

CONTRIBUCION A LA INOCULACION BACTERIANA DE SEMILLAS DE SOYA

Por **Alvaro Posada Borrero***

INTRODUCCION

Los trabajos científicos y prácticos sobre inoculación de las semillas de las leguminosas alcanzan hoy en día a varios millares y el tema en cuestión continúa sin perder actualidad.

Las investigaciones acerca de la simbiosis entre las leguminosas y los *Rhizobium* aún revelan muchos secretos y todos los resultados que se publican contribuyen a que sea mayor el interés científico y práctico de la cuestión porque ellos dan explicación a los muchos factores que regulan un fenómeno tan complejo como es la infección, por una bacteria, de una planta superior con la consiguiente fijación del nitrógeno atmosférico.

La inoculación bacteriana de las semillas de las leguminosas con las diferentes razas de *Rhizobium*, según la especificidad de la planta huésped, ha llegado a ser, con justificado motivo, una práctica muy usual en todos los países y la inmensa cantidad de productos comerciales muestran que de año en año crece el consumo de los diferentes nitrocultivos pues ha sido plenamente comprobado el aumento en el rendimiento de las cosechas con esta práctica.

En Colombia también se ha introducido el uso del *Rhizobium* como nitro fijador del complejo simbiótico y especialmente con el incremento que ha alcanzado el cultivo de la soya en los últimos años, ha aumentado el empleo de *Rhizobium* para esta planta y muchos cultivadores aprecian hoy el valor de la inoculación bacteriana principalmente al sembrar por primera vez en suelos nuevos en los cuales no ha crecido anteriormente esta leguminosa.

Una vez que se ha sembrado soya inoculada y se han formado los conocidos nódulos, el suelo está infectado con estas bacterias radicícolas y la próxima siembra ya cuenta con la existencia de estos organismos con poder infectivo para efectuar su trabajo beneficioso.

Pero es muy necesario vigilar el comportamiento de estas bacterias para poder aprovecharlas eficazmente; los factores internos y externos, especialmente factores ambientales, climatológicos, como la ilu-

* Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

minación, la temperatura, la humedad, la presencia de bacteriófagos, etc. actúan constantemente sobre estas bacterias y especialmente sobre sus poderes infectivos, tornando las razas de eficientes a ineficaces.

Todo el conjunto de los diferentes factores, especialmente bajo condiciones tropicales, parecen actuar más desfavorablemente sobre la nitrificación atmosférica que en otras regiones del mundo.

Se ha observado en ensayos de invernadero con sus oscilaciones inmensas de temperatura que van desde 18 a 50c Celsius y 50 a 99% de humedad y en cultivos de campo a condiciones del ambiente, que se presentan muchas veces alteraciones en los síntomas normales del poder infectivo de las bacterias indígenas del suelo en la formación de nódulos en las raíces y en el rendimiento de las cosechas. Se han presentado efectos típicamente hambrientos de Nitrógeno a pesar de encontrarse este elemento en cantidad suficiente en el suelo y se ha observado una formación de nódulos de una manera extraña y no comunmente conocida.

Los factores que transforman una raza eficiente de *Rhizobium* en una ineficaz, han sido objeto de muchos estudios durante los últimos años.

A continuación se exponen algunas de las principales teorías que tratan de darle una explicación a este fenómeno:

a — Bacteriófagos

La presencia de bacteriófagos en el suelo ha sido conocida desde hace mucho tiempo. Estos bacteriófagos son ultra-microbios muy parecidos a los virus que son letales para una o varias cepas de bacterias y producen necrosis o muerte de las mismas.

Demolen y Dunez (6, 1938-1940), Vandecavaye y Katznelson (6, 1936), Laird (6, 1932), Krasilnikow (6, 1942) Marcilla, Aguirre y Xandri (6, 1950) y otros pudieron demostrar que ciertos bacteriófagos disminuyen en alto grado la virulencia del *Rhizobium* y con eso el poder infectivo y naturalmente el rendimiento de las cosechas. Datta (4, 1944) encontró correlación entre la presencia de bacteriófagos y el cultivo prolongado de las plantas notando que estos aumentaban con la edad de los nódulos y la aplicación de enmendantes al suelo.

b — Sustancias inhibidoras

Casas (3, 1947), investigó la presencia de sustancias inhibidoras en el suelo, producidas muchas veces por las mismas bacterias, como factor lisante del poder infectivo del *Rhizobium*. Shvetsova (12, 1944) observó la acumulación de agentes líticos alrededor de las raíces de las leguminosas que inhiben la actividad de las bacterias formadoras de

nódulos. **Nutman** (10,1945) en cultivos de trébol hechos en agar, encontró que las raíces producen una secreción que inhibe la formación de nódulos.

c — Substancias antibióticas

Trusell y Sarles (13, 1943) informan que algunas substancias antibióticas antimicrobianas (actinomicina, gramicidina, tirotricina) producidas por la microflora del suelo ejercen una influencia o acción inhibidora sobre los *Rhizobium*. **Fred, Baldwin y Mc Coy** (6, 1932), **Krasilnikow y Koreniako** (7, 1944) mencionan la misma microflora, hoy conocida como productora de substancias antibióticas y en parte también inhibidoras, como factor que inhibe la actividad del *Rhizobium*.

d — Substancias activadoras

Naundorf y Nilson (6, 1940-41) determinaron que la falta de ciertas substancias activas, como ciertas vitaminas y fitohormonas, impide la transformación de las bacterias en bacteriodes, transformación necesaria para la fijación del nitrógeno atmosférico.

e — Substancias nutritivas

Mc Calla (6, 1940-41), **Wilson** (6, 1947) etc., han demostrado la influencia desfavorable de ciertas sales minerales y especialmente de la acumulación de estas en el suelo.

