhizobium*, presentan colonias circulares, convexas, semitraslúcidas, rizoides y mucilaginosas.

La tabla 02 presenta la identificación molecular de las cepas aisladas provenientes del campo, las mismas que sirvieron de inóculos para la fase experimental; observándose infectividad (nodulación) en dos de las especies de plantas seleccionadas. Así mismo con la identificación molecular se aisló especies de endofitos simbióticos fijadores de nitrógeno en *Ormosia coccínea*, aislándose al mismo tiempo otros microorganismos del género *Bacillus*, conocido

por formar parte de la rizofera. El hecho de no haberse encontrado nódulos en las plantas puede deberse a la presencia de otros microorganismos, quienes de un modo u otro inhibieron o retrasaron el proceso de nodulación en condiciones controladas, al respecto Cuevas y Ugarte (2000), aducen que dentro del complejo entramado químico de las relaciones entre los organismos del suelo, numerosas bacterias ejercen influencia alelopática negativa sobre los *Rhizobium*, y consecuentemente sobre la fijación del nitrógeno. Es necesario señalar que nuestro sustrato fue esterilizado a calor húmedo para evitar competencia alguna entre las cepas aisladas y cepas autóctonas, propiciando, aparentemente, un ambiente más favorable para el proceso simbiótico. Al respecto Gonzales y Lluch (1992), mencionan que aún no se ha demostrado que inoculantes para leguminosas sean efectivos en suelos con razas autóctonas, siendo la competición una limitación de este sistema. Aunque al esterilizar nuestro sustrato aparentemente evitamos la competencia y la influencia alelopática negativa de algunos microorganismos, también evitamos una posible interacción directa o indirecta positiva de otros microorganismos en la simbiosis. Sobre el particular Cuevas y Ugarte (2000), consideran que algunos organismos aparentemente no relacionados con la simbiosis, estimulan el desarrollo de bacterias simbióticas.

El poco número de nódulos presentes en los tratamientos de *Desmodium adscendens* e *Inga edulis* podría sustentarse en el hecho de que las condiciones a las cuales fueron expuestas en los bioensayos, difieren mucho de las condiciones de las cuales fueron aisladas. Magalhães y Da Silva (1987), afirman que si una especie no está nodulada en determinada condición ambiental no se debe considerar como incapaz de nodular hasta que su ausencia de nodulación sea confirmada en condiciones propicias para que esto ocurra. No obstante que el número de plantas noduladas y el número de nódulos presentes en éstas ha sido muy bajo en nuestros resultados (tabla 2), no se debe descartar a las cepas como eficaces o eficientes en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Magalhães y Da Silva (1987), Gomes y Franco. (1984) refuerzan nuestras interpretaciones. Así, los primeros

mencionan que los factores edáficos pueden limitar el establecimiento o el desenvolvimiento de la simbiosis Rizobium-leguminosa, y los segundos que el establecimiento y el desenvolvimiento de las diversas etapas de interacción Rhizobium-leguminosa dependen directa o indirectamente de las condiciones ambientales del suelo.

La tabla 02 presenta la identificación genotípica de muchos microorganismos que no pertenecen al orden rizobial, debido tal vez a que para el aislamiento de las colonias se tuvo que emplear una suspensión de colonias aparentes. En el caso de la especie *Inga edulis*, se logró identificar: *Burkholderia sp.* y *Rhizobium sp.* (Bosques intervenidos), y *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* (Bosques secundarios), indicativo de una buena selección de colonia. Sin embargo, no hubo evidencia física (nódulos), pudiendo deberse esto a la mala selección de la colonia a ser purificada para la fase de inoculación. Contrario a lo antes expuesto, la especie *Desmodium adscendens*, en ambos tipos de bosque, muestra evidencia de nodulación, sin embargo no coincide con la identificación genotípica, hecho que puede deberse a la mala selección de colonias para el repicaje y su posterior envío.

Según Stoyanova (2005), las especies *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia vietnamiensis* y *Burkholderia phymatum* son especies capaces de fijar nitrógeno y nodular en leguminosas tropicales así como probablemente en *Burkholderia caribensis* y *Burkholderia dolosa*, especies que pueden ser definidas como endosimbióticas. En la Tabla 2 se aprecia que la cepa IeBI-C1 inoculada en la especie *Inga edulis* pertenece al género *Burkholderia* la nodulación en este tratamiento pone en evidencia la capacidad de esta cepa para nodular en condiciones controladas.

