

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**TEMA: EVALUACIÓN DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Rhizobium* EN
ALFALFA (*Medicago sativa*) A TRES CONCENTRACIONES DE
APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA
TANICUCHI, CANTÓN LATACUNGA. 2015.**

Tesis de grado presentado previo a la obtención del Título de Ingeniera
Agrónoma.

Autora: Peñaherrera Pinos Viviana Madelaine

Director: Ing. Chasi Vizquete Wilman Paolo

Latacunga - Ecuador

2016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Me permito amparar la constancia del contenido, resultados, conclusiones y recomendaciones expuestas en la investigación titulada: “TEMA: EVALUACIÓN

DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Rhizobium* EN ALFALFA (*Medicago sativa*) A TRES CONCENTRACIONES DE APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA TANICUCHI, CANTÓN LATACUNGA. 2015.”

Viviana Madelaine Peñaherrera Pinos

C.I. 050378507-3

AVAL DEL DIRECTOR

En calidad de Director del Trabajo de Investigación sobre el tema:

“EVALUACIÓN DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Rhizobium* EN ALFALFA (*Medicago sativa*) A TRES CONCENTRACIONES DE APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA TANICUCHI, CANTÓN

LATACUNGA. 2015.” De la señorita **Peñaherrera Pinos Viviana Madelaine**, postulante de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científicotécnicos suficientes para la validación del Anteproyecto y de ello desarrollar la tesis.

Latacunga, 29 de abril del 2016

El Director

.....

Ing. Chasi Vizquete Wilman Paolo

AVAL DE MIEMBROS DEL TRIBUNAL

En calidad de Miembros del Tribunal de la Tesis de Grado titulada “EVALUACIÓN DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Rhizobium* EN ALFALFA (*Medicago sativa*) A

TRES CONCENTRACIONES DE APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA TANICUCHI, CANTÓN LATACUNGA. 2015.” presentado por la Señorita estudiante, Peñaherrera Pinos Viviana Madelaine, como requisito previo a la obtención del grado de la Ingeniería Agronómica de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, consideramos que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la presentación pública.

Atentamente

Ing. Ruth Pérez

Presidente del tribunal -----

Ing. David Carrera

Miembro -----

Ing. Luis Benavides

Opositor -----

AGRADECIMIENTO

Al haber logrado una meta más en mi vida agradezco primero a Dios por darme la

oportunidad de estar aquí. También quiero agradecer a mi madre por haberme apoyado en todo momento un logro más conseguido gracias a ti, a la vez quiero agradecer a mi esposo que es el que siempre me ha impulsado y apoyado en los momentos más difíciles en la culminación de mi carrera académica.

Por ultimo quiero agradecer a mi padre, hermana, sobrinas, suegros y cuñadas que son un pilar fundamental en mi vida.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de tesis a mis padres especialmente a mi madre ya que siempre me han apoyado incondicionalmente a lo largo de mi carrera.

A mi esposo por el apoyo que siempre me brindo día a día a lo largo de mi trabajo realizado.

Viviana Peñaherrera.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el barrio Río Blanco Alto de la Parroquia Tanicuchi, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi. Tuvo como objetivo evaluar una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte, la presente se ejecutó en la propiedad del señor Gustavo Toaquiza que se encuentra a una altitud de 2850 msnm, con la finalidad de mejorar el rendimiento en la producción de la especie en estudio, cuyas variables en estudio fueron: % de rebrote a los 7 y 14 días después de la aplicación, altura de la planta, biomasa por planta, número de nódulos en la raíz y el rendimiento del cultivo.

Se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar DBCA, con arreglo factorial $3 \times 2 + 1$, con 4 repeticiones, con análisis de varianza ADEVA, para jerarquizar a los tratamientos, y para resultados significativos se aplicó la prueba de significación de Tukey al 5%.

Los análisis estadísticos muestran que el mejor tratamiento fue T1 con una concentración de 1×10^9 UFC/lit en interacción con el segundo corte realizado, obteniendo como resultado para % de rebrote a los 7 días un valor de 90,79% superando a T0 con un % de 88,65; para % a los 14 días T1 da un valor de 95,15 % a diferencia de T0 que da un valor de 99,37% superando a T1 en rebrote.

Para altura de plantas T1 obtiene 57,58 cm en las plantas evaluadas, y T0 (57,77 cm) sobrepasando a T1; para la variable Biomasa T1 alcanza un valor de 46,23 g en promedio de las plantas, T0 tiene un promedio de 48,63 g. superando este valor a T1.

En cuanto a número de nódulos en la raíz el promedio de T1 es 31,75 por planta a diferencia de T0 que da como resultado 14,95; para rendimiento T1 tiene un valor de 3567,50 Kg/ha sobresaliendo el T0 con un valor 5700,00 Kg/ha.

ABSTRACT

THESIS TOPIC: EVALUATION OF A COMMERCIAL STRAIN OF *Rhizobium* IN ALFALFA (*Medicago sativa*) TO THREE LEVELS OF APPLICATION AND CUT TWO TIMES, OF IN THE TANICUCHI PARISH, LATACUNGA CITY . 2015.

This research was realized in Rio Blanco Alto neighborhood, Tanicuchi Parish, Latacunga city, Cotopaxi province. Aimed to evaluate a commercial strain of *Rhizobium* in alfalfa (*Medicago sativa*) to three levels of application and two cutting times, this was carried out on Mr. Gustavo Toaquiza's property, located at an altitude of 2850 meters, with the purpose to improve the production of the species under study, which variables studied were: % regrowth at 7 and 14 days after application, plant height, biomass per plant, number of nodules on the root and crop yield.

The experimental block design was completely randomized DBCA with factorial arrangement $3 * 2 + 1$, with 4 repetitions, with analysis of variance ANOVA, to rank treatments, and for the significant results, was applied the test of Tukey 5%.

Statistical analyzes show that the best treatment was T1 with a concentration of 1×10^9 CFU / lt in interaction with the second cut made, resulting in regrowth for % 7 days worth 90.79% outperforming T0 with a 88.65%; at 14 days T1 gives a value of 95.15% in difference with T0 that gives a value of 99.37%, beating T1 in regrowth.

For plants height, T1 obtained 57.58 cm in evaluated plants, and T0 (57.77 cm) surpassing T1; Biomass variable in T1 reaches a value of 46.23 g in average plant, T0 has an average of 48.63 g. exceeding this value to T1.

In fact of number of nodules on the root, the average per plant for T1 is 31.75 unlike the results for T0 was 14.95; for performance, T1 has a value of 3567.50 kg / ha protruding T0 with a value of 5700.00 Kg / ha.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AVAL DEL DIRECTOR	iii
AVAL DE MIEMBROS DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	2
1.1. Planteamiento del Problema	2
1.2. Justificación	4

1.3. Hipótesis	5
1.3.1. <i>Nula.</i> -	5
1.3.2. <i>Alternativa.</i> -	5
1.4. Objetivos.....	6
<i>Objetivo General:</i>	6
<i>Objetivos Específicos:</i>	6
1.5. Marco teórico.....	7
1.5.1. <i>Clasificación Científica del Cultivo de alfalfa (Medicago sativa)</i> (Raven, 2013).....	7
1.5.2. <i>Generalidades</i>	7
1.5.3. <i>Requerimiento nutricional de la alfalfa (Andrade, y otros, 1996.)</i>	9
1.5.4. <i>Rendimiento</i>	10
1.5.5. <i>Requerimiento de pH para el cultivo de alfalfa</i>	10
1.5.6. <i>Clasificación científica del Rhizobium (Ramírez, 2008)</i>	11
1.5.7. <i>Generalidades de Rhizobium sp.</i>	11
1.5.8. <i>Descripción microscópica y macroscópica:</i>	12
1.5.9. <i>Metabolismo:</i>	12
1.5.10. <i>Proceso de nodulación</i>	13
1.5.11. <i>Importancia de la fijación biológica de nitrógeno (FBN)</i> <i>en leguminosas</i>	14
1.5.12. <i>Simbiosis Rhizobium -leguminosas</i>	16
1.5.13. <i>Cepa de Rhizobium</i>	18
1.5.14. <i>Concentración de las cepas de Rhizobium</i>	19
1.5.15. <i>Bioaumentación</i>	19
CAPÍTULO II	20

2.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	20
2.5.	Caracterización del sitio experimental	20
2.5.5.	<i>Barrio Rio Blanco Alto – Tanicuchí</i>	20
2.6.	Diseño metodológico	21
2.6.5.	<i>Tipo de investigación</i>	21
	2.6.5.1. <i>Metodología y</i> <i>Técnica</i>	21
2.6.6.	<i>Método</i>	22
	2.6.6.1. <i>Experimental</i>	22
2.6.7.	<i>Técnica</i>	22
	2.6.7.1. <i>Observación</i>	22
	2.6.7.2. <i>Fichaje</i>	22
2.7.	Unidad experimental	23
2.8.	Factores en estudio	23
2.8.5.	<i>A: tres concentraciones</i>	23
2.8.6.	<i>B: dos cortes</i>	23
2.8.7.	<i>Tratamientos</i>	24
2.9.	Fuentes de variación (análisis del adeva)	25
2.10.	Materiales y recursos	25
2.10.5.	<i>Materiales de Campo</i>	25
2.10.6.	<i>Material Experimental</i>	26
2.10.7.	<i>Equipos</i>	26
2.10.8.	<i>Talento Humano</i>	26
2.10.9.	<i>Materiales de escritorio</i>	26

2.7. Operacionalización de las variables	27
2.7.1. Variables a evaluar	27
DATOS A TOMAR.....	27
2.8. Manejo específico de la investigación.-	28
2.8.1. Análisis de suelo	28
2.8.2. Análisis de Rizobios	28
2.8.3. Concentraciones de las cepas de <i>Rhizobium</i>	28
2.8.4. Aplicación de las cepas de <i>Rhizobium</i>	29
2.8.5. Registro de % de rebrote de la alfalfa	29
2.8.6. Registro de la altura de la planta	29
2.8.7. Biomasa por planta	29
2.8.8. Corte de la alfalfa	29
2.8.9. Rendimiento.....	30
CAPÍTULO III	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. Porcentaje de rebrote a los 7 días	31
3.2. Porcentaje de Rebrote a los 14 días	32
3.3. Altura de la planta	34
3.4. Biomasa por planta	36
3.5. Número de nódulos de la raíz	38
3.6. Rendimiento	40
3.7. Análisis de suelo	43
3.8. Análisis de rizobios	43
3.9. Análisis económico	44
Conclusiones	45

Recomendaciones	47
GLOSARIO.....	48
BIBLIOGRAFIA:	50
ANEXOS.....	55
Anexo 1. Ubicación de los tratamientos en campo	55
Anexo 2. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 7 días en el primer corte.	56
Anexo 3. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 15 días en el primer corte.	56
Anexo 4. Promedios para resultados, altura de planta en el primer corte.	56
Anexo 5. Promedios para resultados, biomasa por planta en el primer corte.	57
Anexo 6. Promedios para resultados, número de nódulos en la raíz en el primer corte.	57
Anexo 7. Promedios para resultados, rendimiento por hectárea en el primer corte.	57
Anexo 8. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 7 días en el segundo corte.	58
Anexo 9. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 15 días en el segundo corte.	58
Anexo 10. Promedios para resultados, altura de planta en el segundo corte.....	58
Anexo 11. Promedios para resultados, biomasa por planta en el segundo corte.	59
Anexo 12. Promedios para resultados, número de nódulos en la raíz en el segundo corte.	59
Anexo 13. Promedios para resultados, rendimiento por hectárea en el segundo corte.	59
Anexo 14. Actividades realizadas en el ensayo.....	60

Anexo 15. Análisis de suelo realizados al inicio y al final del ensayo	64
Anexo 16. Análisis de rizobios al inicio y al final del ensayo	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1 Requerimiento nutricional de alfalfa	9
Cuadro N° 2 Rendimiento de Alfalfa	10
Cuadro N° 3 Descripción de la unidad experimental	23
Cuadro N° 4 Tratamientos a aplicarse en la EVALUACIÓN DE UNA CEPA COMERCIAL DE <i>Rhizobium</i> EN ALFALFA (<i>Medicago sativa</i>) A TRES CONCENTRACIONES DE APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA TANICUCHI, CANTÓN LATACUNGA. 2015.	24
Cuadro N° 5 Esquema de ADEVA	25
Cuadro N° 6 Operacionalización de las variables	27
Cuadro N° 7 ADEVA para el indicador porcentaje de rebrote a los 7 días para la Evaluación de una cepa comercial de <i>Rhizobium</i> en alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.....	31
Cuadro N° 8 ADEVA para el indicador porcentaje de rebrote a los 14 días para la Evaluación de una cepa comercial de <i>Rhizobium</i> en alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.....	32
Cuadro N° 9 ADEVA para el indicador altura de la planta para la evaluación de una cepa comercial de <i>Rhizobium</i> en alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la parroquia Tanicuchi, cantón Latacunga. 2015.	34
Cuadro N° 10 ADEVA para el indicador porcentaje de biomasa por planta para la Evaluación de una cepa comercial de <i>Rhizobium</i> en alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.....	36

Cuadro N° 11 ADEVA para el indicador número de nódulos en la raíz para la Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi,

Cantón Latacunga. 2015..... 38

Cuadro N° 12 ADEVA para rendimiento del cultivo para la evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de

aplicación y en dos tiempos de corte..... 40

Cuadro N° 13 Análisis de suelo realizado al inicio y al final del ensayo. 43

Cuadro N° 14 Análisis de rizobios del suelo realizado al inicio y al final del

ensayo 43

Cuadro N° 15 Análisis económico 44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1 Tomado de google datos de mapas 21

Gráfico N° 2 Porcentaje de rebrote a los 7 días 32

Gráfico N° 3 Porcentaje de rebrote a los 14 días 33

Gráfico N° 4 Altura de planta 35

Gráfico N° 5 Biomasa por planta 37

Gráfico N° 6 Nodulación en la raíz de acuerdo a los tratamientos
(concentraciones) 39

Gráfico N° 7 Nodulación en la raíz de acuerdo a los tiempos de corte 39

Gráfico N° 8 Rendimiento 41

Gráfico N° 9 Concentraciones versus cortes 42

INTRODUCCIÓN

Esta investigación realizada en la zona de Rio Blanco Alto lugar donde se conoce su alta producción agropecuaria, debido a esto se ha visto la necesidad de cultivar un pasto de la sierra como es la Alfalfa (*Medicago sativa*) para satisfacer parcialmente las necesidades de alimentación de los animales que esta población posee.