La falta de substancias nutritivas y de elementos menores, p. e. Molibdeno, es para **Poschenrieder, Samnet y Fischer** (11, 1940) la causa de una simbiosis perturbada. **Wilson** (6, 1940) probó en medio de laboratorio y en el campo que la presencia de abundantes nitratos inhibe la formación de pelos radicales que es siempre premonitoria de la iniciación de la infección.

f — Factores ambientales

Según **Marcilla, Aguirre y Xandri** (6, 1950) los factores climáticos son los que influyen en mayor grado. **Davis** (5, 1944) en ensayos efectuados en alfalfa concluyó que la ausencia de nódulos en plantas provenientes de semillas inoculadas con cultivos comerciales se debió a una prolongada sequía después de la siembra que impidió el establecimiento de las bacterias.

g — Teoría de la hemoproteína

En las cepas efectivas existe un pigmento rojo, especie de hemoproteína o hemoglobina, esencialmente ligado a la fijación de nitrógeno y necesario para que se efectúe este fenómeno. Este pigmento

funciona almacenando oxígeno y cuando el nódulo está llegando a su fin, cambia el color de rojo a verde.

Virtanen (15, 1945) formuló la hipótesis de que la causa de la inhabilidad de una cepa infectiva para fijar nitrógeno en los nódulos de la raíz se debía principalmente a un ligero tejido que rodeaba la bacteria; éste previene el suministro de oxígeno y al mismo tiempo la formación de hemoglobina es inhibida.

n — Inmunidad de la planta

Virtanen y Linkola (14, 1947) observaron que cuando se aplicaba una cepa efectiva después de que se habían formado los primeros nódulos a causa de una cepa inefectiva, no se producía formación de nódulos. Los citados autores concluyeron que probablemente se producía una inmunidad en la planta que impedía la infección por parte de la cepa efectiva.

1 — Influencia de insecticidas, herbicidas, desinfectantes y otras sustancias químicas

Appleman y Sears (1, 1946) observaron que el DDT a ciertas concentraciones afecta a las bacterias formadoras de nódulos.

Carlyle y Thorpe (2, 1947) en ensayos con frijol, guisantes, trébol rojo y alfalfa comprobaron que sales de 2,4-D presentes en la solución del suelo, en la proporción de 0,5 p.p.m., restringen seriamente la germinación, limitan el crecimiento y prácticamente inhiben la formación de nódulos en estas leguminosas.

Este complejo de los diferentes factores que intervienen sobre el comportamiento de las bacterias en el suelo, hace imposible fijar con exactitud la verdadera causa, para cada caso especial, de la pérdida parcial o total del poder infectivo del *Rhizobium* o las alteraciones desfavorables en la formación normal de nódulos y la disminución en los rendimientos.

En este trabajo, el autor se interesa en demostrar, en primer lugar, efectos y fenómenos raros y anormales en la formación de los nódulos y combinado con este fenómeno, la disminución de los rendimientos de las cosechas.

También se interesa el autor en demostrar el valor de la inoculación en general y de la reinoculación en suelos ya infectados para evitar disminución en los rendimientos económicos sin fijarse en el momento en las diferentes causas de estos fenómenos que tienen que ser objeto de un posterior estudio cuando se conozcan más datos sobre el problema en cuestión.

MATERIALES Y METODOS

La semilla empleada en todos los ensayos fue de la variedad Missoy cuyo cultivo es el que más se ha generalizado en la región debido a su alta producción, riqueza en grasa y resistencia al medio.

En todos los casos se usó semilla recién cosechada para asegurar un satisfactorio porcentaje de germinación y siempre se desinfectó con alcohol etílico al 70%.

Como fuentes de inoculación se emplearon tres clases de cepas de *Rhizobium* Soya:

- 1— Cepa recién aislada, muy virulenta, según exámen previo en el laboratorio y que en el trabajo se llama "cepa nueva".
- 2— Cepa tomada de un Lote de la Estación Agrícola en el que ya se había sembrado una cosecha de soya.
- 3— Cepa tomada de un suelo en el cual se habían cultivado dos cosechas sucesivas de soya, en condiciones de invernadero y con la que se habían observado efectos anormales en la raíz.

Para hacer la inoculación de las semillas se usaron las tres cepas en forma de polvo, método este indicado por Kurnik (8, 1950) como el mejor, aplicándose éste sobre los surcos en el momento de hacer la siembra.

Los ensayos se desarrollaron en los siguientes medios:

- 1— Propagadores viejos de cacao en cultivo de arena lavada.
- 2— En el invernadero con tierra.
- 3— En el campo, Lote No. 33 de la Estación Agrícola.

En ninguno de estos medios se había sembrado soya anteriormente con lo que se aseguraba la ausencia de los *Rhizobium*. Además de esta condición, se tomaron varias precauciones tendientes a evitar la mezcla de las distintas cepas en los varios tratamientos.

