

# Estudio de la Relación Simbiótica entre Vigna sinensis y Rhizobium sp.

*Thelma R. de del Castillo* T.M.  
*Paulina P. de Olmedo* T.M.

## RESUMEN

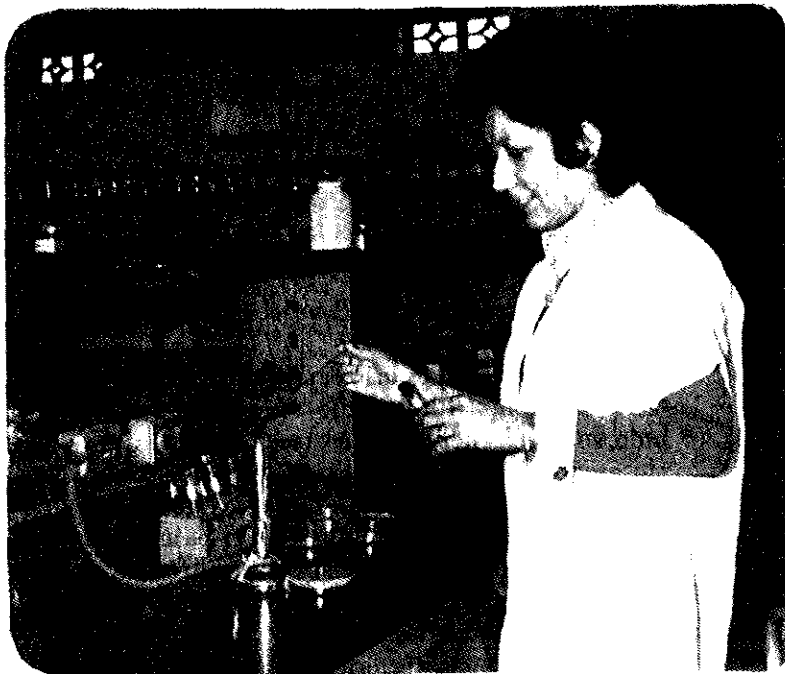
El presente trabajo forma parte del "Programa de Investigación Agrícola para el incremento de la producción de alimentos", de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Parasitología Vegetal. Es un proyecto directamente relacionado con alimentos de origen vegetal, en la actividad de la producción de leguminosas mediante la *Fertilización Biológica*, que busca principalmente bajar el costo de la producción del frijol. El lugar de

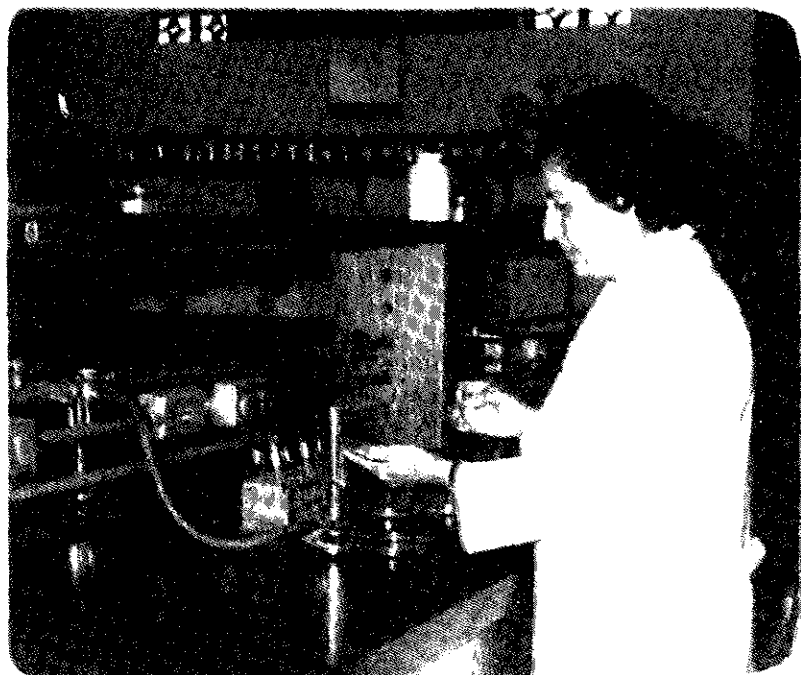
estas investigaciones se ubica en el "Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Hacienda la Providencia", kilómetro 36, de la carretera al puerto de La Libertad. El proyecto iniciado en junio de 1975, tiene programada una duración de dos a cuatro años. Aquí se presentan los antecedentes y resultados de la primera fase de esta investigación.