Por lo que se propone bioaumentación de *Rhizobium* en este cultivo para determinar el rendimiento ya que uno de los principales problemas del sector es la deficiencia de fertilización química y los altos costos que representa.

Así, el sentido final de esta tesis es determinar la concentración ideal para la aplicación del *Rhizobium*, con el objetivo de saciar las necesidades de consumo de los animales locales con la producción de este pasto.

Una muestra evidente del papel tan crucial de la bacteria *Rhizobium* en la nodulación de la raíz de la planta de alfalfa (*Medicago sativa*) y la importancia de esta en la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN), información encontrada en libros, documentos científicos que se orientan en este sentido.

Mi propósito, en consecuencia, es lograr una óptima producción de este pasto disminuyendo así el consumo de nitrógeno de origen sintético, satisfaciendo los requerimientos de este nutriente en las plantas con la aplicación de dicha bacteria, pudiendo de esta forma evitar la contaminación de suelo y agua.

CAPÍTULO I

1.1. Planteamiento del Problema

El cultivo de alfalfa en el Ecuador cada vez es más importante para la alimentación animal de manera directa o luego de su transformación mediante procesos industriales. En los últimos años ha manifestado una creciente importancia también en la alimentación humana debido a su alto contenido nutricional. En tal virtud este cultivo constituye una buena alternativa del sector campesino. (Benítez, 1986)

Según el III Censo Nacional Agropecuario del 2001 en el Ecuador existían, en esa fecha, 24 863 hectáreas cultivadas únicamente de alfalfa y 1 478 hectáreas como pasto asociado, la producción de este pasto en la provincia de Cotopaxi está en 2071,92 ha.

Además se contabilizaron 70 683 unidades productivas agropecuarias de esta planta 69 479 tenían una extensión de menos de una hectárea. De igual manera se referencia al respecto del cultivo en el cantón Cevallos (Tungurahua) cultivan esta planta para alimentar a cuyes, conejos y ganado en general. El 75% es para consumo propio y el 25% restante lo comercializan en las ferias cantonales. En total existen unas 800 hectáreas sembradas de este producto en los terrenos de dicho cantón.

Debido a que agricultura convencional es el sistema más común para la producción agrícola, un sistema donde la base es la utilización de productos de origen sintético que causan efectos secundarios al Medio Ambiente ocasionados ya sea por la mala aplicación o por dosis exageradas de los mismos. El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en agricultura ocasiona graves problemas de contaminación. No todo el fertilizante que se aplica lo aprovecha la planta. La fijación biológica de nitrógeno es la opción natural de síntesis y asimilación de N.

Siendo la FBN una forma de fertilización alternativa, mejorando y recuperando los suelos y reduciendo así la contaminación del suelo y agua; utilizando tecnologías limpias para enriquecer la biodiversidad de los suelos, que además, ayudan a conservar el medio ambiente.

Se ha determinado que el uso de bacterias fijadoras de N como es el *Rhizobium* fija este nutriente a grandes cantidades en el suelo.

1.2. Justificación

El presente trabajo, cuyo tema es “Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte, en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.” Tiene como finalidad evaluar la

incidencia de la bioaumentación de *Rhizobium* en el cultivo de alfalfa y buscar una alternativa a la aplicación de Nitrógeno de origen sintético en este cultivo, ya que este produce efectos secundarios en el medio ambiente como la contaminación, por lo que se consideró relevante para efecto de la presente investigación en la que se pretende dar una solución de cultivo para zonas con bajo nivel de nitrógeno en los suelos.

Al inocular *Rhizobium* en este cultivo, estas ayudan a fijar nitrógeno del aire al suelo, cumpliendo con los requerimientos de las plantas, ayudando así a suelos con bajo nivel de este elemento y evitando la contaminación de suelos y agua.

Estableciendo una tecnología alternativa de síntesis de N al agricultor para el mejoramiento y recuperación de los suelos, pudiendo así satisfacer las necesidades que estos tienen para alimentar a las distintas especies animales, evitando la compra de alfalfa a terceras personas y mejorando la economía del agricultor.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Nula.-

- La cepa comercial de *Rhizobium* no influye en el rendimiento de la alfalfa
- Las concentraciones de *Rhizobium* no influyen en el rendimiento de la alfalfa.

1.3.2. Alternativa.-

- La cepa comercial de *Rhizobium* influye en el rendimiento de la alfalfa
- Las concentraciones de *Rhizobium* influyen en el rendimiento de la alfalfa.

1.4. Objetivos

Objetivo General:

- Evaluar una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte, en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.

Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración más efectiva.
- Identificar el mejor tiempo de corte □ Determinar la mejor interacción.
- Realizar el análisis económico del mejor tratamiento.

1.5. Marco teórico

1.5.1. *Clasificación Científica del Cultivo de alfalfa (Medicago sativa)* (Raven, 2013)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Faboideae
Tribu:	Trifolieae
Género:	Medicago
Especie:	Medicago sativa

1.5.2. *Generalidades*

Es una planta perenne, de raíz gruesa y tallo leñoso, foliolos aovados u oblongos dentados en el ápice, estípulas semi-lanceoladas, largamente acuminadas en la base. Flores grandes, de 8 –10 mm, en racimos oblongos multifloros sobre pedúnculo no aristado. Semillas de 1,5 por 2,5 mm ovals. (Pozo, 1983)

La alfalfa es una leguminosa y como consecuencia tiene capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de sus raíces. Esta capacidad hace que los suelos donde crece esta planta son mejores por lo que muchas veces se planta como, una manera de fertilizante natural a los terrenos. El uso principal de esta planta es como planta forrajera para la alimentación del ganado, resulta muy nutritivo para los animales al mismo tiempo que es una de las especies con producción más elevada de las cultivadas por el hombre. Aguanta con facilidad las sequías aprovechándose de sus largas raíces que son

capaces de hundirse hasta capas profundas del suelo (se han encontrado ejemplares cuyas raíces alcanzan los 10m de profundidad). (Botanical, 2010)

Es una especie herbácea perenne que alcanza 50 y 90cm de altura, el promedio de vida útil de los alfalfares entre los 7y 8 años que con buenas condiciones de cuidado, en la actualidad se ha reducido a la mitad es decir de 3 a 4 años lo que ha incrementado el costo de mantenimiento de una hectárea de alfalfa los mismos que dan una pérdida económica significa para quienes realizan este cultivo. (Grijalva, 1995)

1.5.3. *Requerimiento nutricional de la alfalfa* (Andrade, y otros, 1996.)

CUADRO N° 1 Requerimiento nutricional de alfalfa

Nutriente	Requerimiento materia kg/ton seca
Nitrógeno	27
Fósforo	2.5
Potasio	21
Calcio	12
Magnesio	3
Azufre	3.5
Boro	0.030
Cobre	0.007
Hierro	0.040
Manganeso	0.025
Molibdeno	0.0003
Zinc	0.015

Fuente: (Andrade, y otros, 1996.)

La mayor parte del requerimiento de nitrógeno puede ser cubierto por fijación biológica de nitrógeno.

1.5.4. Rendimiento

El rendimiento esperado es 90 toneladas de forraje verde por hectárea 23 toneladas de forraje seco por hectárea 20 a 24 toneladas de materia seca por hectárea. Con seis a nueve cortes al año. (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, 2005)

La siguiente tabla el rendimiento promedio de forraje verde y materia seca para los cuatro cortes (kg/ha) FV MS. (Florian., 2007)

CUADRO N° 2 Rendimiento de Alfalfa

CORTES	FORRAJE VERDE	MATERIA SECA
1	12500	2800
2	13600	3020
3	17500	3330
4	18400	4500

Fuente: Florian (2007)

Para la alfalfa se establece categorías de rendimiento que están expresadas en Tm/ha determina que valores de 5,6 son comunes; 7,8 corresponde a un buen rendimiento y los superiores a 10,1 son excelentes. (AID, 1979)

1.5.5. Requerimiento de pH para el cultivo de alfalfa

El factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiéndose ser de hasta 4, el pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio manganeso que son tóxicos para la alfalfa y existe una relación directa entre la formación de nódulos y el efecto del pll sobre la alfalfa. La bacteria nodulante de la alfalfa es *Rhizobium meliloti*, esta especie es neutrófila y deja de

reproducirse por debajo de pll 5. (INFOAGRO, 2014) **1.5.6. Clasificación científica del *Rhizobium*** (Ramírez, 2008)

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Proteobacteria alfa
Orden :	Rhizobiales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	<i>Rhizobium</i>

Especie tipo

Rhizobium melitoti

1.5.7. Generalidades de *Rhizobium* sp.

La taxonomía de los rizobios, ha cambiado considerablemente en los últimos 20 años, con el género *Rhizobium*, un miembro de α -Proteobacteria, ahora se divide en varios géneros. El estudio de plantas promiscuas hospederas, dispersas geográficamente, ha sido fuente de muchas especies nuevas y se espera que se produzca muchos más. Recientemente, una serie de aislamientos se han registrado en los nódulos de las leguminosas, con capacidad de fijación de nitrógeno, pero filogenéticamente se ubican fuera de los grupos tradicionales de rizobios en α proteobacterias. (Willems, 2006)

Desde la década de los 80, con la introducción de características genéticas (ADN-ADN y las hibridaciones ADN-rARN, catálogos rARN, secuenciación del rADN) una mayor diversidad fue descubierta entre los rizobios y sus relaciones con otros grupos de bacterias se hizo evidente. Esto condujo a un aumento gradual en el número de géneros. En paralelo, también ha habido un aumento significativo en el

número de especies válidamente publicadas con 48 especies de rizobios reconocidas. (Willems, 2006)

1.5.8. Descripción microscópica y macroscópica:

Bacilos de 0.5-1.0 X 1.2-3.0 μm . Gramnegativos. Móvil por flagelos peritricos. Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en medio YMA (Levadura- Manitol Sales- Agar). El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Desarrollan una pronunciada turbidez de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado. (Kuykendall, y otros, 2005) **1.5.9. Metabolismo:**

Aerobios, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30°C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40 °C. El pH óptimo de crecimiento está entre 6.0 y 7.0. Sin embargo, pueden predominar entre valores de 4.0 a 10.0. El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium sp.* Está entre 1.5-5.0 horas.

(Kuykendall, y otros, 2005)

Es quimiorgano heterótrofo, utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción ácida en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato o ácido nicotínico. La peptona es pobremente utilizada mientras que la caseína, el almidón y la quitina y el agar no son hidrolizados. (Kuykendall, y otros, 2005)

1.5.10. *Proceso de nodulación*

Este proceso se caracteriza por la atracción y reconocimiento entre la leguminosa y la bacteria. El *Rhizobium* entra a la planta a través de los pelos radiculares, formando una estructura llamada hilo de infección, e infecta intracelularmente a las células corticales de la raíz. Una vez dentro de la célula, las bacterias se diferencian en bacteroides y comienza el proceso de la fijación de nitrógeno. (Masson - Boivin., 2009)

Durante los eventos iniciales de la interacción, se expresan los genes de las nodulinas tempranas de la planta, que participan principalmente en el desarrollo o formación del nódulo. (Oldroyd, y otros, 2005)

Cuando se da la unión de los rizobios a los pelos radicuales, se induce un cambio en la dirección de crecimiento apical, generándose una deformación y curvatura de los pelos radicuales o curling” donde quedan atrapadas las bacterias. Se forma un canal de infección por donde entran los rizobios al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar a la endocitosis. (Carlson, y otros, 1994)

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se inicia por los exudados de las raíces de plantas que soportan el crecimiento de rizobios y expresión de los genes de nodulación. Entre estos elementos los flavonoides (por ejemplo: luteolina, narigenina y genistéina) que específicamente interactúan con proteínas bacteriana NodD activando la expresión de los genes (nod), dando lugar a la formación y secreción de los factores de nodulación. (D'Haese, y otros, 2002)

Los factores Nod están constituidos por una estructura básica que consiste en oligómeros de N- acetilglucosamida, unidos por un enlace β 1-4, con diversas sustituciones; al interactuar con la planta, los factores Nod estimulan la división de las células vegetales induciendo el enroscamiento de los pelos radicuales, dando lugar a las estructuras conocidas como nódulos. (Bordeleau, y otros, 1994)