Las manos del operador se desinfectaron constantemente durante la siembra con alcohol al 70%; en la balsa del invernadero se dejaron espacios vacíos de 0,20 mts. entre en un tratamiento y otro los que se desinfectaron con bicloruro de mercurio con el objeto de evitar el movimiento de las bacterias a través del suelo. En el campo se eliminaron las plántulas que estaban a 0,20 mts. de cada lado de las parcelas para descartar la posibilidad de que en los resultados intervinieran cepas de otros tratamientos.

En el ensayo en arena se hicieron dos replicaciones de cada tratamiento, sembrándose cuatro granos por sitio en dos surcos, a distancias de 0,35 mts. entre surcos y 0,30 mts. entre plantas.

A las cinco semanas se tomaron muestras para observar formación de nódulos y determinar proteínas.

La balsa escogida en el invernadero se dividió en cuatro secciones para hacer un tratamiento en cada una de ellas; se sembraron tres semillas por sitio, a 0,30 mts. en cuadro.

Al mes de hechas las siembras, se tomaron muestras para observar la formación de nódulos y hacer análisis de proteínas.

Los ensayos en el campo se distribuyeron en bloques al azar, en parcelas de 25 metros cuadrados, con seis replicaciones para cada tratamiento. Las distancias de siembra fueron de 0,60 mts. entre surcos y 0,10 mts. entre plantas dejándose en cada parcela un borde libre de 0,10 mts.; la siembra se hizo a mano a la distancia ya dicha. A los 42 días se tomaron muestras para hacer observaciones sobre nodulación y para determinar proteínas.

En todos los casos, las proteínas se determinaron por el clásico método de Kjeldahl.

Los análisis estadísticos se hicieron por el método de variancia y por medio de la prueba de "t".

ENSAYOS EN ARENA

Los primeros ensayos se efectuaron en cultivos de arena, empleando los viejos propagadores de cacao.

Para los diferentes experimentos de inoculación se emplearon las tres cepas distintas de *Rhizobium* enumeradas ya en el capítulo anterior.

La siembra se hizo el 28 de Abril y las semillas se regaron con solución nutritiva de Knop en la que faltaba el compuesto nitrogenado.

La germinación de las semillas fue normal y en los primeros días de desarrollo el crecimiento de las plántulas no inoculadas fue mejor fenómeno éste que se encuentra frecuentemente después de hacer una inoculación. Después de cinco semanas, al final del mes de Mayo, las plantas inoculadas presentaban mejor aspecto que las testigo.

Las fotografías Nos. 1 y 2 nos muestran una comparación entre plantas testigo y plantas inoculadas con una cepa nueva de *Rhizobium*.

A las seis semanas de desarrollo (10 de Junio), se hizo la primera observación sobre formación de nódulos y también un contaje de estos elaborándose con estos datos la Tabla No. 1.



Fig. 1.— Influencia de la Inoculación en el desarrollo de la Soya. Izquierda: Plantas testigo. Derecha: Plantas Inoculadas con cepa nueva de Rhizobium Soya.— (Foto Rengifo).

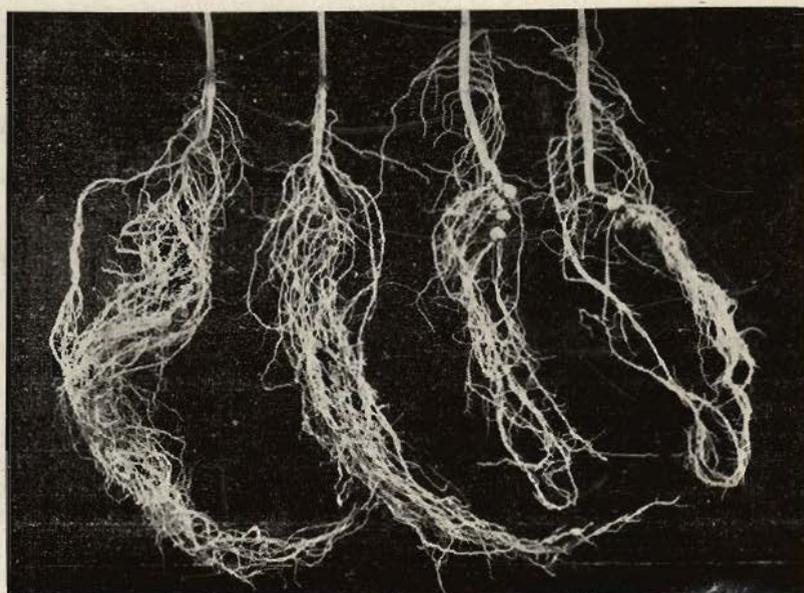


Fig 2.— Formación de Nódulos en las raíces de Soya. Izquierda: Plantas Testigo. Derecha: Plantas Inoculadas.— (Foto Rengifo).

TABLA No. 1

FORMACION DE NODULOS EN SOYA EN CULTIVO DE ARENA

Tratamiento	Número de Nódulos ^o	Observaciones
Testigo	0	Crecimiento moderado
Cepa nueva	25,1	Crecimiento mejor
Cepa de 1 cosecha	10,0	Crecimiento algo mejor que el control
Cepa de 2 cosechas	6,5	Crecimiento casi como el testigo pero más retardado. Crecimiento de raíz anormal.

^oPromedio por planta

De la Tabla No. 1 se deduce que las plantas provenientes de semillas no inoculadas no formaron nódulos en la raíz; la soya inoculada con la cepa nueva dió el número mayor de nódulos y la nodulación en las plantas inoculadas con las cepas de una y dos cosechas fue bastante baja y ya se observaron los fenómenos anormales en la raíz, que pueden apreciarse en la fotografía No. 3.