Ana Paulina Pineda de Olmedo, es Tecnólogo Médico en Laboratorio Clínico, quien junto con Thelma R. de del Castillo, forman el equipo responsable de la investigación en materia de *Fertilización Biológica*. Ha realizado estudios de Embriología Comparada, Bioquímica Avanzada y Cultivo de Tejidos y Células en la Facultad de Medicina, además de servir Instructoría en las especialidades de Biología General y Celular e Histología, así como profesor en Citología, antes de trasladarse a la Facultad de Ciencias Agronómicas como profesor de Microbiología.

Tiene dos trabajos de investigación publicados:

- 1) Determinación de Colágena en útero de Cobayos embarazados; normales y escorbúticos, y 2) Determinación de Hidroxiprolina en hígado de ratas intoxicadas con  $C Cl_4$ .





Thelma Rodríguez de del Castillo es graduada por la Universidad de El Salvador en la especialidad de Tecnólogo Médico-Laboratorio Clínico, Facultad de Medicina. Sirve en la actualidad la cátedra de Microbiología General del Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias Agronómicas. Ha asistido a varios Congresos Internacionales sobre parasitología y microbiología. Tiene inéditos dos trabajos de investigación, el primero dedicado principalmente a Laboratorio Clínico y el segundo sobre infecciones bacterianas en vegetales.

## PRIMERA FASE

### 1.—*Descripción del problema e importancia.*

El frijol es uno de los alimentos básicos de nuestra población. Ultimamente este grano ha aumentado su precio debido al costo elevado y a la notoria escasez de los fertilizantes químicos.

Desde hace algunos años se ha estado introduciendo una nueva leguminosa en el país, *Vigna sinensis*, con la finalidad de sustituir al frijol común, por tener mayor rendimiento y mejor rango de adaptabilidad a distintas zonas ecológicas. Se adapta desde las zonas costeras hasta alturas de 1.000 mts. Además de las cualidades anteriores, posee un alto contenido de proteínas, lo cual lógicamente

mejoraría el balance nutricional del pueblo salvadoreño.

Se cree que con el uso de fertilizantes biológicos de dicha leguminosa, disminuiría el costo de producción del frijol, debido a que la inversión sería más baja y redundaría en un producto más económico para el consumidor. La fertilización biológica se logra mediante la simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium sp.* y las leguminosas (Alexander 1967). Estudios previos han demostrado que del resultado de esta interacción, los aportes de nitrógeno al suelo han sido en cantidades que oscilan entre 55 y 225 kgr./Ha/año (Clark 1970).

**TABLA COMPARATIVA DE LOS VALORES NUTRICIONALES DE LEGUMINOSAS DE GRANOS COMESTIBLES**

**COMPOSICION POR 100 Gm. DE PORCION COMESTIBLE**

	<i>Valor energético (calorías)</i>	<i>Proteínas Gm.</i>	<i>Hidratos de carbono Gm.</i>	<i>Calcio Mg.</i>	<i>Fósforo Mg.</i>	<i>Hierro Mg.</i>
Frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	337	22.0	60.8	86	247	7.6
Frijol de costa ( <i>Vigna sinensis</i> )	341	24.1	60.7	77	420	7.2
Frijol soya ( <i>Glycine max</i> )	398	33.4	35.5	222	730	11.2
Frijol de palo ( <i>Cajanus cajan</i> )	337	19.1	63.3	137	322	5.0

**2.—Antecedentes.**

Para tener cierta metodología preliminar se comenzaron a realizar actividades para comprobar si las técnicas a poner en uso eran operativas o no en nuestras condiciones, y adaptarlas o modificarlas de acuerdo a su funcionamiento.

El presente trabajo se inició en el Laboratorio de Parasitología Vegetal, en julio de 1975, para lo cual se sembró *Vigna sinensis*, var. Centa 105 en el propagador de la Facultad.

La siembra se realizó en 6 macetas, colocando 5 semillas por maceta.

Al suelo empleado no se le aplicó esterilizantes ni fumigantes.

Se obtuvo una germinación del 100%, se extrajeron plántulas a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días después de sembradas.

Se correlacionó la fenología de la planta con la formación de nódulos lo cual se detalla en el cuadro siguiente:

**RELACION ENTRE EL PERIODO DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y EL PROCESO DE FORMACION DE NODULOS:**

**CUADRO Nº 1**

<i>Edad de la planta en días</i>	<i>Nº Promedio de nódulos/planta</i>
15	3
30	24
45	63
60	51
75	41
90	10*

\* 10 en proceso de degeneración.