De las 10 cepas aisladas e inoculadas en sus respectivas leguminosas, en suelo arenoso para probar la eficacia de su capacidad fijadora de N, se pudo comprobar la presencia de simbiontes en 6 de éstas cepas, de las cuales 3 pertenecen al género *Burkholderia* y 3 al género *Rhizobium* (Tabla 2), lo que demuestra un 60 % de buen aislamiento. Aunque la presencia de nódulos en las plantas inoculadas

demostraba infección visible de las cepas inoculadas, no necesariamente demostraban presencia del microsimbionte en la planta ni mucho menos actividad fijadora de N. Al respecto, García (2003), señala haber encontrado endofita *Burkholderia* en los órganos de teocintle (*Zea mays ssp mexicana*), especialmente en las raíces, tallo-hojas y semillas. Además afirma que la cepa aislada T41, aislada de la raíz de teocintle (*Zea mays ssp mexicana*) e inoculada en maíz (*Zea mays L.*), incrementó un 47% el peso seco de la raíz y un 57% la extensión del tallo, resultados que coinciden con los nuestros. Las cepas IeBI-C1 y IeBI-C2, resultaron ser eficientes en la producción de N durante el periodo de evaluación (70 días), confirmando también resultados reportados por Miana de Faria et al. (1984), quienes reportan la existencia de rizobios eficientes para las diversas especies vegetales germinadas, y que la inoculación de los microsimbiontes propiciaba cambios satisfactorios en los macrosimbiontes. Sin embargo las cepas IeBS-C1, IeBS-C2, DaBS-C1, DaBS-C2, DaBI-C1 y DaBI-C2, resultaron ser poco eficientes en la producción de N<sub>2</sub> durante el periodo de evaluación: 70 días para *Inga edulis* y 50 para *Desmodium adscendens*, resultados que difirieron con lo mencionado por Peticari (2005) quien afirma que en condiciones ideales de expresión de la simbiosis, la nodulación comienza a visualizarse entre los 3 a 5 días y la actividad de fijación de nitrógeno desde los 10 a 15 días de la emergencia de la plántula.

## CONCLUSIONES

Se demostró que la mayoría de los suelos analizados poseen textura arenosa, pH relativamente ácido y bajo porcentaje de materia orgánica disponible. El sustrato empleado, posee textura arenosa, pH alcalino y muy bajo porcentaje de materia orgánica disponible. Los nódulos se caracterizaban por ser redondeados, alargados de textura rugosa, distribuidas tanto en raíces primarias como secundarias. Se identificó genotípicamente 6 especies: *Burkholderia sp.* y *Rhizobium sp.* (*Inga edulis* C. (Mart.) bosques intervenidos); *Rhizobium tropici* y *Rhizobium gallicum* (*Inga edulis* C. (Mart.) bosques secundarios); *Burkholderia tropicalis* y *Burkholderia mimosarum* (*Ormosia coccínea* (Aubl.) Jacks, bosque primario). Se registró diferencia