Este fenómeno coincide, como puede verse en la fotografía, con la formación aumentada de raíces laterales, raíces laterales hinchadas y raíces que tienen casi el aspecto de un nódulo.

Esta observación se hizo especialmente y en mayor número en las raíces de las plantas provenientes de semillas que habían sido inoculadas con cepa de *Rhizobium* que tenía su origen en un campo en el cual se habían cultivado dos cosechas sucesivas de soya. En este caso la formación de nódulos en la raíz fue muy escasa.

Este fenómeno solamente se explica con el siguiente hecho: las bacterias contenidas en el material de inoculación proveniente del campo ya mencionado, penetran en la raíz sin efectuar la formación normal de nódulos porque ya han perdido su efectividad y desarrollan un parasitismo sin dar al huésped el nitrógeno que éste necesita.

La formación aumentada de las raíces laterales es ocasionada por los productos de metabolismo de estas bacterias entre los cuales encontramos, entre otros, la heteroauxina (**Link, 9. 1937**), conocida como substancia de crecimiento que favorece la formación de raíces laterales y causa hinchamiento en las raíces jóvenes y germinativas.

Estos resultados encontrados explican en parte también el hecho de que en campos en donde se ha cultivado varias veces la soya, disminuye constantemente la producción.

Del mismo ensayo se tomaron muestras para determinar el contenido proteico y de estas determinaciones se obtuvieron los siguientes valores con los que se elaboró la Tabla No. 2.

TABLA No. 2

CONTENIDO EN MATERIA SECA Y PROTEINAS DE PLANTAS DE SOYA SEGUN INOCULACION.

(Plantas de ocho semanas)

Tratamiento	Materia seca		Proteina
	Grs.	% de la materia seca.	
Testigo	21,1	16,3	
Cepa nueva	24,9	27,5	
Cepa de 1 cosecha	25,9	20,4	
Cepa de 2 cosechas	21,0	17,0	



Fig. 3.— Influencia de las cepas viejas de Rhizobium en la formación de nódulos.

Derecha: Nódulos normales.

Izquierda: Nódulos anormales y formación abundante de raíces laterales hinchadas, anormales.

Según esta Tabla encontramos un aumento bastante elevado de la materia seca y de las substancias proteínicas en las hojas de la soya inoculada con la cepa nueva de *Rhizobium* y con la cepa proveniente del campo en donde se había sembrado soya por una vez.

El ensayo nos demuestra claramente el alto valor de la inoculación de la soya, del empleo de cepas nuevas recién aisladas y comprobadas y demuestra además que la fijación del nitrógeno atmosférico disminuye empleando cepas que han permanecido ya varios meses y especialmente más de un año en un suelo cultivado con soya.

El 26 de agosto se cosecharon las plantas sembradas en los propagadores y se obtuvieron los siguientes valores que se presentan en la Tabla No. 3.

TABLA No. 3

INFLUENCIA DE LA DIFERENTE INOCULACION CON RHIZOBIUM
SOYA SOBRE LA PRODUCCION DE GRANOS

(Cultivo en arena)^o

Tratamiento	Grs./planta Peso	Contenido grasa %	Contenido proteínas %
Testigo	4,7 + - 0,5	15,8	21,0
Cepa nueva	32,4 + - 0,9	20,6	31,2
Cepa de 1 cosecha	30,7 + - 1,2	20,7	27,3
Cepa de 2 cosechas	9,3 + - 0,6	17,9	23,5

^oLas cifras indican la cantidad de granos en gramos por planta sobre un promedio de 72 plantas.

El resultado final de este ensayo en arena, según se ve en la Tabla No. 3, indica experimentalmente la necesidad de una inoculación.

Es natural que las diferencias entre testigos y plantas inoculadas en cualquier suelo o campo de cultivo no se presentan conspicuas como en el caso del cultivo en arena.

La cosecha obtenida nos muestra además que para la inoculación es necesario emplear bacterias virulentas. La cepa originaria del campo de una cosecha casi alcanza los valores de la soya inoculada con bacterias virulentas, excepto en la cantidad de proteínas que siempre disminuyó en un 12%; esto quiere decir que la fijación del nitrógeno atmosférico fue menor.

Los valores muy bajos que muestra la soya inoculada con la cepa originaria del campo de dos cosechas, son casi similares a los que da el testigo.

ENSAYOS EN EL INVERNADERO

Los ensayos en el Invernadero se hicieron en dos series para hacer una apreciación más exacta de los resultados.

El análisis químico del suelo en donde se desarrollaron estos ensayos dió los siguientes valores:

N	Total	0,136%
P	total	0,050%
	soluble	112,5 Kgs.
K		312,5 "
Ca		4500,0 "
pH		6,0

El procedimiento empleado para realizar este ensayo fue el mismo usado en el pasado y descrito en capítulos anteriores.

Con los resultados obtenidos en este ensayo se elaboró la Tabla No. 4.

TABLA No. 4

INFLUENCIA DE DIFERENTES INOCULACIONES SOBRE FORMACION DE NODULOS, CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE SOYA

(Promedio de 50 plantas)

Tratamiento	Número de nódulos por planta	Peso seco por planta	% aumento o disminución.	% proteínas sobre materia seca.	Observaciones
Testigo	32	14,3	0	28,3	Nódulos grandes y pequeños.
Cepa nueva	35	17,2	+ 20,2	33,0	Nódulos pequeños.
Cepa de 1 cosecha	31	15,1	+ 5,5	30,9	Nódulos grandes.
Cepa de 2 cosechas	8	10,1	- 41,5	23,4	Pocos nódulos y deformación en las raíces. Formación de raíces laterales.