Posteriormente se procedió a escoger nódulos que presentaban un tamaño de 3-4 mm. de diámetro y de forma alargada que se encontraban distribuidos en el área de la raíz principal, en cuyo interior presentaban un color rojizo.

Esto se efectuó de acuerdo a la revisión de literatura en la cual se encontró que los nódulos seleccionados de acuerdo a esos criterios son los más efectivos en este proceso de simbiosis (Sánchez Marroquín 1964).

Luego, los nódulos fueron desinfectados, macerados y con el material extraído se procedió a preparar frotis y a sembrar en medios de cultivos.

Los frotis fueron coloreados con carbol-fucsina 1:10. Al observar dichas preparaciones se encontraron bacilos con formas en "X" y "Y", conocidas

con el nombre de bacteroides (Sánchez Marroquín 1964).

Las siembras se realizaron en medio de cultivo de Wright. Este se preparó siguiendo la técnica descrita por Girard y Rougieux, excepto que para fines prácticos se modificó la preparación de uno de los componentes (agua de levadura) para la cual se utilizó la técnica descrita en Sánchez Marroquín.

Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (28-29°C) y se observaron cada 24 horas. Del crecimiento bacteriano obtenido en las placas de Petri se hizo una selección de tres colonias que presentaban las características típicas de *Rhizobium*. (Sánchez Marroquín 1964). Estas se detallan en los cuadros 2 y 3.

CUADRO Nº 2

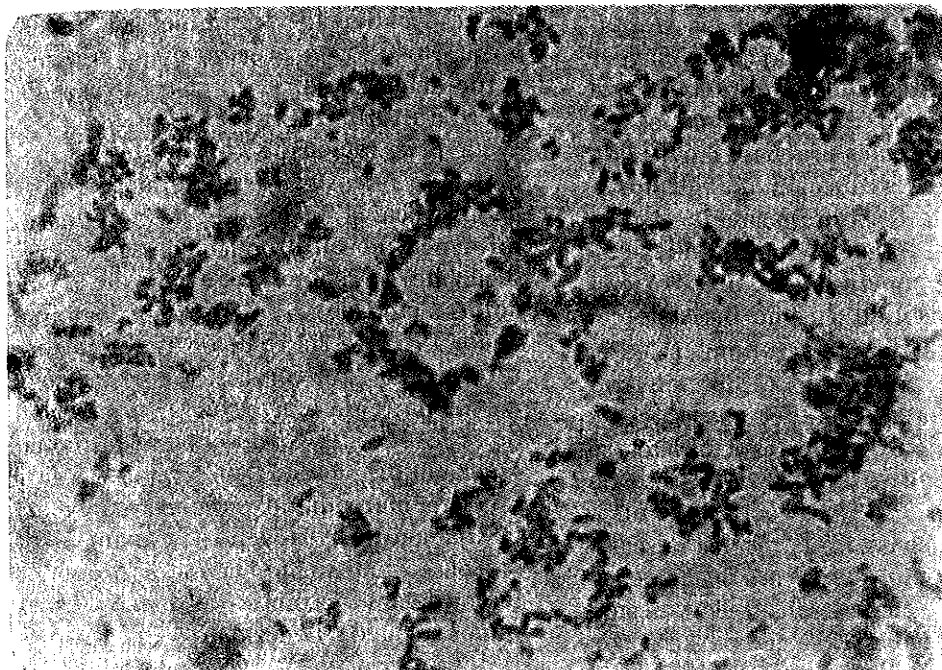
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS MACRO Y MICROSCOPICAS DE "Rhizobium"

<i>Nº de Colonia</i>	<i>Pigmentación y consistencia de las colonias</i>	<i>Forma</i>	<i>Tamaño (micras)</i>	<i>Otras observaciones</i>
1	Semitransparentes	Bacilo	1 x 5	Pared celular gruesa
2	Blanca viscosa	Bacilo	1 x 5	Pared celular fina
3	Blanca gomosa	Bacilo	1 x 3	Formas irregulares (Bacteroides)

CUADRO Nº 3

RESPUESTA A LA COLORACION DE GRAM. DE DIFERENTES COLONIAS DE "Rhizobium"

<i>Nº de Colonia</i>	<i>Forma: de la Bacteria</i>	<i>Coloración de Gram.</i>
1	Bacilo	Negativo
2	Bacilo	Negativo
3	Bacilo	Negativo



*Rhizobium sp* de nódulos de *vigna sinensis*.  
 Aumento: 1000 x  
 Coloración: carbol fucsina.