significativa en las cepas IeBS-C1 y IeBS-C2 frente al control empleado, pero ambas tienen la misma capacidad de fijación de nitrógeno con o sin la presencia de los endófitos simbióticos. Se registró diferencia significativa en las cepas IeBI-C1 y IeBI-C2 frente al control empleado, porque ambas tienen mejor capacidad de fijación de nitrógeno con la presencia de los endófitos simbióticos. No se registró diferencia significativa en las cepas DaBS-C1, DaBS-C2, DaBI-C1 y DaBI-C2 frente al control empleado, todas tienen la misma capacidad de fijación de nitrógeno con o sin la presencia de los endófitos simbióticos.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, O. (1996). *Manejo y tecnología de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas de importancia agrícola*. Laboratorio de Microbiología de Suelos. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. X Congreso Nacional Agronómico/ II Congreso de Suelos 89-94. Costa Rica.
- Cuevas, J., Ugarte, A. (2000). *Microorganismos en los suelos* [en línea] Editor: suelooh. España. Disponible en <<http://suelooh.blogspot.es>> [consulta: 04 de abril 2007].
- Díaz, B., Souza, J. (1985). *Aislamiento de bacterias nitrificantes de las especies del género Rhizobium de los nódulos de Glycine max (L) Merrill "Soya" y Pueraria phaselloides Benth "Kudzu tropical"*. Tesis para obtener el título profesional de Biólogo. En la estación experimental "San Roque"-INIA Biblioteca Central de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos-Perú.
- García, M., Farías, R., Sánchez, J. (2003). *Burkholderia, endofita del teocintle (Zea mays ssp mexicana) promotora crecimiento de maíz (Zea mays L)* [en línea] Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Mich., México. Disponible en <<http://www.monografias.com/trabajos33/burkholderia/burkholderia.shtml>> [consulta: 27 de agosto 2007].
- Gómez, G., Franco, A. (1984). Seleção de estirpes de Rhizobium spp. De leguminosas florestais em meio de cultura tolerantes à acidez e à toxidez do Al. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 19, 169-173.
- Gonzales, J., Lluch, C. (1992). Metabolismo nitrogenado en nódulos radicales: asimilación de amonio. *Biología del Nitrógeno. Interacción planta-organismo*. Editorial Rueda Madrid. España, 195-205.
- Hara, F.A., Oliveira, L. A. (2004). Características fisiológicas e ecológicas de aislados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazónica*, 34(2), 343-357.
- Holt, J.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* [en línea] Baltimore. Williams and Wilkins, 787 p. (formas de colonias). Disponible en <[http://www.agro.misiones.gov.ar/biblioteca/Suelos%20Rojos\\_Nutricion.htm](http://www.agro.misiones.gov.ar/biblioteca/Suelos%20Rojos_Nutricion.htm)> [consulta: 27 de agosto 2007].
- Kaliolla, R. (1998). *Amazonía Peruana. Vegetación Húmeda Tropical en el llano subandino*. Proyecto Amazonía. Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales. Turku-Finlandia, Lima-Perú.
- Lloret L. y Romero E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoam. Microbiol.* 2005 [en línea], 47 (1-2): 43-60. Disponible <[http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1\\_2f.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2f.pdf)> [consulta: 28 de agosto 2007].
- Magalhães, F.M, Da Silva, M. (1987). Associações Rhizobium-Leguminosas no estado de Rondônia. *Acta Amazónica*, 17 (supl. 1), 7-17.
- Miana De Faria, S., Franco, A., Menandro, M.S., De Jesús, R.M., Baitello, J.B., De Aguiar, O.T., Döbereiner, J. (1984). Levantamento da Nodulação de Leguminosas Florestais nativas na Região sudeste do Brasil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 19: 143-153.

- Stoyanova, M., Paulina, I., Moncheva P., Bogatzevska, N. (2005). *Biodiversity and Incidence of Burkholderia species* [en línea] Plant Protection Institute, Kostinbrod, Bulgaria, Sofia University, Faculty of Biology, Department of Microbiology. Sofia-Bulgaria. Disponible en <[http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view\\_pdf.php?journal\\_id=1&archive=1&issue\\_id=15&article\\_id=416](http://www.diagnosisp.com/dp/journals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=1&issue_id=15&article_id=416)> [consulta: 14 de octubre 2008].
- Pandey, P., Kang, S., And Maheshwari, M. (2004). *Isolation of endophytic plant growth promoting Burkholderia sp. MSSP from root nodules of Mimosa pudica* [en línea] Department of Botany and Microbiology, Gurukul Kangri University, *Current Science*, 89 (1), 177-180. Disponible en <<http://www.iisc.ernet.in/~currsci/jul102005/177.pdf>> [consulta: 14 de octubre 2008].
- Perticari, A. (2005). *Uso de Biofertilizantes: Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en cultivos de Soja* [en línea] Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Buenos Aires-Argentina. 13 pp. Disponible en <<http://www.inta.gov.ar/imyza/info/doc/inoc/inocular.pdf>> [consulta: 23 de octubre 2008].
- Rigaud & Pupo. (1975). *Efecto de la Salinidad Sobre la Fijación de N y la Asimilación en Vicia faba* [en línea]. Disponible en <<http://www.jxb.oxfordjournal.org/cgi/content/abstract/45/10/1483>> [consulta: 14 de octubre 2008]