Los valores de esta Tabla no son inmediatamente comparables con los resultados del ensayo en arena. Se tuvo mucho cuidado al efectuar la siembra y el personal fue muy bien instruido y vigilado pero desde luego en los resultados se presentó una infección con *Rhizobium*.

El suelo nunca había sido cultivado con soya pero posiblemente con el riego se trasladaron bacterias de un campo a otro no obstante la cuidadosa separación que existía entre ellos. También ha podido ser posible que durante las desyerbas, las manos del operador hubieran trasladado las bacterias de un sitio a otro.

Siempre la cepa recién aislada y virulenta (efectiva) dió la mejor cosecha. Las plantas se cosecharon diez semanas después de la siembra en un estado en el cual se encontraban todavía verdes pero ya habían terminado la floración y tenían vainas bien desarrolladas.

No hubo así diferencia entre testigos y plantas inoculadas con bacterias del campo de una cosecha pero de nuevo se observó la gran diferencia entre testigos y plantas inoculadas con la cepa de dos cosechas, determinándose una disminución de un 41,5% en la producción y al hacer la comparación con la inoculación con cepa virulenta se tiene una disminución de más o menos 70%.

No solamente la inoculación con cepa de dos cosechas tuvo efecto en la disminución de los rendimientos sino también que empeoró la calidad de la soya con respecto a su contenido en albúminas.

Al observar las raíces de plantas jóvenes inoculadas con cepa de dos cosechas, el autor encontró el mismo fenómeno ya descrito en los ensayos en arena: formación aumentada de raíces laterales, raíces laterales hinchadas con aspecto de nódulos y nódulos deformes.

Una vez cosechado este ensayo, se sembró soya de nuevo en la misma balsa y sobre el mismo suelo (últimos días de Junio) y se cosechó al final de septiembre; con los resultados se elaboró la Tabla N. 5.

En esta ocasión no se hizo inoculación de las semillas pero sí se tuvo la precaución de desinfectarlas previamente con alcohol del 70%.

TABLA No. 5

INFLUENCIA DE LAS DIVERSAS INOCULACIONES SOBRE EL DESARROLLO DE LA SOYA

Tratamiento	Granos por planta Gramos	Aumento o disminución %
Testigo	85,2	0
Cepa nueva	90,1	+ 5,7
Cepa de 1 cosecha	70,4	- 17,4
Cepa de 2 cosechas	51,0	- 40,2

Al observar esta Tabla se nota una disminución de la cosecha en el suelo en donde ya se había hecho el cultivo. El poco aumento que se obtuvo en el suelo que contenía la cepa recién aislada y virulenta se encuentra dentro del límite de error y ya en la segunda cosecha se nota la pérdida de virulencia de la cepa nueva, no muy grande pero siempre marcada.

Se realizó un tercer ensayo en el invernadero inoculando las semillas, previamente desinfectadas, con una cepa de tercera cosecha tomada de la balsa del primer ensayo y con una mezcla de cepa de tercera cosecha y cepa nueva.

La germinación y el desarrollo de los primeros días fue completamente normal pero a las tres semanas se observó un mejor comportamiento en las plantas que habían sido inoculadas con la mezcla de las cepas mencionadas de Rhizobium. Esto demuestra el alto valor de la reinoculación.

No se esperó el resultado de la cosecha de este ensayo pero las fotografías Nos. 4 y 5 muestran claramente la gran diferencia entre las dos inoculaciones.

ENSAYO EN EL CAMPO

Además de los experimentos en arena y en el invernadero, se hizo un ensayo en condiciones de campo (Lote No. 33 de la Estación Agrícola), con seis replicaciones en parcelas de 25 mts.² distribuidas según el plano que figura a continuación:

- 1— Testigo.
- 2— Soya inoculada con Rhizobium recién aislado y virulento.
- 3— Soya inoculada con cepa de Rhizobium de dos cosechas.
- 4— Soya inocula con cepa de una cosecha en el campo.

1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2

Distribución de las parcelas en el campo.

La siembra se hizo el 24 de abril en un lote de terreno en donde nunca se había sembrado soya.

Todas las semillas se desinfectaron antes de la siembra con alcohol de 70% y después se inocularon con las diferentes cepas de Rhizobium.

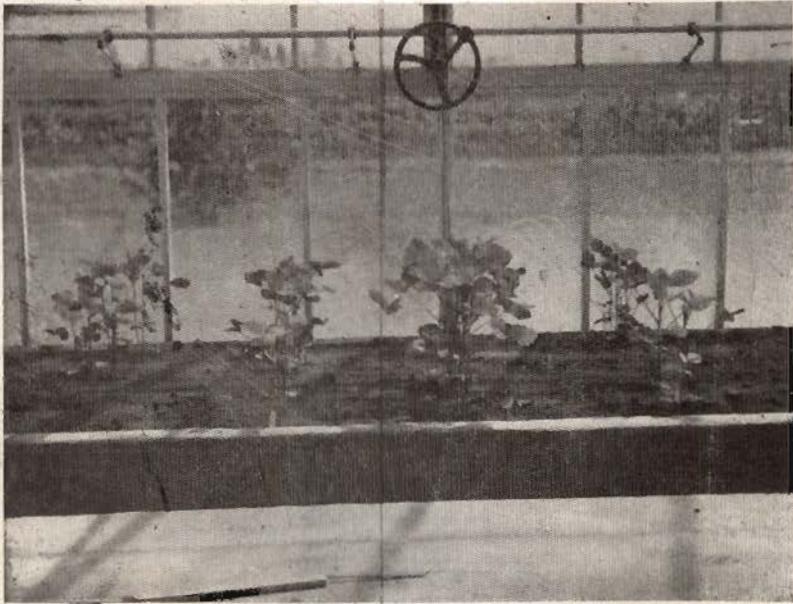


Fig. 4.— Soya inculada con una cepa de *Rhizobium* de tercera cosecha. — Foto Rengifo.