Casi todos los rizobios tienen los genes nodABC en común. NodC sintetiza los quitooligosacáridos; NodB y NodA, la estructura base de acetilato y N-acilato, respectivamente. Las modificaciones de la estructura de los factores nod dependerá de los genes de nodulación de la cepa específica que codifican las enzimas que sintetizan los precursores utilizados por transferasas (por ejemplo: nodH, nodPQ y nodL). Los genes nodIJ son los responsables de la secreción de los factores nod. Las diferencias en la estructura de los factores nod juegan un papel importante en la especificidad del hospedador de cepas de rizobios. (D'Haese, y otros, 2002)

1.5.11. *Importancia de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas*

La FBN es el proceso que transforma el nitrógeno atmosférico, que es inerte, en una forma biológicamente útil siendo la principal forma de entrada en ecosistemas desérticos. (Zahran, 2001)

Químicamente, este es similar al proceso Haber-Bosch ($N_2 + 2H_2 \rightarrow 2NH_3$, 500°C y 350 atm), que es el método comercial de la producción de amoníaco para fertilizantes nitrogenados, consumiendo una gran cantidad de energía, estimándose que se necesitan 1,5 Kg. de combustible por cada Kg. de nitrógeno fijado. Lo anterior implica un alto costo económico (Ndakidemi, y otros, 2006)

Así mismo, el suministro de forma sintetizada en la agricultura afecta considerablemente el suelo haciéndose insostenible por su continuo uso reflejándose en bajos rendimientos en los cultivos. (Mahecha, 2002)

El proceso de FBN es utilizado en la naturaleza por diferentes géneros bacterianos. Las plantas se benefician de este proceso cuando las bacterias mueren y liberan el nitrógeno al suelo o cuando las bacterias viven en estrecha asociación con las plantas. (Willems, 2006)

Resaltando principalmente esta asociación simbiótica, la cual se presenta en los cultivos de leguminosas. Estos microorganismos, denominados rizobios, viven en los nódulos de las plantas fijando el nitrógeno en forma de amonio, que es absorbido por las plantas. (Herridge, 2008)

Si bien existe una amplia gama de organismos y asociaciones vegetales que son capaces de fijar N_2 de la atmósfera, la relación simbiótica entre rizobios y leguminosas es responsable de contribuir con la mayor cantidad de nitrógeno fijado en especies agrícolas. (Chianu, y otros, 2011)

Las leguminosas de grano contribuyen con más de 20 millones de toneladas de N_2 fijado a la agricultura de cada año. (Herridge, 2008)

Por lo tanto, la importancia de la FBN como el principal mecanismo para el reciclaje de nitrógeno de la atmósfera a formas disponibles en la biosfera no puede ser exagerada. La fijación de nitrógeno en la biosfera se estima en unos 275 millones de Tm. anuales, de los cuales 30 corresponden a causas naturales, 70 a fijación industrial y 175 al proceso de fijación biológica (Burns, y otros, 1975)

Haciendo parte microorganismos diazotróficos de vida libre, asimbióticos y simbióticos. (Marín, y otros, 1999)

Las entradas en los ecosistemas terrestres de FBN a partir de la relación simbiótica entre leguminosas y sus rizobios es de 70.000.000 toneladas de N_2 /ha/año. (Brockwell, y otros, 1995)

Esta cantidad puede aumentarse en la medida que la población mundial se incremente y las fuentes naturales que suplen los fertilizantes nitrogenados disminuyan. El empleo elevado de fertilizantes nitrogenados representa una carga medioambiental, que incluye la contaminación del aire, la lluvia ácida, contaminación del agua por nitrato, así como eutrofización y reducción de la biodiversidad.

(Socolow, 1999)

Las grandes aplicaciones de fertilizantes nitrogenados para maximizar la producción en los países desarrollados sólo exacerbarán estos problemas, mientras que en los países subdesarrollados el alto costo y los problemas de distribución continuarán siendo las limitantes. Esto indica que la fijación biológica del nitrógeno por microorganismos, especialmente los de tipo simbióticos, proporcionan una alternativa económica, viable y ecológicamente sana que pudiera contribuir a mitigar esta problemática de forma sustentable. (Sylvia, y otros, 2005)

Aproximadamente el 80% del nitrógeno fijado biológicamente en la agricultura, proviene de la simbiosis entre las leguminosas y las especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*. (Vance, 1998)

De esta unión se forma, a nivel radicular, un órgano llamado nódulo dentro del cual se transforma el nitrógeno (N_2) del aire en amonio (NH_4^+), gracias a la acción de la enzima nitrogenasa, (Mannion, 1998) que es una forma asimilable por las plantas. Para el año 2025 se espera que la población mundial haya crecido hasta un 40%. (Baca, y otros, 2000)

Teniendo en cuenta que aproximadamente 11g de nitrógeno se consumen por persona cada día (Singh, y otros, 2003) y que las leguminosas aportan hasta el 80% de las necesidades dietéticas. (Frink, 1999)

En la mayor parte de los trópicos y subtrópicos, se necesitaría para entonces un incremento desmesurado en la producción agrícola mundial con el fin de disminuir la brecha entre población humana y abastecimiento de proteína. (Rangel, 2004)

1.5.12. Simbiosis *Rhizobium* -leguminosas

La mayor parte del amonio del proceso de fijación de nitrógeno es aportado por la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Newton, 2000) que se inicia por la infección en leguminosas por bacterias (*Rhizobium*), lo que resulta en la formación de nódulos de las raíces. Dentro de los nódulos, los rizobios se encuentran como bacteroides, que realizan la fijación de nitrógeno: para hacer esto, obtienen fuentes de carbono y la energía de la planta, en forma de ácidos dicarboxílicos. (Vance, 1998)

Se ha pensado que los bacteroides simplemente proporcionan amonio a la planta. Sin embargo, se muestra que un proceso más complejo “ciclo de los aminoácidos”, es esencial para la fijación simbiótica de nitrógeno por *Rhizobium sp.*, en los nódulos de guisantes. La planta proporciona los aminoácidos para los bacteroides, que les permita cerrar su asimilación de amonio. A cambio, los bacteroides actúan como orgánulos de plantas para el ciclo de los aminoácidos para la síntesis de asparagina. La dependencia mutua de este cambio evita la simbiosis de ser dominado por la planta, y proporciona una presión selectiva para la evolución de la simbiosis. (Lodwig, y otros, 2003)

Las etapas iniciales en la formación de nódulos requiere la expresión de genes de la nodulación específica (nod) de rizobios que conduce a la síntesis de un grupo de moléculas de señalización que inducen la morfogénesis de los nódulos. Dentro de los nódulos, la forma de fijación de nitrógeno de rizobios, conocido como bacteroides, están rodeadas por una membrana derivada del huésped llamado membrana peribacteroidal (MPB), que controla el intercambio molecular entre el bacteroides y las leguminosas. (Panter, y otros, 2000)

A estos grupos de bacteroides rodeados por la MPB se les llama simbiosomas. (Brewin, 2004) El factor nod (genes) de *Rhizobium* es el responsable de la iniciación del nódulo que es un lipoquito oligosacárido (LCO) y juega un papel fundamental en la inducción de respuestas simbiótica del desarrollo en las legumbres, que conduce a la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas.

(Spaink, 1996)

En la simbiosis, la planta huésped tiene la información genética para la infección simbiótica y para la nodulación. El papel de la bacteria es sólo el de disparar el proceso. Este proceso de asociación simbiótica centra su importancia en dos aspectos fundamentales de la relación rizobio-planta: la preinfección o atracción quimiotáctica de la bacteria por la planta seguida de la inducción de cambios estructurales en los pelos radicales y la infección donde la bacteria entra en el pelo y forma canales, recubiertos por nuevo material de pared celular, que van ramificándose. (Olivares, y otros, 1995)

La simbiosis *Rhizobium* -leguminosa tiene una enorme importancia ecológica y agronómica, y constituye una fuente importante de nitrógeno, y por lo tanto desempeñan un papel esencial en la estructura de los ecosistemas y la agricultura sostenible. (Lindström, y otros, 2010)

La relación entre el nitrógeno absorbido desde el suelo y el proveniente de la simbiosis varía con la especie de leguminosa, las condiciones ambientales y las características genéticas del microsimbionte. (Shabaev, y otros, 1996)

En primera instancia, mientras se genera el sistema nodular, la planta utiliza nitrógeno del suelo. Si hay mucho nitrógeno en el ambiente de la raíz, el número de nódulos formados será menor. (González, 2002)

Las plantas absorben el nitrógeno del suelo en forma de nitrato o amonio, donde el exceso de nitrógeno en el suelo en forma de nitratos, tiene un efecto inhibitorio sobre la simbiosis en todos los pasos, desde la infección, formación del nódulo y la fijación de N_2 . (Fernández C, 2003)

Así, el aporte global por FBN para las leguminosas es menor en suelos bien provistos de nitrógeno que en aquellos en que el nutriente es deficitario. (González,

2002)

1.5.13. *Cepa de Rhizobium*

Es un producto líquido en base a cepas de *Rhizobium leguminosarum* eficientes en la fijación biológica de nitrógeno y aisladas de nódulos presentes en las raíces de alfalfa. El producto tiene una concentración de células de *Rhizobium* de 5×10^{10} UFC/lit. (Bioseorganics, 2016)

1.5.14. *Concentración de las cepas de Rhizobium*

Las concentraciones de la cepa de Rhizobium 5×10^6 , 5×10^8 y 5×10^9 UFC/l expresadas en Unidades Formadoras de Colonias que contiene cada litro de la cepa, que promueven una rápida nodulación de las raíces de las plantas leguminosas. Tras la formación de estos nódulos la planta deja de necesitar aportes de Nitrógeno debido a que estos nódulos actúan de fábricas naturales captadoras de Nitrógeno atmosférico que transforman este en Nitrógeno biodisponible. (grupo, 2013)

1.5.15. *Bioaumentación*

La bioaumentación es el término general que se suele emplear para referirse al incremento en la cantidad de agentes descontaminantes, en especial a microorganismos (virus, bacterias, actinomicetos), proceso que se puede llevar a cabo tanto in-situ como ex-situ, siempre dependiendo de factores económicos, del tipo de contaminante y de las facilidades que existan para manejo ex-situ o la adquisición de los bioremediadores en las cantidades y de la calidad requeridos

(Posada, 2012)

CAPÍTULO II

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.5. Caracterización del sitio experimental

2.5.5. *Barrio Rio Blanco Alto – Tanicuchí*

Límites: Siendo Tanicuchí una de las Parroquias rurales más importantes del Cantón Latacunga, limita con otras de la siguiente manera:

Norte: Pastocalle

Sur: Guaytacama

Este: Mulaló

Oeste: Toacaso

Latitud: 0° 46' 35,730" S

Longitud: 78° 38' 08,8" W

Altura: 2850 msnm

Clima: clima promedio de 9- 11°C

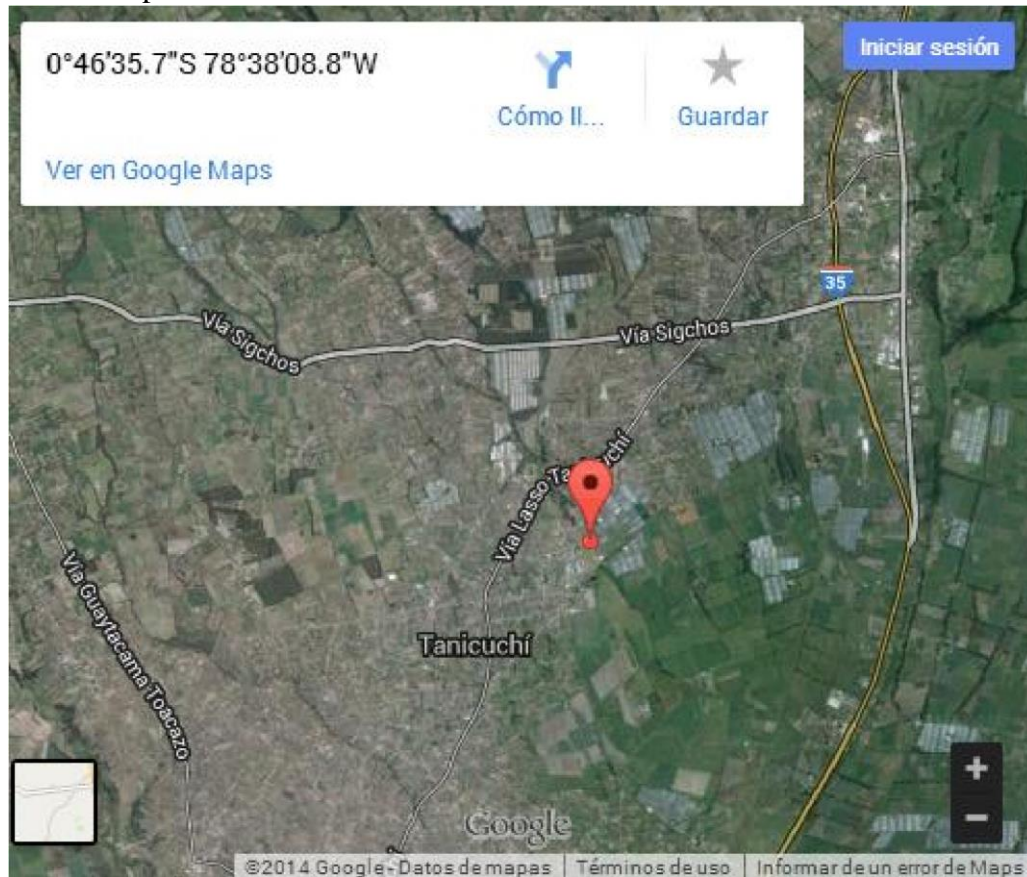


GRÁFICO N° 1 Tomado de google datos de mapas

Fuente: Google maps.

