

2ej  
57



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

RESISTENCIA A LA SEQUIA XVIII. EFECTO DE LA  
TENSION HIDRICA (SEQUIA) EN LA SIMBIOSIS  
Rhizobium phaseoli - Phaseolus vulgaris L.

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

P r e s e n t a :

**DAVID ESPINOSA VICTORIA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESISTENCIA A LA SEQUIA XVIII. EFECTO DE LA TENSION HIDRICA (SEQUIA)  
EN LA SIMBIOSIS *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* L. \*

T E S I S T A

DAVID ESPINOSA VICTORIA \*\*

\* Este trabajo forma parte del Grant No. AID/DSAN-XII-G-0261,  
BEAN/COWPEA CRSP. TITLE XII.

\*\* Becario. Centro de Botánica, Programa de Becas del Colegio de  
Postgraduados.

Esta Tesis fue realizada en las Secciones de Microbiología y Bioquímica de Suelos del Centro de Edafología y Fisiología Vegetal del Centro de Botánica del COLEGIO DE POSTGRADUADOS, bajo la dirección de los Doctores Ronald Ferrera-Cerrato y Alfonso Larqué-Saavedra.

Chapingo, México, Enero de 1986.

Parte del material que conforma la presente tesis ha sido publicado en:

Espinosa-Victoria, D.; Ferrera-Cerrato, R. y Larqué-Saavedra, A. 1985. Efecto de la sequía en la sobrevivencia y competitividad de mutantes de *Rhizobium Phaseoli* resistentes a antibióticos. Tercera Reunión Sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. Química, U.N.A.M. Resúmenes. Soc. Nal. de la Fijación Biológica del Nitrógeno. México.

Espinosa-Victoria, D.; Ferrera-Cerrato, R. and Larqué-Saavedra, A. 1985. Competition and Survival of *Rhizobium phaseoli* in water stress bean plants. VI Fixing Nitrogen International Symposium. University of Oregon. Corvallis, OR. Proceedings.

CONTENIDO

	PÁG.
I. RESUMEN . . . . .	1
II. INTRODUCCIÓN . . . . .	3
III: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA . . . . .	6
1. SEQUÍA Y ALTERACIONES MORFO-FISIOLÓGICAS EN LA PLANTA . . . . .	6
2. SIMBIÓISIS <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSA . . . . .	9
3. USO DE MUTANTES DE <i>Rhizobium</i> RESISTENTES A ANTI-BIÓTICOS EN ESTUDIOS ECOLÓGICOS . . . . .	23
4. EFECTO DE LA SEQUÍA (TENSIÓN HIDRICA) EN LA SIMBIÓISIS <i>Rhizobium</i> - LEGUMINOSA . . . . .	28
IV. OBJETIVO, HIPÓTESIS Y PREMISAS DE TRABAJO . . . . .	39
V. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	41
1. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE <i>Rhizobium phaseoli</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS . . . . .	41
2. PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MARCAJE DE LOS MUTANTES OBTENIDOS . . . . .	42
3. EXPERIMENTO PRELIMINAR PARA EVALUAR EN INVERNADERO LA EFECTIVIDAD DE LOS MUTANTES DE <i>Rhizobium phaseoli</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS . . . . .	42
4. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUÍA SOBRE LA FIJACIÓN DE NITROGENO . . . . .	43
A. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO . . . . .	43
A.1. GENOTIPOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> L. . . . .	43

CONTENIDO

	PAG.
A.2. CEPAS DE <i>Rhizobium phaseoli</i> . . . . .	45
B. DESCRIPCIÓN DEL SUELO DE LOMAS DE SN. JUAN TEXCOCO, MÉXICO . . . . .	45
C. PREPARACIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	47
D. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE RIZOBIAS POR GRAMO DE SUELO DE LOMAS DE SN. JUAN . . . . .	47
E. PREPARACIÓN DEL INOCULANTE . . . . .	48
F. FERTILIZACIÓN, SIEMBRA E INOCULACIÓN . . . . .	49
G. APLICACIÓN DE LA SEQUÍA EN LAS PLANTAS . . . . .	50
H. TIEMPO DE COSECHA Y PROCESAMIENTO DEL MATE RIAL VEGETAL . . . . .	50
I. DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES DE AGUA ( $\Psi_w$ ) DE LA PLANTA Y EL SUELO . . . . .	51
J. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RIZOBIAS POR GRAMO DE SUELO DE LA RIZOSFERA . . . . .	52
K. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE COMPETENCIA DE LAS CEPAS INTRODUCIDAS . . . . .	52
L. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA	53
M. DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS Y DISEÑO EX- PERIMENTAL . . . . .	54

CONTENIDO

	PÁG.
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .	56
1. OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS MUTANTES DE <i>Rhizobium phaseoli</i> . . . . .	56
2. COMPORTAMIENTO ESTOMATAL DE LOS TRES GENOTIPOS DE <i>P. vulgaris</i> L. BAJO SEQUÍA Y RIEGO . . . . .	57
A. EN ESTADO VEGETATIVO . . . . .	57
B. EN FLORACIÓN . . . . .	62
C. EN LLENADO DE VAINA . . . . .	66
3. POTENCIALES DE AGUA ( $\Psi_w$ ) DEL SUELO Y LA PLANTA OBTENIDOS AL MOMENTO DE LA COSECHA . . . . .	66
4. EFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES: NITRÓGENO, HUMEDAD, VARIEDAD Y ESTADO FENOLOGICO . . . . .	71
A. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE FOLLAJE . . . . .	71
B. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE RAÍZ . . . . .	73
C. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS . . . . .	75
D. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS . . . . .	77
5. INTERACCIONES ENCONTRADAS ENTRE LAS FUENTES PRINCIPALES . . . . .	79