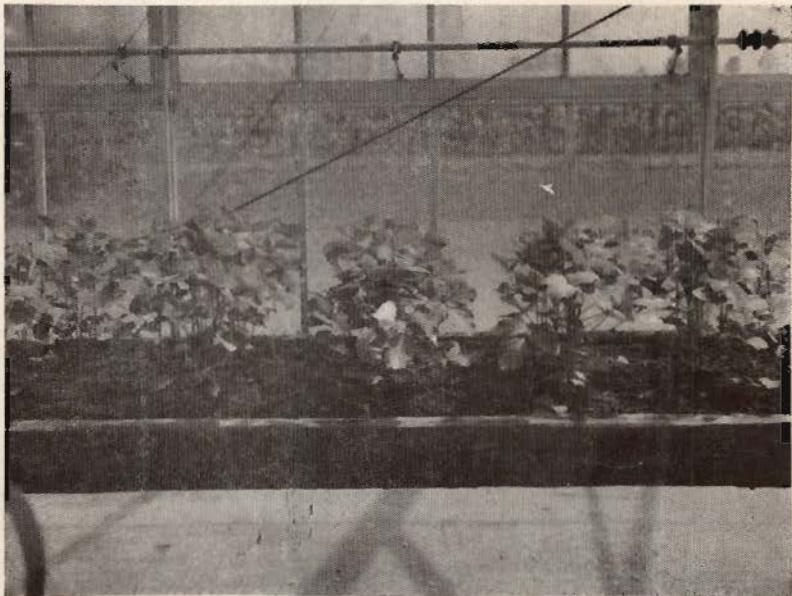


Fig 5.— Soya inoculada con una mezcla de cepa de *Rhizobium* de tercera cosecha y una cepa nueva. (Reinoculación).— Foto: Rengifo.

El 21 de junio se hizo una apreciación sobre el estado que presentaban las parcelas de los distintos tratamientos de inoculación y se calificaron de 1 a 5 según su desarrollo y vigor siendo la calificación 5 para las mejores parcelas o sea aquellas que presentaban un desarrollo excelente.

Según estas observaciones el estado del cultivo se presentó en la siguiente forma:

1— Testigo	3,50	(Promedio de seis replicaciones)
2— Inoculada	4,25	
3— "	3,25	
4— "	4,50	

La cosecha se recolectó entre el 19 y el 23 de agosto y cada parcela se trilló y pesó por separado.

Los resultados de esta cosecha se presentan en la Tabla No. 6.

TABLA No. 6

INFLUENCIA DE LAS INOCULACIONES CON DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA SOYA

Tratamiento	Replicaciones						Suma	Kilogramos por parcela Promedio	% Aumento o disminución.
	1	2	3	4	5	6			
Testigo	4,1	5,2	4,05	4,0	5,45	5,6	28,40	4,733	0
Cepa nueva	6,4	5,9	4,95	6,0	6,3	5,1	34,65	5,775	+ 22,01
Cepa de 2 cosechas	4,0	4,0	4,0	4,3	4,5	4,05	24,85	4,141	- 12,51
Cepa de 1 cosecha	5,5	4,95	5,05	5,2	4,9	4,95	30,55	5,091	+ 7,56
Suma ...	20,0	20,05	18,05	19,5	21,15	19,70	118,45		

Con los datos presentados en la Tabla No. 6 se hizo el análisis de variancia que dió los siguientes valores:

F.C.	=	584,8
S.C. Total	=	13,62
S.C. Replicaciones	=	1,26
S.C. Tratamientos	=	8,4
E.S.	=	0,296
C.V.	=	10,42%

Para averiguar el mérito relativo de los distintos tratamientos se hizo la prueba de "t", estableciéndose la mínima diferencia significativa (M.D.S.) para los niveles de $P=0,05$ y $P=0,01$.

Prueba de "t"

Para:

$$P = 0,05; \text{ M.D.S.} = 0,296 \times 2,13 = 0,63$$

$$P = 0,01; \text{ M.D.S.} = 0,296 \times 2,95 = 0,87$$

Diferencia entre promedios

- 1— Cepa nueva v.s. testigos: $5,775 - 4,733 = 1,042$
- 2— Cepa de 2 cosechas v.s. testigo: $4,141 - 4,733 = 0,592$
- 3— Cepa de 1 cosecha v.s. testigo: $5,091 - 4,733 = 0,358$
- 4— Cepa nueva v.s. cepa de 2 cosechas: $5,775 - 4,141 = 1,634$
- 5— Cepa de 1 cosecha v.s. cepa de 2 cosechas: $5,091 - 4,141 = 0,950$
- 6— Cepa nueva v.s. cepa de 1 cosecha: $5,775 - 5,091 = 0,684$

Observadas las diferencias anteriores se concluye que, bajo las condiciones en las cuales se llevó este experimento, son significativas las siguientes diferencias:

- 1— Cepa nueva vs. testigo al nivel de $P=0,01$
- 2— Cepa nueva v.s. cepa de 2 cosechas al nivel de $P=0,01$.
- 3— Cepa nueva v.s. cepa de 1 cosecha al nivel de $P=0,05$.
- 4— Cepa de 1 cosecha v.s. cepa de 2 cosechas al nivel de $P=0,01$.