2.6. Diseño metodológico 2.6.5.

Tipo de investigación

2.6.5.1. Metodología y Técnica

La investigación propuesta es experimental ya que manipula variables en un diseño experimental, realizando la aplicación de la cepa *Rhizobium* en 3 concentraciones en dos tiempos de corte en las parcelas, con el fin de describir los resultados y conclusiones que podemos obtener, pudiendo describirlos en los resultados de la investigación.

2.6.6. Método

2.6.6.1. Experimental

Al realizar la investigación en el tema establecido permitirá tomar datos como por ejemplo de la altura o del rendimiento del cultivo, llegando a distintas conclusiones como: cuál de las concentraciones es la mejor dosis de aplicación del *Rhizobium* y pudiendo realizar pruebas de significación como Tukey al 5 %.

2.6.7. Técnica

2.6.7.1. Observación

En el proceso de esta investigación se toma en cuenta la observación para mirar atentamente el fenómeno, hecho o caso, tomar información y registrar para su posterior análisis y así poder obtener una mayor eficiencia en los datos.

2.6.7.2. Fichaje

El fichaje se utilizará como técnica auxiliar de la observación ya que esta nos ayudara a registrar los datos tomados durante todo el proceso de la investigación, creando así las fichas de datos del cultivo.

2.7. Unidad experimental

3 Descripción de la unidad experimental

Unidad experimental	4 unidades por repetición, con un total de 16 unidades en todo el ensayo.
Unidad experimental neta	1 m ²
Área	6,86 m ² para cada unidad (2 m x 3,43 m) considerando los 0,50 m de camino entre los tratamientos y las repeticiones.
Área total del experimento	112.01 m ²

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

2.8. Factores en estudio

2.8.5. A: tres concentraciones

- C1: 5×10^6 UFC/l de *Rhizobium*
- C2: 5×10^8 UFC/l de *Rhizobium* □
- C3: 5×10^9 UFC/l de *Rhizobium*

2.8.6. B: dos cortes

- D1: Primer Corte
- D2: Segundo Corte

2.8.7. Tratamientos

- Los tratamientos del ensayo resultan de la combinación de las concentraciones y de los dos tiempos de corte que se presentan en el Cuadro 4.

CUADRO N° 4 Tratamientos a aplicarse en la EVALUACIÓN DE UNA CEPA COMERCIAL DE *Rhizobium* EN ALFALFA (*Medicago sativa*) A TRES CONCENTRACIONES DE APLICACIÓN Y EN DOS TIEMPOS DE CORTE, EN LA PARROQUIA TANICUCHI, CANTÓN LATACUNGA. 2015.

PRIMER CORTE		
Tratamientos	Nomenclatura	Interacciones
t0	Testigo	Dosis 0 de aplicación de <i>Rhizobium</i>
t1	R1C1	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^9 UFC/l de <i>Rhizobium</i>
t2	R1C2	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^8 UFC/l de <i>Rhizobium</i>
t3	R1C3	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^6 UFC/l de <i>Rhizobium</i>
SEGUNDO CORTE		
Tratamientos	Nomenclatura	Interacciones
t0	Testigo	Dosis 0 de aplicación de <i>Rhizobium</i>
t1	R1C1	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^9 UFC/l de <i>Rhizobium</i>
t2	R1C2	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^8 UFC/l de <i>Rhizobium</i>

CUADRO N°

t3	R1C3	Cepa de <i>Rhizobium</i> con una concentración 5×10^6 UFC/l de <i>Rhizobium</i>
----	------	--

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

2.9. Fuentes de variación (análisis del adeva)

5 Esquema de ADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	31
TRATAMIENTO	7
CONCENTRACIONES A	3
CORTES B	1
A x B	3
REPETICIONES	3
E. EXPERIMENTAL	21

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

2.10. Materiales y recursos

2.10.5. *Materiales de Campo*

- Tarjetas para las muestras (Etiquetas)
- Hoz
- Rociador de agua
- Flexómetro
- Pielas
- Estacas
- Libreta de campo
- Lápiz
- Guantes
- Barra

- Bailejo
- Calculadora
- Balanza
- Regla
- Letreros

2.10.6. *Material Experimental*

- Cultivo de alfalfa
- Cepa de *Rhizobium*

2.10.7. *Equipos*

- Cámara fotográfica

2.10.8. *Talento Humano*

- Autora: Peñaherrera Viviana
- Director de Tesis: Ing. Paolo Chasi

2.10.9. *Materiales de escritorio*

- Computadora
- Papel bond A4
- Internet

2.7. Operacionalización de las variables

6 Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	INDICE
1 concentraciones aplicación. 2. cortes	de Respuesta morfológica de la planta de alfalfa	número de nódulos	números
		Rebrote	unidad
		altura de la planta	Cm
		biomasa x planta	g x planta
		Rendimiento	kg x ha
		Análisis de suelo	ppm
		Análisis de Rizobios en el suelo	UFC

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

2.7.1. Variables a evaluar

DATOS A TOMAR

1. Número de nódulos: Se contabilizará después de aplicado el *Rhizobium* y de haber realizado el corte de la Alfalfa (*Medicago sativa*), en los tratamientos distintos tratamientos, en 5 plantas seleccionadas al azar.

✓ Número de nódulos en la raíz.

2. Porcentaje de rebrote: Datos registrados después de haber realizado la aplicación del *Rhizobium* en la alfalfa.

✓ Plantas que rebroten en un tiempo definido. Se realizará contando las plantas que rebroten en los distintos tratamientos relacionando con una regla de tres con el número plantas totales, multiplicado por el 100%.

3. Biomasa: Se tomará datos al pesar 10 plantas al azar con una balanza al momento del corte.

✓ (1) Kilogramos por planta.

4. Altura de planta (cm): Se registrará la altura en el momento de realizar el corte del cultivo utilizando una regla en centímetros de 10 plantas al azar.

5. Rendimiento (kg x ha): Se tomará datos de rendimiento por hectárea, midiendo 1 m² de la parcela para multiplicarlo por los 10000m² que tiene una hectárea.

2.8. Manejo específico de la investigación.-

2.8.1. Análisis de suelo

Se realizará este análisis al inicio, y al final de la investigación, para determinar el estado y la variación de nutrientes, pH, materia orgánica con los que cuenta el suelo, para esto se utilizará aproximadamente un kilogramo de muestra del suelo.

2.8.2. Análisis de Rizobios

CUADRO N°

Se realizara el análisis de la concentración de Rizobios en el suelo, para verificar su variación con la aplicación de la cepa, este análisis será realizado en el laboratorio con una muestra de una planta y la rizosfera de la misma.

2.8.3. Concentraciones de las cepas de Rhizobium

Las concentraciones de las cepas serán realizadas de acuerdo a las concentraciones de UFC propuestas en el ensayo, bajando la concentración de la misma aplicando dos litros de agua destilada a un litro del producto.

2.8.4. Aplicación de las cepas de Rhizobium

Se aplicará por medio de un rociador de agua con la cepa en sus tres concentraciones, teniendo en cuenta que se requiere de 1 a 3 litros por hectárea y un 65 % de humedad en el suelo para la aplicación de esta bacteria. En cada tratamiento se utilizó 2,1 cm³ de *Rhizobium* y 140 cm³ de agua.

2.8.5. Registro de % de rebrote de la alfalfa

El porcentaje de rebrote se tomará a los 7 y a los 14 días los datos de % de rebrote que tiene la alfalfa, esto se realizara contabilizando el número de plantas totales del tratamiento y relacionando con las que rebrotan en los días de la toma de datos con una regla de tres y multiplicado por 100 para sacar el %.

2.8.6. Registro de la altura de la planta

Se registrara la altura antes de realizar el corte del cultivo utilizando una regla en centímetros, en 10 plantas al azar de la parcela neta fuera del efecto de borde.

2.8.7. Biomasa por planta

Se tomará datos al pesar 10 plantas al azar de la parcela neta con una balanza al momento del corte en las unidades de kilogramo por planta, estas estarán fuera del efecto de borde.

2.8.8. Corte de la alfalfa

Se realizará el corte de la alfalfa a los 30 días de aplicadas las distintas concentraciones de la cepa de *Rhizobium*.

2.8.9. Rendimiento

Se tomará datos de rendimiento, esta evaluación utilizando un 1 m² de cada tratamiento multiplicando este peso en kg por los 10 000m² que tiene una hectárea.

2.8.10. Registro del número de nódulos en las plantas al azar

Se contabilizará después del corte los datos del número de nódulos de 5 plantas tomadas al azar.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Porcentaje de rebrote a los 7 días

CUADRO N° 7 ADEVA para el indicador porcentaje de rebrote a los 7 días para la Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.

F.V.	SC	GL	CM	F	Valor p	
A	251,84	3	83,95	0,78	0,5157	ns
B	16065,28	1	16065,28	150,22	<0,0001	*
A*B	306,59	3	102,2	0,96	0,4319	ns
R	674,34	3	224,78	2,1	0,1305	ns
Error	2245,91	21	106,95			
Total	19543,97	31				
CV%	17,69					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 7 Se observa que el análisis de varianza para el indicador Rebrote a los 7 días de la aplicación del *Rhizobium*, muestra que si existe significación estadística para el factor tiempo de corte, mientras que para los factores concentraciones, repeticiones y las interacciones (concentraciones * tiempos de corte) no presenta significancia estadística.

El coeficiente de variación fue CV% = 17,69

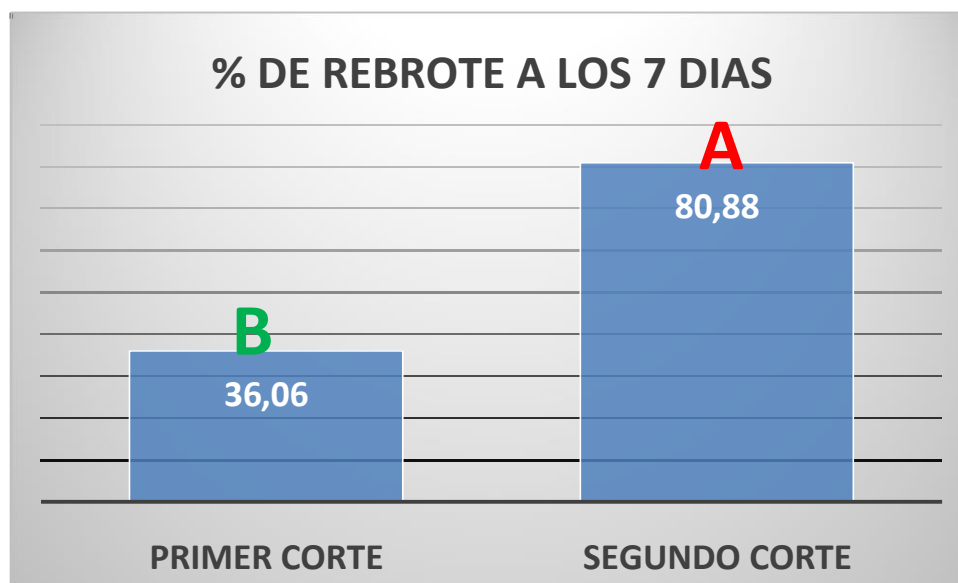


GRÁFICO N° 2 Porcentaje de rebrote a los 7 días **Elaborado**

por: Viviana M. Peñaherrera P.

3.2. Porcentaje de Rebrote a los 14 días

CUADRO N° 8 ADEVA para el indicador porcentaje de rebrote a los 14 días para la Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.

F.V.	SC	GL	CM	F	Valor p	
A	283,13	3	94,38	0,69	0,5671	Ns
B	924,5	1	924,5	6,78	0,0166	*
A*B	12,25	3	4,08	0,03	0,9928	Ns
R	3166,38	3	1055,46	7,74	0,0011	*
Error	2863,63	21	136,36			
Total	7249,88	31				
CV%=	13,67					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 8 Se observa que el análisis de varianza para el indicador Rebrote a los 14 días de la aplicación del *Rhizobium*, muestra que si existe significación estadística para los factores tiempos de corte y repeticiones, mientras que para el factor concentraciones, e interacciones (concentraciones * tiempos) de corte no presenta significancia estadística.