CUADRO Nº 4

RESPUESTA DE LAS BACTERIAS A DIFERENTES REACCIONES BIOQUIMICAS

Tipo de Prueba	Según Breed	RESULTADOS OBTENIDOS:		
		Col semitransparente	Col blanca viscosa	Col blanca gomosa
Movilidad	—*	—	+	—
Gelatina	—	—	—	—
Nitritos	—	—	—	—
Leche tornasolada	—	—	—	—

\*: (—): negativo  
 (+): positivo

Además de las técnicas de laboratorio anteriormente expuestas, también se corrieron las respectivas pruebas bioquímicas, con el objeto de obtener más certeza en estos resultados preliminares. El comportamiento enzimático de *Rhizobium*, se estudió a través de las siguientes pruebas: movilidad, licuación de la gelatina, reducción de nitratos a nitritos y reacción de la leche tornasolada (Breed 1957). Estas se efectuaron haciendo uso de los respectivos medios. El de movilidad se preparó empleando un medio semisólido y como indicador el 2, 3, 5, cloruro de trifeniltetrazolium (Godoy 1972); el de gelatina a base de caldo nutritivo más un 15% de gelatina (Fálico de Alcaraz 1973); para la reducción de nitratos a nitritos se empleó un medio de cultivo a base de nitrato de potasio (Bailey y Scott 1966); y para la prueba de la leche tornasolada se siguió la técnica descrita en Bailey y Scott, excepto que se usó leche semidescremada en vez de leche completamente desnatada. Los resultados, Cuadro 4, se compararon con los datos reportados en la literatura (Breed 1957).

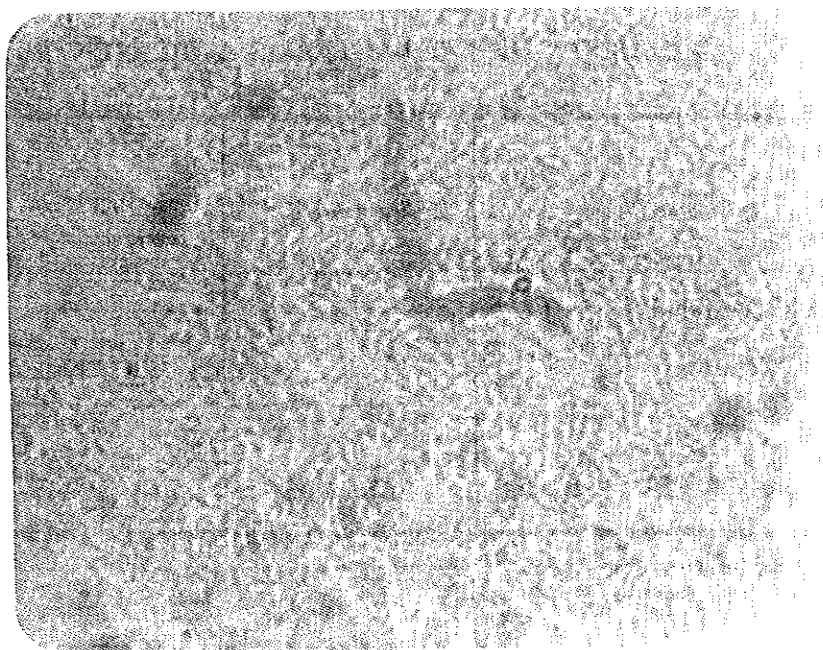
### 3.—Revisión de Literatura.

El único proceso biológico de fijación o utilización directa del nitrógeno atmosférico que existe en la naturaleza, es el realizado por ciertas bacterias que se hayan unas veces libres en el suelo y

otras en simbiosis con las raíces de algunas plantas, especialmente leguminosas (Sánchez Mariño-Quín 1964). Este proceso es un fenómeno natural y fue demostrado desde el siglo pasado (Hellriegel y Wilfarth 1888).

La penetración de *Rhizobium sp.* en las raíces de *Vigna sinensis*, durante el desarrollo de la planta, provoca la formación de nódulos debido a la influencia de un producto de la bacteria presumiblemente ácido indol acético, que da lugar a una deformación de la raíz de esta leguminosa (Alexander 1967). Esta relación simbiótica es bien generalizada en los trópicos. En estas condiciones la mayor parte de leguminosas forman nódulos cuando se les inocula *Rhizobium* de la llamada "Miscelánea caupí", aunque su respuesta a la inoculación muestra marcadas diferencias en la efectividad a la fijación de Nitrógeno (Graham 1974).