Estudiados los resultados anteriores se comprobó, bajo las condiciones del presente trabajo, que la cepa nueva demostró ser superior a las cepas de 1 y 2 cosechas.

Igualmente se constató que la cepa de 1 cosecha fue superior a la cepa de dos cosechas con lo que se comprueba experimentalmente que a medida que las bacterias permanecen en el suelo van perdiendo su poder infectivo y por consiguiente su efectividad.

Comparando los rendimientos de la soya tratada con las diferentes cepas de *Rhizobium* se observa que la sola inoculación con la cepa virulenta aumentó el rendimiento en un 22%, que significa según los

datos de la Tabla No. 6. para una hectárea de cultivo un producido más de 417 kilogramos.

La producción del testigo alcanza por hectárea 1893 kilogramos y la producción de la soya inoculada arroja 2310 kilogramos para la misma área.

Empleando la cepa proveniente del campo ya con una cosecha, la producción disminuye apreciablemente; la producción por hectárea es de 2036 kilogramos y comparada con la del testigo sólo se obtiene un aumento de 7,56% que significa por hectárea un rendimiento mayor de 143 kilogramos.

La inoculación con cepa de dos cosechas bajó notoriamente la producción, dando un rendimiento menor que el testigo; la producción estimada por hectárea en este tratamiento es de 1.656 kilogramos lo que significa 237 kilogramos menos que el testigo y 654 kilogramos menos que la soya inoculada con la cepa virulenta y recién aislada.

El ensayo nos muestra muy claro que la pérdida de virulencia de las bacterias puede ser perjudicial para el rendimiento de la cosecha.

Las bacterias penetraron en la raíz pero produciendo poca formación de nódulos y formación aumentada de raíces laterales y desarrollando un parasitismo, no dando a la planta el nitrógeno que ésta necesitaba y tomando en cambio de ella valiosas sustancias nutritivas.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Varias observaciones sobre la disminución de los rendimientos de las cosechas de ciertas leguminosas, especialmente frijol y soya, después de cultivos sucesivos en el mismo suelo y bajo condiciones del trópico, condujeron al autor a la realización del presente trabajo para demostrar las causas de esta disminución.

La revisión de la literatura existente sobre este fenómeno dió a conocer un gran número de factores internos y externos que pueden influir sobre este hecho.

Prácticamente no existen investigaciones sobre la simbiosis de las leguminosas con *Rhizobium* en regiones tropicales y seguramente el comportamiento de las bacterias que penetran en las raíces de éstas para efectuar allí la fijación del nitrógeno atmosférico debe de ser completamente diferente al que se observa en las regiones templadas.

Al estudiar los trabajos científicos de esas regiones, la mayoría de los autores indican que una vez infectado el suelo con *Rhizobium*, las leguminosas cultivadas sobre éste se aprovechan de las bacterias durante muchos años siendo necesario la reinoculación cada tres a seis años, en caso que éstas hayan perdido su virulencia.

El autor empleó intencionadamente soya en todos los experimentos por ser esta una planta hasta ahora muy poco cultivada en nuestro medio y como necesita una cepa específica para su inoculación se corría muy poco riesgo de encontrar esta clase de *Rhizobium* en el suelo, lo que no ocurre con el frijol que es un cultivo muy difundido en la región.

En los primeros ensayos en arena lavada se pudo demostrar perfectamente que es necesario inocular la soya con *Rhizobium* para obtener buenos rendimientos.

Los ensayos de inoculación con las cepas de una y dos cosechas, también verificadas en arena, comprueban la pérdida de virulencia de estas bacterias ya que en los resultados prácticamente no podían influir otros factores, como por ejemplo, ciertas sustancias inhibitoras en el suelo o el desequilibrio de ciertas sustancias nutritivas y activas.

Los efectos se mostraron, como ya se ha expuesto, en la formación de nódulos anormales y una formación abundante de raíces laterales hinchadas y anormales.

Esto nos demuestra que las bacterias han penetrado en las raíces de las plantas sin comportarse en forma normal, como la cepa de *Rhizobium* recién aislada y virulenta; este fenómeno nos demuestra además que estas dos cepas habían perdido su virulencia en el campo de donde fueron aisladas, el cual había sido inoculado con cepa recién aislada y virulenta hacía 8 o 12 meses lo que quiere decir que estas bacterias perdieron su poder de infección en el transcurso de estos meses.

En los ensayos en condiciones de invernadero y de campo se observaron los mismos efectos pero naturalmente menos marcados que en los experimentos en arena.

Según las observaciones y experimentos realizados, las bacterias inoculadas en un campo pierden prácticamente su poder de infección después de la primera cosecha.

Las causas de esta pérdida, que no son objeto de este estudio, pueden ser diversas y han sido mencionadas en el capítulo I.