El coeficiente de variación fue $CV\% = 13,67$

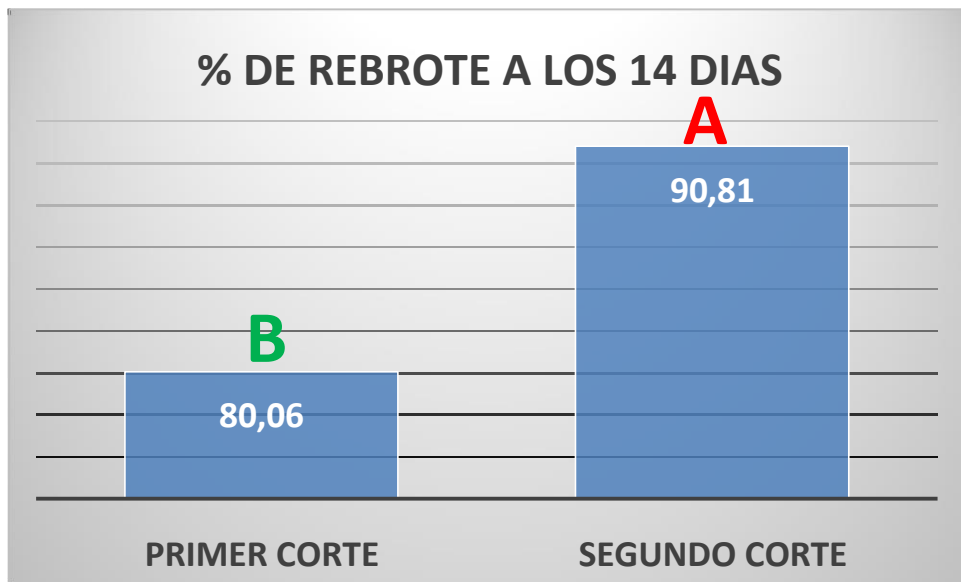


GRÁFICO N° 3 Porcentaje de rebrote a los 14 días

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Como se puede observar en el grafico 2 y 3 el mayor porcentaje de rebrote se obtuvo en el segundo corte, por lo que se puede cuantificar un efecto favorable en la aplicación de los tratamientos, ya que estos incrementan la movilidad y absorción de nitrógeno en el vegetal en estudio con un resultado promedio de rebrote a los 7 días de 87,10% y 97,18% a los 14 días. Lo que corrobora con (Richardson, 2001), es la forma de acción más común que influye en la promoción del crecimiento vegetal por las rizobacterias, al incrementar el aprovechamiento de los nutrientes por la planta hospedera.

3.3. Altura de la planta

9 ADEVA para el indicador altura de la planta para la evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la parroquia Tanicuchi, cantón Latacunga.

2015.

F.V.	SC	GL	CM	F	Valor p	
A	83,23	3	27,74	1,51	0,2423	Ns
B	1230,08	1	1230,08	66,74	<0,0001	*
A*B	6,41	3	2,14	0,12	0,9498	ns
R	70	3	23,33	1,27	0,3117	ns
Error	387,07	21	18,43			
Total	1776,79	31				
CV%	8,5					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 9 Se observa que el análisis de varianza para el indicador Altura de la planta, muestra que si existe significación estadística para el factor tiempos de corte, mientras que para los factores concentraciones, repeticiones, e interacciones (concentraciones * tiempos de corte) no presenta significancia estadística.

El coeficiente de variación fue CV% = 8,5

CUADRO N°

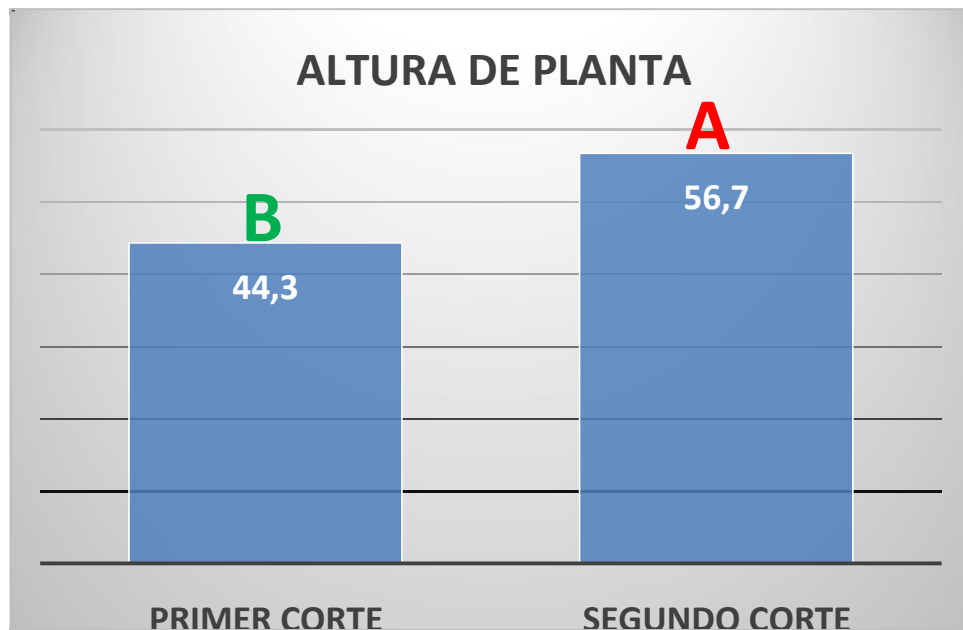


GRÁFICO N° 4 Altura de planta

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

Como se puede apreciar en el grafico 4 en lo que se refiere a la altura de la planta el mejor resultado se dio en el segundo corte, lo que demuestra la efectividad en la aplicación del rhizobium, ya que este con la FBN ayudo al crecimiento vegetativo de la planta teniendo una altura promedio de 56,70 cm. Lo que coincide con (Hernández, 2002) El N absorbido del suelo o fijado del aire, se incorpora primariamente en las hojas en forma de aminoácidos. A medida que la cantidad de N es mayor, las proteínas sintetizadas a partir de los aminoácidos aumenta el crecimiento de la planta incrementando la superficie fotosintética.

3.4. Biomasa por planta

10 ADEVA para el indicador porcentaje de biomasa por planta para la Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.

F.V.	SC	GL	CM	F	Valor p	
A	87,59	3	29,2	0,33	0,8036	Ns
B	700,32	1	700,32	7,92	0,0104	*
A*B	45,15	3	15,05	0,17	0,9153	Ns
R	985,61	3	328,54	3,72	0,0274	*
Error	1856,76	21	88,42			
Total	3675,43	31				
CV%	22,99					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 10 Se observa que el análisis de varianza para el indicador biomasa por planta, muestra que si existe significación estadística para los factores tiempos de corte y repeticiones, mientras que para los factores concentraciones, e interacciones (concentraciones * tiempos de corte) no presenta significancia estadística.

El coeficiente de variación fue $CV\% = 22,99$

CUADRO N°

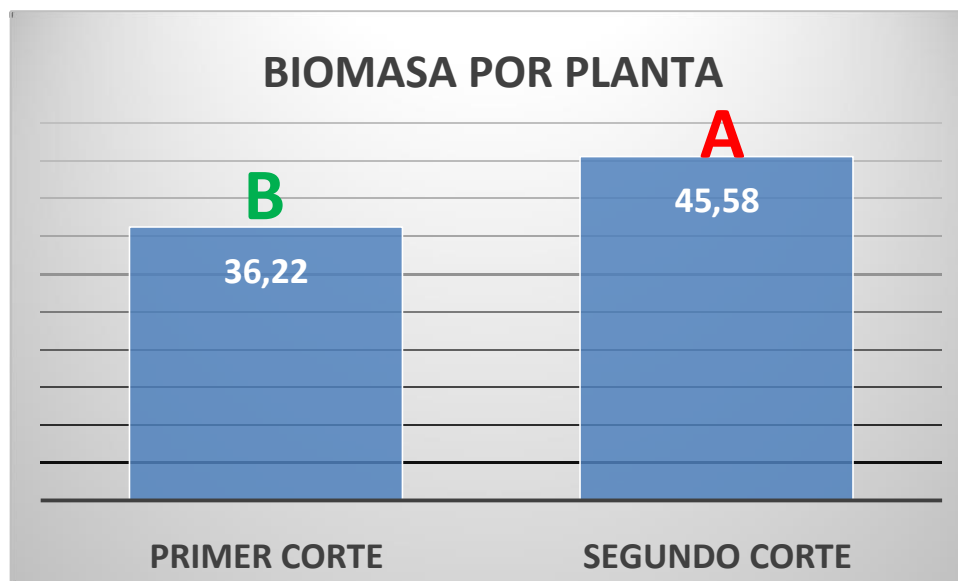


GRÁFICO N° 5 Biomasa por planta

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

En el grafico 5 podemos observar que en el segundo corte se obtuvo un mayor peso en lo que se refiere a biomasa por planta, esto quiere decir que la simbiosis entre el *Rhizobium* y la Alfalfa tiene un efecto positivo ya que esta ayuda a obtener un mejor rendimiento teniendo una biomasa promedio de 45,58 g. Lo que se puede corroborar con (TAIRUAN, y otros, 2002) La simbiosis rizobiana contribuye con grandes cantidades de nitrógeno a la planta, teniendo una importancia significativa en el rendimiento y la mayor producción del cultivo.

3.5. Número de nódulos de la raíz

11 ADEVA para el indicador número de nódulos en la raíz para la Evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte en la Parroquia Tanicuchi, Cantón Latacunga. 2015.

F.V.	SC	GI	CM	F	Valor p	
A	599,01	3	199,67	13,85	<0,0001	*
B	301,35	1	301,35	20,91	0,0002	*
A*B	196,41	3	65,47	4,54	0,0132	*
R	144,85	3	48,28	3,35	0,0385	*
Error	302,66	21	14,41			
Total	1544,29	31				
CV%	21,49					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 11 Se observa que el análisis de varianza para el indicador Número de nódulos de la raíz, muestra que si existe significación estadística para todos los factores del ensayo: tiempos de corte, concentraciones, repeticiones, e interacciones (concentraciones * tiempos de corte).

El coeficiente de variación fue CV% = 21,49

CUADRO N°

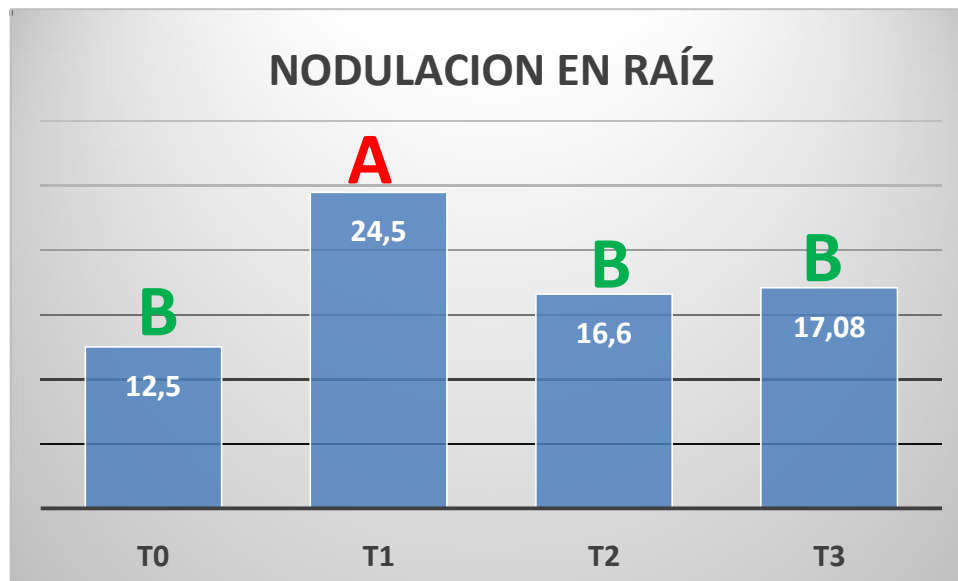


GRÁFICO N° 6 Nodulación en la raíz de acuerdo a los tratamientos (concentraciones)

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

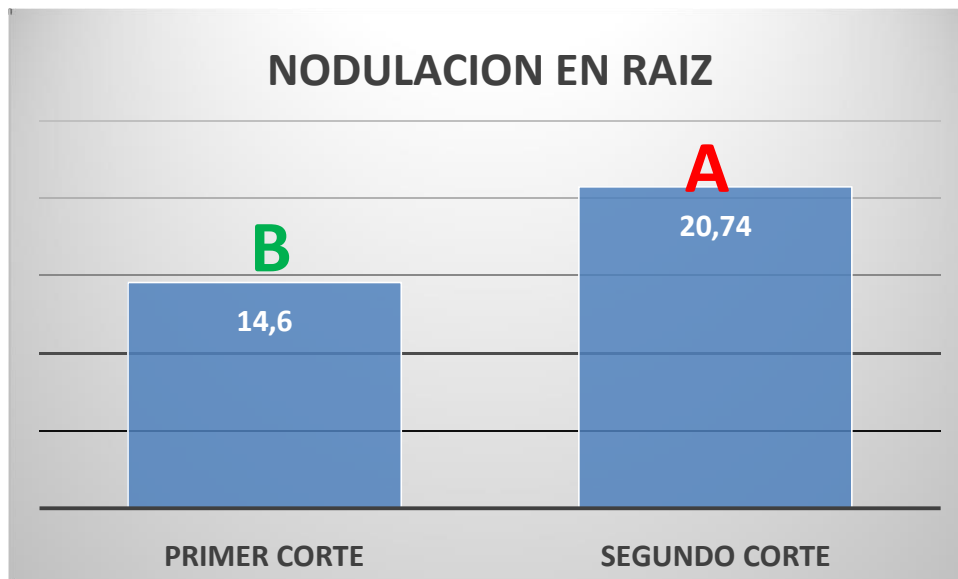


GRÁFICO N° 7 Nodulación en la raíz de acuerdo a los tiempos de corte

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

En el grafico 6 podemos observar que el mejor tratamiento se obtuvo con el tratamiento 1 en el cual se aplicó una concentración de 1×10^9 UFC/lit y en el grafico

7 se puede observar que el mejor resultado se obtuvo en el segundo corte después de

los tratamientos aplicados teniendo un valor de 31,75 nódulos en promedio entre la interacción, por lo cual se puede decir que la cepa de rhizobium que se aplicó en sus distintas concentraciones es efectiva ya que se pudo evidenciar una mayor nodulación en la raíz. Lo que corrobora con (Hoben, y otros, 1994) La rapidez de nodulación y una mayor formación de biomasa nodular es una característica importante en una cepa de rizobio ya que indica potencial de eficiencia de N₂.