Consecuentemente, la mera presencia de nódulos no es una garantía de que la cosecha de leguminosas pueda beneficiarse del nitrógeno gaseoso (Alexander 1967). Sin embargo, especies como *Vigna nodulans* libremente estableciendo por lo general simbiosis eficaces aun con la microflora nativa del suelo (Norris 1972). Para una buena simbiosis se necesita una gran población de *Rhizobium*, además, una cepa que permita la fijación de nitrógeno en suficiente proporción para suplir adecuadamente las demandas del huésped y ser totalmente efectivo (Alexander 1967). Este fenómeno



*Rhizobium sp.* (de cultivo en medio de Wight)  
 Procedencia: nódulos de *vigna sinensis*  
 Aumento: 1000 x  
 Coloración: Gram

es dependiente de factores ambientales, los cuales influyen en la cantidad de nódulos que forme la leguminosa. Así, son necesarias temperaturas adecuadas, buena intensidad lumínica, días largos y altos niveles de CO<sub>2</sub>, que incrementan los carbohidratos en la planta, y esto trae como consecuencia, un aumento en el número de nódulos (Alexander 1967). También algunos de los minerales del suelo, pueden afectar positiva o negativamente la fijación del nitrógeno. Deficiencias de fósforo y azufre son factores limitantes para que esta fijación se realice. Esto es debido a un efecto directo que estos elementos tienen sobre la planta hospedera (Morley 1961). Se ha observado que ninguna leguminosa presenta deficiencia de molibdeno excepto en el proceso de fijación simbiótica. Plantas con deficiencia de molibdeno desarrollan nódulos de color gris, en contraste con los normales, que presentan un color rosado (Anderson 1956).

Los *Rhizobium* del grupo caupí, se encuentran ampliamente difundidos en los suelos, pero debido a la extrema acidez de éstos, muy pocos pueden formar nódulos. En éstos casos la inoculación es esencial para una adecuada nodulación. Además, ésta disminuirá la eficiencia de la simbiosis natural, ya que *Rhizobium* nativo compite con la cepa inoculante.

Para que la inoculación sea eficaz, se debe eliminar el *Rhizobium* inefectivo y otros microorganismos antagónicos o competitivos. Esto se logra, mediante procesos de fumigación o esterilización de suelos, en los cuales se desea que este fenómeno de simbiosis se efectúe (Morley 1961).

#### —Hipótesis

El presente trabajo busca resolver la siguiente interrogante:

¿Será posible que la interacción *Vigna sinensis* y *Rhizobium* sp. pueda disminuir la utilización de la fertilización química nitrogenada?

#### —Objetivos

Para cumplir con los objetivos el trabajo se dividirá en tres etapas:

- a) Aislar las cepas de *Rhizobium* que se encuentren en simbiosis con *Vigna sinensis*.
- b) Determinar la efectividad en la formación de nódulos y su probable ayuda en la fertilización química.

c) Reproducir la o las cepas de *Rhizobium* que se encuentran más efectivas.

Dichos objetivos se continuarán de acuerdo a los resultados de cada etapa de trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—Alexander, Martin. 1967. Introduction To Soil Microbiology. 4<sup>a</sup> Ed. Edit. New York. pp. 326-350.
- 2.—Anderson, A. J. 1956. Molybdenum as a fertilizer. J. Adv. Agr. 8: 163-202.
- 3.—Bailey, W. R. and E. G. Scott. 1966. Diagnostic Microbiology. Third Ed. The C. V. Mosby Co. Saint Luis. pp. 431-500.
- 4.—Breed, R.A. et. al. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Seventh Ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. pp. 285-288.
- 5.—Clark, F. E., and E.A. Paul 1970. The Microflora of Grassland. Adv. Agronomy. 22: 375-435.
- 6.—Fálico de Alcaraz, L. M. 1973. La Mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria* Doige-Dowson) del tomate y del pimiento en la prov. de Corrientes IDIA. 305: 38-44.
- 7.—Girard, H., y R. Rougieux. 1964. Técnicas de Microbiología Agrícola. Edi. Acribia. España. pp. 176.
- 8.—Godoy, Gerardo. 1972. Manual de Microbiología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de El Salvador. pp. 16-157-178.
- 9.—Graham. P. H., y D. Hubbell. 1974. Interacción del Suelo, la planta y el *Rhizobium* en la Agricultura Tropical. Seminario sobre manejo de suelos y el proceso de desarrollo en América Tropical.
- 10.—Morley, F.H.W. 1961. Subterranean Clover. Advan. Agron. 13: 57-123.
- 11.—Sánchez Marroquín, A. 1964. Microbiología Agrícola. Serie de apuntes N<sup>o</sup> 3. Chapingo. México.