La disminución de los rendimientos en la segunda cosecha hecha en el mismo sitio no es muy grande y sigue siendo superior el producido de la soya inoculada con cepa nueva al producido del testigo, pero ya cosechando por tercera vez en el mismo suelo, la infección de las bacterias es perjudicial para la planta y se expresa en una disminución muy elevada que alcanza valores más bajos que el testigo.

De acuerdo con los resultados de estos ensayos, es necesario recomendar no sembrar soya por segunda y tercera vez en el mismo campo sino hacer una rotación de cultivo o reinocular para cada siem-

bra, como se demostró en los últimos ensayos de reinoculación hechos en el invernadero.

Al hacer una reinoculación, seguramente penetran a la raíz las dos cepas empleadas, pero la cepa nueva aventaja en su poder de infección a las cepas viejas e impide que la vida parásita desarrollada por éstas perjudique a la planta, formando en cambio nódulos normales capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

RESUMEN

El autor describe sus investigaciones sobre la inoculación de la soya en regiones tropicales y los diferentes fenómenos que se presentan en cultivos continuos de esta planta sobre el mismo suelo con respecto a la simbiosis entre *Rhizobium* del grupo soya con su huésped; también trata de la efectividad de diferentes cepas de esta bacteria.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

1— Para obtener altos rendimientos es necesario, en tierras que nunca han sido cultivadas con soya, inocular la semilla.

2— Cultivando soya por segunda y tercera vez en el mismo campo, disminuye la producción, efecto que tiene su causa en la pérdida de virulencia del *Rhizobium* en el suelo, como lo demostraron los ensayos en arena, invernadero y campo.

3—La pérdida de la virulencia de las bacterias que penetran a la raíz, se manifiesta en cambios morfológicos de ésta, como por ejemplo, formación abundante de raíces laterales hinchadas anormales y nódulos anormales.

4—Una reinoculación de la semilla puede evitar la disminución de la producción del cultivo en un suelo sembrado varias veces con esta planta.

5—En la discusión se dan recomendaciones prácticas con respecto a la inoculación y al cultivo sucesivo en el mismo suelo.

BIBLIOGRAFIA

- 1— **Appleman, M. D. and Sears, O. H.**— Effect of DDT upon nodulation of legumes. *Jour. Am. Soc. Agron.* 38 (6) pp 545-550. 1946.
- 2— **Carlyle, R.E. and Thorpe, J. D.**— Some effects of Amonium and Sodium 2, 4 Dichlorophenoxyacetates on legumes and the *Rhizobium* Bacteria. *Jour. Am. Soc. Agron.* 39 (10) p. 935. 1947.
- 3— **Casas, C.C.**— Presencia en el suelo de substancias inhibidoras de crecimiento de *Rhizobium*. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.* Vol. IV, 4, p. 339.

- 4— **Datta, S. C.**— On the bacteriophage of root nodule organisms. *Indian Jour. Agric. Sci.* 14 (4): 272-276. 1944. Extractado de *Biological Abstracts* p. 2137. 1945.
- 5— **Davis, J. F.**— Field observation regarding the value of root nodule bacteria. *Jour. Am. Soc. Agron.* 36 (10): 869-871. Extractado de *Biological Abstracts* p. 133. 1945.
- 6— **Marcilla, J., Aguirre, J., Xandri, Andrés y José María.**— Inoculación de las semillas de leguminosas con Bacterias Radicícolas. *Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas*. Vol. X; 23; 305-363. Madrid, 1950.
- 7— **Krasilnikow, N. A. y Koreniako, A. I.**— Influence of soil bacteria on the virulence and activity of nodule bacteria. *Microbiology (U.R.S.S.)* XIII: 39-44. 1944.
- 8— **Kurnik, E.**— Contributions to the problem of soil inoculation. *Agrártudomány* 2 (2): 100-103. 1950. Extractado de *Biological Abstracts* p. 2863. 1950.
- 9— **Link, G. K. K.**— Role of heteroauxones in legume nodule formation, beneficial host effects of nodule and soil fertility. *Nature*, London. 1937.
- 10— **Nutman, P. S.**— A factor in clover nodule formation associated with the volume of the medium occupied by the roots; *Nature*, London. 156 (3949): 20. 1945. Extractado de *Biological Abstracts* p. 595. 1946.
- 11— **Poschenrieder, H.; Samnet, K. y Fischer, R.**— Untersuchungen ueber den Einfluss verschiedener Ernaehrung mit Kali und Phosphorsaure auf die Ausbildung der Wurzelknoellchen und die Taetigkeit der Knoellchenbakterien bei des Soyabohne. *Zentralbl. Bakt. Abt. III* 102 (21|22) — 1940.
- 12— **Shvetsova, O. I.**— The bacteriophage and nodule bacteria. II. *Microbiologia* 13 (2|3): 107-115. 1944. Extractado de *Biological Abstracts* p. 151. 1946.
- 13— **Trusell, P. C. y Sarles, W. B.**— Effect of antibiotic substances upon Rhizobia. *Journ. Bac.* XLV:29. 1943.
- 14— **Virtanen, A. I. and H. Linkola.**— Competition of Rhizobium strain in nodule formation. *Antonie van Leeuwenhoek Jour. Microbiol. and Serol. Jubilee* Vol. Albert J. Kluver 12 (¼): 65-77. 1947. Extractado de *Biological Abstracts* p. 2258. 1947.
- 15— **Vihtanen, A. I.** Symbiotic nitrogen fixation. *Nature*, London, 155 (3947): 747-748. 1945. Extractado de *Biological Abstracts* p. 595. 1946.