3.6. Rendimiento

CUADRO N° 12 ADEVA para rendimiento del cultivo para la evaluación de una cepa comercial de *Rhizobium* en alfalfa (*Medicago sativa*) a tres concentraciones de aplicación y en dos tiempos de corte.

F.V.	SC	Gl	CM	F	Valor p	
A	56627,59	3	18875,86	1,04	0,3957	ns
B	234441,28	1	234441,28	12,91	0,0017	*
A*B	54898,84	3	18299,61	1,01	0,4091	ns
R	94582,59	3	31527,53	1,74	0,1904	ns
Error	381463,16	21	18164,91			
Total	822013,47	31				
CV%	36,4					

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

Del Cuadro N° 12 Se observa que el análisis de varianza para el indicador rendimiento, muestra que si existe significación estadística para el factor tiempos de corte mientras que para los factores concentraciones, repeticiones, e interacciones (concentraciones * tiempos de corte) no presenta significancia estadística.

El coeficiente de variación fue CV% = 36,4

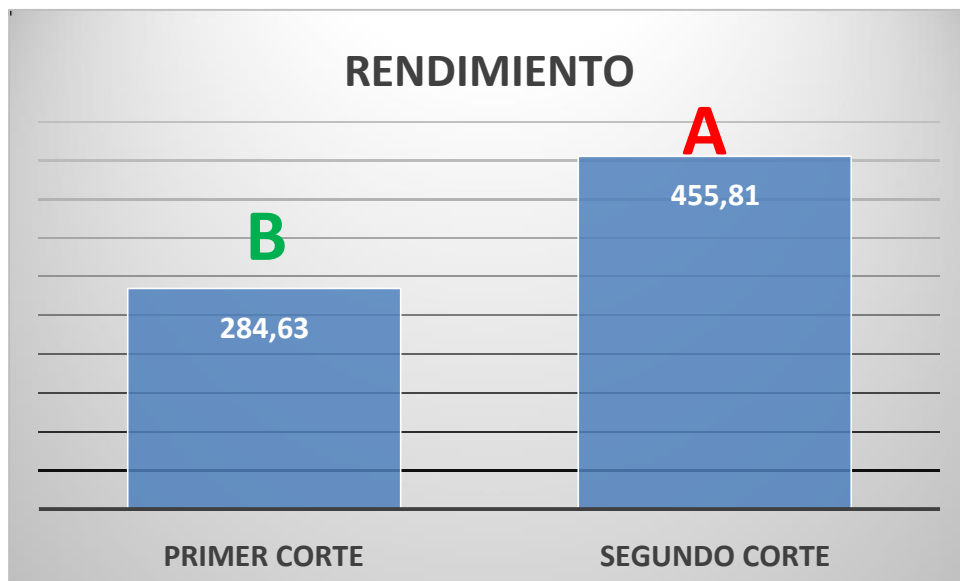


GRÁFICO N° 8 Rendimiento

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

En el grafico 8 podemos evidenciar que en el segundo corte tiene un mejor rendimiento por hectárea de la alfalfa lo que evidencia que el N absorbido por la planta ayudo a un mayor desarrollo foliar obteniendo un valor de 4558,13 kg/ha. Lo que coincide con (TAIRUAN, y otros, 2002) La simbiosis rizobiana contribuye con grandes cantidades de nitrógeno a la planta, teniendo una importancia significativa en el rendimiento y la mayor producción del cultivo.

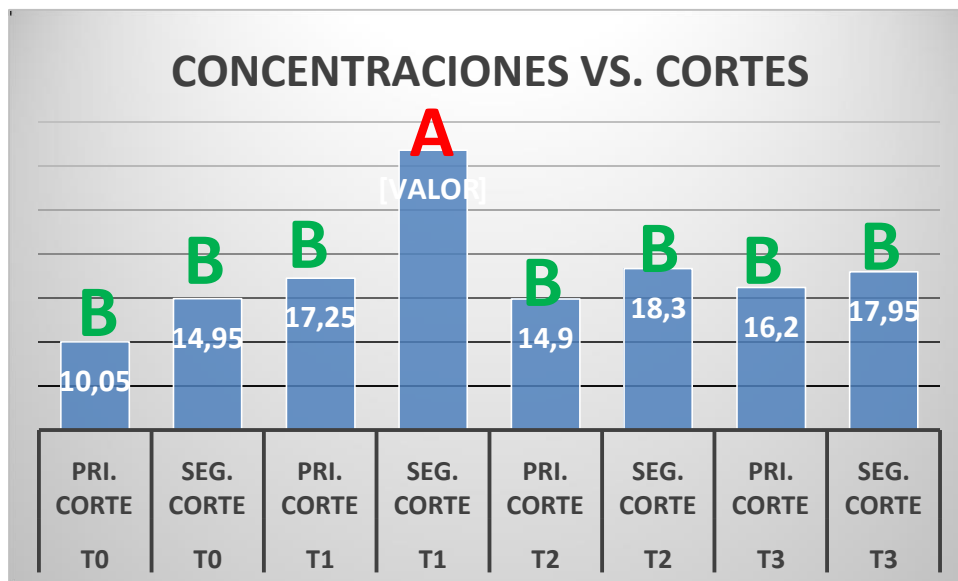


GRÁFICO N° 9 Concentraciones versus cortes

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

En el gráfico 9 se puede observar los cortes en interacción con los tratamientos para lo cual se puede decir que el mejor resultado del ensayo realizado en la alfalfa se obtuvo en la aplicación del T1 (1×10^9 UFC/lit) y en el segundo corte luego de la aplicación de los tratamientos. Lo que corrobora con:

(Hoben, y otros, 1994) La rapidez de nodulación y una mayor formación de biomasa nodular es una característica importante en una cepa de rizobio ya que indica potencial de eficiencia de N_2 .

(Niklas, 2008) El N es un nutriente esencial para la producción agrícola, con incidencia en el crecimiento de los cultivos en su rendimiento, tamaño de los granos, contenido de proteínas y absorción de otros nutrientes como el fósforo y el potasio.

3.7. Análisis de suelo

CUADRO N° 13 Análisis de suelo realizado al inicio y al final del ensayo.

análisis de suelo	N	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B	pH	MO
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	Ppm		%
Inicial	30	33	4,4	10	86	14,4	1,9	4,9	31	1	0,5	7,41	1,4
Final	25	10	10	6	50	12	2,3	6,5	67	4,5	4,9	7,29	1,3

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

El cuadro 14 son los resultados de los análisis de suelo realizados al inicio y al final del ensayo en el que se puede observar los nutrientes del suelo y a la vez el consumo del N, en mayor cantidad P y Ca y en menor cantidad K, Mg, lo que corrobora (Niklas, 2008) El N es un nutriente esencial para la producción agrícola, con incidencia en el crecimiento de los cultivos en su rendimiento, tamaño de los granos, contenido de proteínas y absorción de otros nutrientes como el fosforo y el potasio.

3.8. Análisis de rizobios

CUADRO N° 14 Análisis de rizobios del suelo realizado al inicio y al final del ensayo

Análisis Rhizobium del suelo	Inicial	Final
UFC rizobios	1,65x 10 ⁵	3,2x10 ⁸
N° de nódulos	18	250

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P.

El cuadro 15 se puede observar los análisis realizados al inicio y al final del ensayo en lo que se refiere a UFC en la rizosfera de la planta y número de nódulos de la raíz de la

planta de la alfalfa, en este se puede evidenciar un aumento tanto en las concentraciones de UFC de rizobios como en el número de nódulos presentes en la raíz de la planta, esto se debe a que la bacteria aplicada en el ensayo tuvo un buen proceso de infección de la planta. Lo que corrobora con (Hoben, y otros, 1994) La rapidez de nodulación y una mayor formación de biomasa nodular es una característica importante en una cepa de rizobio ya que indica potencial de eficiencia de N₂.

3.9. Análisis económico

CUADRO N° 15 Análisis económico

	CEPA	APLICACIÓN		INGRESOS		
		N		TOTAL DE	POR	BENEFICO
				CORTE		
				GASTOS		
					VENTA	
T0	0	0	10	10	14	4
T1	0,2	5	10	15,2	10	-5,2
T2	0,25	5	10	15,25	8	-7,25
T3	0,3	5	10	15,3	6	-9,3

Elaborado por: Viviana M. Peñaherrera P

Conclusiones

- El mejor resultado en el ensayo en cuanto a la mejor concentración se dio en la aplicación del tratamiento T1 que fue aplicado una concentración 1×10^9 UFC/lt obteniendo los siguientes resultados: % de rebrote a los 7 días de 90,79, % de rebrote a los 14 días 95,15, altura de planta de 57,58cm, biomasa por planta de 46,23 g, número de nódulos 31,75 y para rendimiento 3567,50 kg/ha.
- En las tabulaciones de los datos se puede observar que el mejor resultado se obtuvo en el segundo corte realizado teniendo un incremento en los resultados de los datos tomados durante el primer y el segundo corte teniendo los siguientes resultados: % de rebrote a los 7 días en el primer corte 38,58 y en el segundo corte un % de 87,10, para % de rebrote a los 14 días en el primer corte un valor de 85,99 % y para el segundo corte 97,18%, altura de planta en el primer corte 44,30 cm y en el segundo corte 56,70cm, biomasa por planta para el primer corte 36,22g y para el segundo corte 45,58g, numero de nódulos en el primer corte 14,60 y en el segundo corte 20,74, para rendimiento en el primer corte 2846,25 kg/ha y para el segundo corte 4558,13 kg/ha.
- Se pudo determinar que la mejor interacción entre los tratamientos y los cortes se obtuvo entre el tratamiento T1 (1×10^9 UFC/lt) y en el segundo corte realizado obteniendo como resultado para % de rebrote a los 7 días un valor de 90,79% superando a T0 con un % de 88,65; para % a los 14 días T1 da un valor de 95,15 % a diferencia de T0 que da un valor de 99,37% superando a T1 en rebrote, para altura de plantas T1 obtiene 57,58 cm en las plantas evaluadas, y T0 (57,77 cm) sobrepasando a T1; para la variable Biomasa T1 alcanza un valor de 46,23 g en promedio de las plantas, T0 tiene un promedio de 48,63 g. superando este valor a T1, en cuanto a número de nódulos en la raíz el promedio de T1 es 31,75 por planta a diferencia de T0 que da como resultado 14,95; para rendimiento T1 tiene un valor de 3567,50 Kg/ha sobresaliendo el T0 con un valor 5700,00 Kg/ha. .
- En el análisis económico se puede observar que el mejor tratamiento fue T0 debido a que su valor de beneficio fue de \$ 4,00 con un rendimiento de 3030,00 kg/ ha.

- La cepa comercial de *Rhizobium* no influye en el rendimiento de la alfalfa, las concentraciones de *Rhizobium* no influyen en el rendimiento de la alfalfa.

Recomendaciones

- Se recomienda la aplicación del *Rhizobium* en una mayor concentración de UFC, en el ensayo realizado este muestra un evidente aumento en lo que se refiere a nodulación de la raíz de la alfalfa debido a la simbiosis entre la planta y la bacteria aumentando la actividad de FBN.

- La aplicación de esta bacteria se debe realizar en suelos con una cantidad mínima de materia orgánica debido a que al existir una mayor cantidad de materia orgánica la planta satisface sus necesidades nutritivas y no realiza simbiosis con la bacteria.
- Se reduce en un 50% la aplicación de fertilizante nitrogenado con un menor costo y con una tecnología amigable para el ambiente y compatible con el manejo agroecológico.

GLOSARIO

Alfalfa: es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas o leguminosae.

Eutrofización: es aquel ecosistema o ambiente caracterizado por una abundancia anormalmente alta de nutrientes.

FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno.

Forrajera: hierba de la que los animales se alimentan, especialmente la que el ganado come en el mismo terreno donde se cría

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Longevidad: En general tiene que ver con la duración de vida de un ser humano o de un organismo biológico y se utiliza con más frecuencia en referencia a la ancianidad o la edad de un ser vivo.

Mejoramiento genético: es el arte y la ciencia de incrementar el rendimiento o productividad, la resistencia o tolerancia a agentes bióticos y abióticos adversos, el rango de adaptación de las especies animales y vegetales domésticas o la belleza y calidad de sus productos, por medio de modificaciones del genotipo (la constitución genética) de los individuos.

Nodulinas: son polipéptidos sintetizados específicamente durante las fases de desarrollo del nódulo.

Nódulos: agrupación de bacterias fijadoras de nitrógeno, en las raíces de Fabaceae (leguminosas).

Reposo invernal: Es su mecanismo de defensa ante unas condiciones adversas: mucho frío y poca luz.

Rhizobium: es un género de bacterias gram-negativas del suelo que fijan nitrógeno atmosférico.

Rizobios: son bacterias del perfil de suelo que fijan nitrógeno diazotrófico después de haberse establecido endosimbióticamente dentro de nódulos radiculares de las leguminosas (Fabaceae).

Siembra al voleo: método de siembra directa en el que se intenta que las semillas se distribuyan lo más uniformemente posible sobre todo el terreno.

Simbiontes: organismos involucrados en la simbiosis.

Simbiosis: se aplica a la interacción biológica, a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

BIBLIOGRAFIA:

AID, Centro regional de ayuda técnica. 1979. *Manual de fertilizantes.* 1979. 292.

Andrade, F, y otros. 1996.. *Requerimientos de nitrógeno y fósforo de los cultivos de maíz, girasol y soja.* 1996.

- Baca, B, Soto, L y Pardo, M. 2000.** *Fijación biológica de nitrógeno. Elementos.* . 2000.
- Benítez, A. 1986.** *Pastos y forrajes. Universitaria. Universidad Central del Ecuador.* 1986. 356.
- Bioseborgnics. 2016.** *descripcion cepa de rhizobium.* 2016.
- Bordeleau, L.M. y Prevost, D. 1994.** *Nodulación y la fijación de nitrógeno en ambientes extremos.* 1994.
- Botanical. 2010.** Beneficios de la alfalfa. [En línea] 2010. <http://www.botanicalonline.com/medicinalsalfalfa.htm>.
- Brewin, N. J. 2004.** *Planta de remodelación de la pared celular en la simbiosis Rhizobium leguminosa.* 2004.
- Brockwell, JPJ, Bottomley y Thies, JE. 1995.** *La manipulación de rhizobiamicroflora para mejorar la productividad de las leguminosas y la fertilidad del suelo: una evaluación crítica. Planta y suelo.* 1995. 180.
- Burns, R. C. y Hardy, R.W.F. 1975.** *La fijación de nitrógeno en bacterias y plantas superiores. Berlín, Alemania: Springer Verlag.* 1975. 189.
- Carlson, R., Price, N y Stacey, G. 1994.** *La biosíntesis de la señal de nodulación de moléculas lipooligosacaridos de Rhizobium.* 1994.
- Chianu, JN, y otros. 2011.** *la fijación de nitrógeno .Biological y los factores socioeconómicos para la producción de leguminosas en África .* 2011.
- D'Haese, W. y Holsters, M. 2002.** *Estructuras de factores Nod, las respuestas, y la percepción.* 2002.
- Fernández C, M. 2003.** *Manual de nodulación.* s.l. : Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 2003.

- Florian. 2007.** Producción y manejo de pasturas. . [En línea] 2007. <http://www.produccion-animal.com.ar/produccionymanejodepasturas.pdf>.
- Frink, C. R. 1999.** *El fertilizante nitrogenado: retrospectiva y perspectiva.* 1999.
- González, N. 2002.** *Algunos elementos de juicio para interpretar el fenómeno de la nodulación en soja.* . 2002.
- Grijalva, J. 1995.** *Producción y utilización de pastizales en la región interandina del Ecuador.* . Quito, Ecuador. : s.n., 1995. 540 p..
- grupo, Kimitec. 2013.** AGROCODE- Bacterias fijadoras de Nitrógeno. [En línea] 2013. http://www.agrocode.com/es/productos/biofertilizantes/nitrocode_rb_es.php.
- Hernández, G. R. 2002.** Nutrición mineral en plantas. Universidad de los Andes Merida- Venezuela. [En línea] 2002. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral/>.
- Herridge, D. F. 2008.** *Tecnología de la inoculación de las leguminosas. En: Dilworth, MJ, James, EK, Sprent, JI, Newton, NOSOTROS (Eds.), Leguminosas fijadoras de nitrógeno SymbiosIs. Kluwer, Países Bajos.* 2008. 115.
- Hoben y Somasegaran. 1994.** *Handbook for Rhizobia. Vol 2.* New York : s.n., 1994.
- INFOAGRO. 2014.** El cultivo de la Alfalfa . [En línea] 2014. <http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa.htm>.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. 2005.** Tecnología de Producción de Alfalfa en San Luis Potosí. . [En línea] 2005. <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/>.
- Kuykendall, D., y otros. 2005.** *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática.* s.l. : Springer estadounidense, 2005.

- Lindström, k., y otros. 2010.** *La biodiversidad de mutualismo beneficioso microbehost: el caso de rizobios. Investigación en Microbiología.* 2010.
- Lodwig, EM, Hosie, AHF, Bourdes, A, y otros. 2003.** *Ciclismo amino-ácido impulsa la fijación de nitrógeno en las leguminosas - Rhizobium simbiosis. naturaleza.* 2003.
- Mahecha, L. 2002.** *El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina.* 2002.
- Mannion, A.M. 1998.** *Tendencias de futuro en la agricultura: el papel de la biotecnología. Perspectivas para la Agricultura .* 1998. 224.
- Marín, V.A., y otros. 1999.** Fijación biológica de nitrógeno: bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. [En línea] 1999. www.cnpab.embrapa.br.
- Ndakidemi, PA, y otros. 2006.** *El rendimiento y los beneficios económicos de frijol común (Phaseolus vulgaris) y la soja (Glycine max) de la inoculación en el norte de Tanzania.* 2006.
- Newton, W.E. 2000.** *La fijación de nitrógeno en perspectiva. .* 2000.
- Niklas. 2008.** *Carbon/nitrogen/phosphorus allometric relation across species.* 2008.
- Oldroyd, G., Harrison, M. y Udvardi, M. 2005.** *Las conversaciones de paz y los acuerdos comerciales. Claves armonía Tolang plazo en simbiosis leguminosamicroorganismo.* 2005.
- Olivares, J. y Barea, M. 1995.** *Microorganismos del suelo en nutrición vegetal: simbiosis rhizobium-leguminosa y micorrizas .* 1995.
- Palate Criollo, Fra. 2012.** *DENSIDAD DE SIEMBRA E INOCULACIÓN DE RHIZOBIUM (Rhizobium meliloti) EN SEMILLAS DE ALFALFA (Medicago sativa, L.) EN SEMILLEROS.* 2012.

- Panter, S., y otros. 2000.** *La identificación con la proteómica de nuevas proteínas asociadas a los periplasma de la membrana de nódulos de las raíces de soja.* 2000.
- Perticari, Ing. Agr. Alejandro. 2001.** *Pastura de Alfalfa: importancia de una adecuada inoculación.* s.l. : INTA, 2001.
- Posada, R.H. 2012.** Procesos de Bioremediación. Módulo didáctico. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. [En línea] 2012. http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358025/Material_online/aspectos_de_propiedad_intelectual_y_versionamiento.html.
- Pozo, M. 1983.** *La alfalfa su cultivo y aprovechamiento.* Tercera edición. Madrid : Ediciones Mundi-prensa, 1983. 380.
- Ramírez, Bahena. 2008.** Rhizobium. [En línea] 2008. <http://es.wikipedia.org/wiki/Rhizobium>.
- Raven, Peter H. 2013.** Biodiversity Heritage Library. [En línea] 2013. http://es.wikipedia.org/wiki/Medicago_sativa#Taxonom.C3.ADa.
- Richardson, A.E. 2001.** *Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants.* 2001.
- RODRIGUEZ, M. y GONZALEZ, M. y FERRERA, R. 1993.** *Manual de Agromicrobiología.* s.l. : Trillas, 1993.
- Shabaev, V., y otros. 1996.** *La influencia de diversos Rhizobium meliloti cepas sobre la masa de alfalfa y de la acumulación de nitrógeno en el fondo de nitrógeno mineral.* 1996.
- Singh, BB, y otros. 2003.** *Improvizar la producción y utilización de caupí como alimento y forraje.* 2003.
- Socolow, R. H. 1999.** *Gestión del nitrógeno y el futuro de los alimentos: lecciones de la gestión de la energía y el carbono.* 1999.

Spaink, H.P. 1996. *Reglamento de la planta de la morfogénesis por oligosacáridos.* 1996.

Sylvia, D, y otros. 2005. *Principios y aplicaciones de la microbiología del suelo.* s.l. : Prentice Hall. Nueva Jersey, EE.UU., 2005. 644.

TAIRUAN, T. y AGUILAR, O. and FABRA, A. 2002. *Characterization of nodulation peanut rhizobia isolated from a native soil population in Cordoba, Argentina.* 2002.

—. **2002.** *Characterization of nodulation peanut rhizobia isolated from a native soil population in Cordoba- Argentina.* 2002.

Vance, C. P. 1998. *Leguminosa fijación simbiótica de nitrógeno: Aspectos agronómicos:* . 1998. 530.

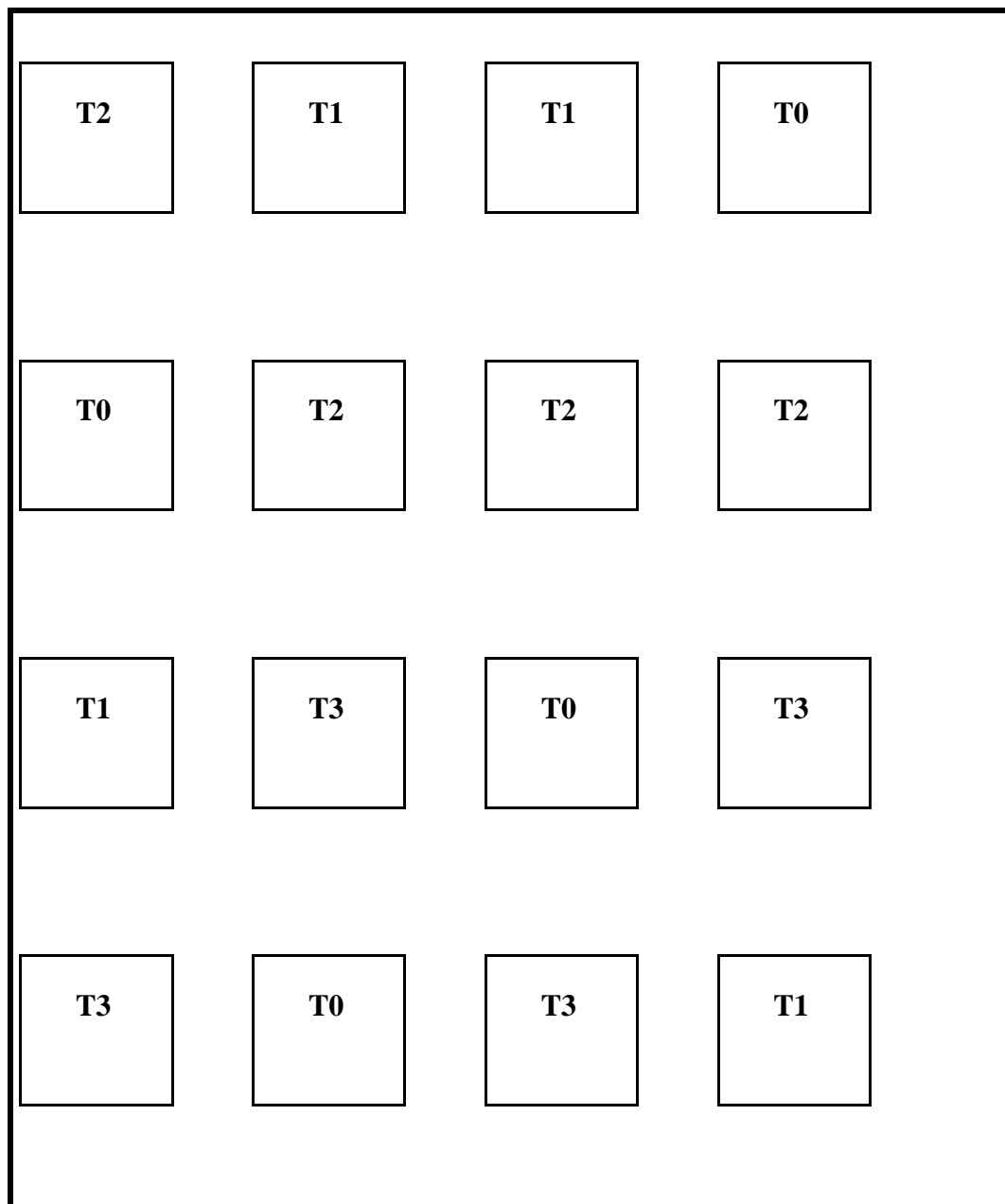
Willems, A. 2006. *La taxonomía de rizobios: una visión general.* *Planta y suelo.* 2006.

Zahran, H.H. 2001. *Rizobios de leguminosas silvestres: la diversidad, la taxonomía, ecología, fijación de nitrógeno y de biotecnología.* . s.l. : Diario de la Biotecnología, 2001.

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de los tratamientos en campo





Anexo 2. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 7 días en el primer corte.

(%)	REPETICIONES	Promedio
-----	--------------	----------

rebrote 8 días	I	II	III	IV	
T0	35,90	32,47	30,86	26,51	31,43
T1	39,18	37,00	47,42	45,33	42,23
T2	53,39	34,41	45,00	49,35	45,54
T3	37,25	42,55	35,71	25,00	35,13
					38,58

Anexo 3. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 15 días en el primer corte.

rebrote 15 días	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	79,49	80,52	93,83	98,80	88,16
T1	79,38	91,00	79,38	77,33	81,77
T2	94,07	72,04	91,25	96,10	88,37
T3	98,04	98,94	75,51	70,19	85,67
					85,99

Anexo 4. Promedios para resultados, altura de planta en el primer corte.

Altura de planta	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	42	50,4	47,6	44,6	46,15
T1	45,5	42,3	36,9	52,3	44,25
T2	39,35	38,4	45,5	45,1	42,09
T3	40,1	44,1	51,7	43	44,73
					44,30

Anexo 5. Promedios para resultados, biomasa por planta en el primer corte.

biomasa por planta	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	25,7	49,6	37	39,9	38,05

T1	24,9	32,7	33,7	51,1	35,60
T2	17,4	27,7	47,9	47,7	35,18
T3	28,2	41,1	43,3	31,6	36,05
					36,22

Anexo 6. Promedios para resultados, número de nódulos en la raíz en el primer corte.

n° de nódulos en raíz	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	9,4	14,2	8,6	8	10,05
T1	13,2	16,2	19,8	19,8	17,25
T2	10,4	20,4	17,8	11	14,90
T3	13	24,8	11,2	15,8	16,20
					14,60

Anexo 7. Promedios para resultados, rendimiento por hectárea en el primer corte.

rendimiento	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	1970	4650	3000	2500	3030,00
T1	4540	1750	2870	2490	2912,50
T2	2590	2110	2910	1560	2292,50
T3	1590	3520	4490	3000	3150,00
					2846,25

Anexo 8. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 7 días en el segundo corte.

(%) rebrote 8 días	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	85,47	92,21	92,59	84,34	88,65
T1	89,69	85,00	93,81	94,67	90,79
T2	77,97	82,80	78,75	98,70	84,55

T3	69,61	90,43	77,55	100,00	84,40
					87,10

Anexo 9. Promedios para resultados, porcentaje de rebrote a los 15 días en el segundo corte.

rebrote 15 días (%)	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	100,0	98,7	98,8	100,0	99,37
T1	97,9	100,0	100,0	82,7	95,15
T2	99,2	98,9	100,0	96,1	98,55
T3	99,0	100,0	100,0	83,7	95,67
					97,18

Anexo 10. Promedios para resultados, altura de planta en el segundo corte.

Altura de planta	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	55,3	60,35	59,44	56	57,77
T1	58,2	57,02	52,61	62,49	57,58
T2	52,68	53,58	54,27	53,4	53,48
T3	51,61	57,78	66,07	56,45	57,98
					56,70

Anexo 11. Promedios para resultados, biomasa por planta en el segundo corte.

biomasa por planta	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	43,2	62,8	40,7	47,8	48,63
T1	38,1	55,5	39,3	52	46,23
T2	28,1	41,5	60,4	54,6	46,15
T3	45	46,6	44	29,6	41,30
					45,58

Anexo 12. Promedios para resultados, número de nódulos en la raíz en el segundo corte.

n° de nódulos en raíz	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	12,2	13,4	12,2	22	14,95
T1	30,6	32,8	28,6	35	31,75
T2	17,2	16,2	15,6	24,2	18,30
T3	16,8	18,8	12,2	24	17,95
					20,74

Anexo 13. Promedios para resultados, rendimiento por hectárea en el segundo corte.

rendimiento	REPETICIONES				Promedio
	I	II	III	IV	
T0	4050	5880	9300	3570	5700,00
T1	3850	2900	3550	3970	3567,50
T2	4520	5480	4210	4380	4647,50
T3	6430	3260	5510	2070	4317,50
					4558,13

Anexo 14. Actividades realizadas en el ensayo



Fotografía 1.- preparación de las concentraciones de *Rhizobium*



Fotografía 2.- Aplicación de las cepas de *Rhizobium*



Fotografía 3.- Registro de % de rebrote de la alfalfa



Fotografía 4.- Registro de la altura de la planta



Fotografía 5.- Biomasa por planta



Fotografía 6.- Rendimiento



Fotografía 7.- Corte de la alfalfa



Fotografía 8.- Registro del número de nódulos en las plantas al azar

Anexo 15. Análisis de suelo realizados al inicio y al final del ensayo



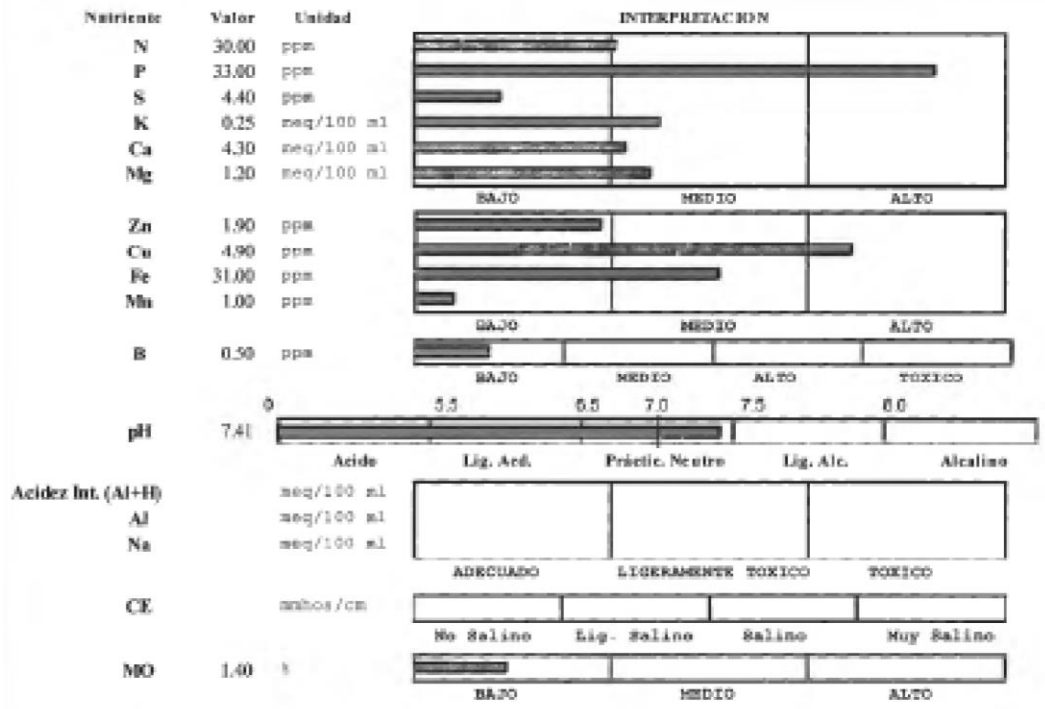
ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
 Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340
 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693



REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

<p align="center">DATOS DEL PROPIETARIO</p> Nombre : MARIO TOAQUIZA Dirección : COTOPAXI Ciudad : Teléfono : Fax :	<p align="center">DATOS DE LA PROPIEDAD</p> Nombre : Provincia : COTOPAXI Cantón : LATACUNGA Parroquia : TANIUCUCHI Ubicación :
---	--

<p align="center">DATOS DEL LOTE</p> Cultivo Actual : ALFALFA Cultivo Anterior : ALFALFA Fertilización Ant. : Superficie : Identificación : MUESTRA 1	<p align="center">PARA USO DEL LABORATORIO</p> N° Reporte : 39.050 N° Muestra Lab. : 102265 Fecha de Muestreo : 15/05/2015 Fecha de Ingreso : 15/05/2015 Fecha de Salida : 29/05/2015
--	--



Ca	Mg	Ca+Mg	(meq/100ml)	%	ppm	(%)			Clase Textural
Mg	K	K	Σ Bases	NTet	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
3,6	4,8	22,0	5,8						

RESPONSABLE LABORATORIO

LABORATORISTA



ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
 Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340
 Quito- Ecuador Telf: 690-691/92/93 Fax: 690-693



REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO

Nombre : Gustavo Tecoquiza
 Dirección : Latacunga
 Ciudad :
 Teléfono :
 Fax :

DATOS DE LA PROPIEDAD

Nombre :
 Provincia : Cotacachi
 Cantón : Latacunga
 Parroquia : Tunicuchi
 Ubicación :

DATOS DEL LOTE

Cultivo Actual : Alfalfa
 Cultivo Anterior : Alfalfa
 Fertilización Ant. :
 Superficie :
 Identificación : Muestra 2

PARA USO DEL LABORATORIO

N° Reporte : 40.444
 N° Muestra Lab. : 103942
 Fecha de Muestreo : 28/01/2016
 Fecha de Ingreso : 01/02/2016
 Fecha de Salida : 16/02/2016

Nutriente	Valor	Unidad
N	25.00	ppm
P	10.00	ppm
S	10.00	ppm
K	0.15	meq/100 ml
Ca	2.50	meq/100 ml
Mg	1.00	meq/100 ml

Zn	2.30	ppm
Cu	6.50	ppm
Fe	67.00	ppm
Mn	4.50	ppm

B	4.90	ppm
---	------	-----

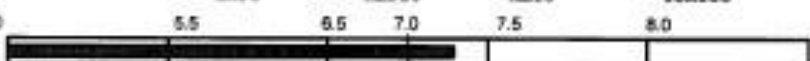
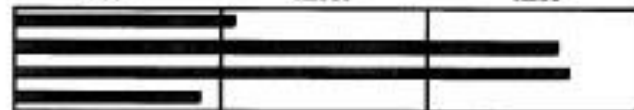
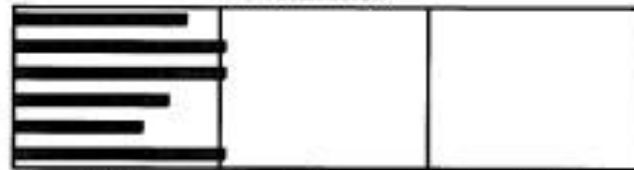
pH	7.29
----	------

Acidez Int. (Al+H)	Acidez
Al	meq/100 ml
Na	meq/100 ml

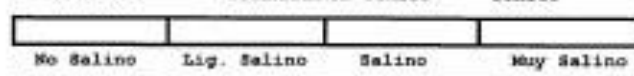
CE	mhca/cm
----	---------

MO	1.30 %
----	--------

INTERPRETACION



Acidez Lig. Ac. Práctic. Neutro Lig. Alc. Alcalino



Ca	Mg	Ca+Mg	(meq/100ml)	%	ppm	Clase Textural		
Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla
2,5	6,7	23,3	3,7					

[Signature]
RESPONSABLE LABORATORIO

[Signature]
LABORATORISTA

Anexo 16. Análisis de rizobios al inicio y al final del ensayo

 INIAP INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Panamericana sur Km. 1, Apartado 17-01-340 Telefax: 2690-694 Email: dmsasc@iniapsc.gov.ec Quito-Ecuador	
--	---	---

INFORME DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO

DATOS DEL REMITENTE			
Nombre del remitente:	Mario Toaquiza		
Empresa:	Particular		
Ubicación:	Provincia: Cotopaxi	Cantón: Latacunga	Parroquia: Taniuchi
Dirección:	Taniuchi, río Blanco		Teléfono/s-
			0987898535/ 2718167
			E- mail
	Eric_Jobo19@hotmail.com		

LOCALIZACIÓN DEL SITIO MUESTREADO Y CULTIVO

Ubicación:	Provincia: Cotopaxi	Cantón: Latacunga	Parroquia: Taniuchi	Altitud: 2380 msnm
Cultivo	Avena alfalfa		Edad: 1.5 años	

Identificación de la muestra	POBLACIONES DE MICROORGANISMOS					
	Bacterias	Actinomicetos	Hongos	Celulolíticos	Solubilizadores de Fósforo	Rizobios
	UFC / gss					
79				$3,99 \times 10^5$	$2,94 \times 10^4$	Actinomicetos, bacterias y hongos $1,65 \times 10^5$

UFC/gss: unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco

Observaciones: la población de rizobios del suelo es media y es similar a lo reportado por Bernal y Graham (2015), para los suelos ubicados en la provincia de Loja y Cañar.

Metodología usada: dilución serial y siembra en medios específicos de acuerdo a las metodologías descritas por Girard y Roujeux (1964), Novo y Hernández (2003) y Somasegaram y Hoben (1994), esta última es una metodología calibrada por la Universidad de la Plata, IBSM (2008).

- Siembra y aislamientos en medios de cultivo específicos.

Bacterias:	(Agar Nutritivo)
Hongos:	(Agar Rosa de Bengala)
Actinomicetos:	(Agar Caseína)
Celulolíticos:	(Agar Extracto de Suelo)
Solubilizadores de fósforo:	(Agar Ramos Cañao)
Fijadores de nitrógeno (rizobios):	(Levadura Manitol Agar + rojo congo)
- Incubación a temperatura constante por determinados periodos.



Ing. Betty Paucar S.
Investigadora Área Microbiología de Suelos

REPORTE DE ANALISIS MICROBIOLOGICO

TIPO DE MUESTRA: Muestras de suelo

FECHA DE INGRESO: 01/02/2016

EMPRESA: VIVIANA PEÑAHERRERA

METODOLOGÍA DE PROCESAMIENTO:

Las muestras de suelo fueron homogeneizadas mediante el uso de un mortero y pistilo estériles. Se preparó diluciones seriadas para la determinación de unidades formadoras de colonias de *Rhizobium* por gramo, en agar manitol extracto de levadura (YEM). Los platos inoculados fueron incubados a 26°C por 7 días.

CODIFICACION DE MUESTRAS:

BSB-1053 → Rizósfera de alfalfa. Aplicación *Rhizobium*.

BSB-1054 → Rizósfera de alfalfa. Sin aplicación.

RESULTADOS



Población de microorganismos

Código	Número total de unidades formadoras de colonias por gramo suelo (ufc/g)	Número de unidades formadoras de colonias de <i>Rhizobium</i> spp. por gramo suelo (ufc/g)	Número total de nódulos en la raíz
BSB-1053	5,4x10 ⁸	3,2x10 ⁸	250
BSB-1054	5,3x10 ⁷	2,2x10 ⁷	20

COMENTARIO

Las colonias de *Rhizobium* se identificaron en base al tamaño, forma, color y textura de la colonia. Las colonias de rizobios de rápido crecimiento generalmente son de color blanco, semi traslúcido, circular y mucilaginoso; mientras que las cepas de crecimiento lento son de color blanco, opaco, granular y circular.

FOTOGRAFÍAS

CÓDIGO	ANÁLISIS
BSB-1053	
BSB-1054	



Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D
BIOSEBORGANICS CIA. LTDA