CONTENIDO

	PÁg.
A. EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE FOLLAJE	79
A.1. FUENTE DE NITRÓGENO POR VARIEDAD ..	79
A.2. FUENTE DE NITRÓGENO POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	81
A.3. NIVEL DE HUMEDAD POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	81
A.4. VARIEDAD POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	81
B. EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE RAÍZ .	85
B.1. FUENTE DE NITRÓGENO POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	85
B.2. NIVEL DE HUMEDAD POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	85
B.3. VARIEDAD POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	88
C. EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓ DULOS . . . . .	88
C.1. FUENTE DE NITRÓGENO POR NIVEL DE HU MEDAD . . . . .	88
C.2. FUENTE DE NITRÓGENO POR VARIEDAD ..	91
C.3. FUENTE DE NITRÓGENO POR ESTADO FENO LÓGICO . . . . .	93

CONTENIDO

	PÁG.
C.4. VARIEDAD POR NIVEL DE HUMEDAD . . .	95
C.5. NIVEL DE HUMEDAD POR ESTADO FENOLÓ- GICO . . . . .	95
C.6. VARIEDAD POR ESTADO FENOLÓGICO . . .	98
D. EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS	98
D.1. FUENTE DE NITRÓGENO POR NIVEL DE HU- MEDAD . . . . .	100
D.2. FUENTE DE NITRÓGENO POR VARIEDAD ..	100
D.3. FUENTE DE NITRÓGENO POR ESTADO FENO- LÓGICO . . . . .	103
D.4. NIVEL DE HUMEDAD POR ESTADO FENOLÓ- GICO . . . . .	103
D.5. VARIEDAD POR ESTADO FENOLÓGICO . . .	106
6. SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE <i>R. phaseoli</i> EN LA RIZOSFERA DE CADA VARIEDAD PROBADA, BA- JO SEQUÍA Y RIEGO . . . . .	106
A. NEGRO 150 G3 . . . . .	106
B. BAYO DURANGO . . . . .	110
C. MICHOACÁN 12A3 . . . . .	110
7. CAPACIDAD COMPETITIVA DE LOS MUTANTES DE <i>R. phaseoli</i> BAJO SEQUÍA Y RIEGO . . . . .	114

CONTENIDO

	PÁG.
A. ESTADO VEGETATIVO . . . . .	114
B. FLORACIÓN . . . . .	115
C. LLENADO DE VAÍNA . . . . .	116
8. ACTIVIDAD NITROGENASA DEL SISTEMA SIMBIÓTI CO BAJO SEQUÍA Y RIEGO . . . . .	119
A. ESTADO VEGETATIVO . . . . .	119
B. FLORACIÓN . . . . .	119
VII. CONCLUSIONES . . . . .	123
VIII. BIBLIOGRAFÍA . . . . .	125
IX. APÉNDICE . . . . .	125

## I. RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento en invernadero, para determinar la sobrevivencia y competitividad de dos mutantes de *Rhizobium phaseoli* - resistentes a antibióticos (CPMEX1<sub>Str150</sub> y CPMEX22<sub>Spe200</sub>) cuando el hospedero es sometido a condiciones restringidas de humedad. Se usaron tres genotipos de *Phaseolus vulgaris* L.: Negro 150 G3, Michoacán 12A3 y Bayo Durango (con hábitos de crecimiento IV, II y III, respectivamente), siendo catalogados los dos primeros como genotipos resistentes a sequía.

El sustrato empleado fue suelo de Lomas de Sn. Juan, Texcoco, México, al cual se le determinó el número más probable (NMP) de rizobias por gramo de suelo mediante la técnica de infección en planta. La siembra se hizo por trasplante siendo inoculada la radícula al mismo tiempo. Después de suspendido el riego, la sequía se estableció en las plantas cuando éstas alcanzaron valores de Transpiración y Resistencia estomatal ( $r_s$ ) de  $1 \mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y  $30 \text{seg cm}^{-1}$ , respectivamente.

Se hicieron tres muestreos: en el estado vegetativo, en la floración y en el llenado de vaina. En el momento del muestreo se determinaron los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) de la planta y el suelo. De cada unidad experimental se plaqueó el 40% de los nódulos totales de la planta sobre cajas de medio ELMARC con la respectiva concentración de antibiótico. Para determinar el número de rizobias por gramo de suelo, se hicieron diluciones decimales del suelo de la rizosfera y se

sembraron sobre placas de medio ELMARC con antibiótico.

Se encontró que los valores de Resistencia Estomatal y Transpiración, iguales o menores a  $30 \text{ seg cm}^{-1}$  y  $1 \mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ , respectivamente, abatieron drásticamente los valores de peso seco de follaje, de raíz, de nódulos y el número total de estos.

Se observó que los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo menores de -15 barías, redujeron el número de mutantes de *R. phaseoli* viables; presentándose siempre una caída drástica durante el estado vegetativo y una posterior disminución paulatina a lo largo de la floración y el llenado de vaina. En general, el rango de abatimiento de las poblaciones de mutantes introducidos, fue del orden de 2 a 5 números logarítmicos.

Los porcentajes de nodulación bajo sequía dados por las cepas introducidas fueron: alto, medio y bajo en los estados vegetativo, floración y llenado de vaina, respectivamente.

Bajo condiciones restrictas de humedad, la actividad nitrogenasa en el estado vegetativo fue severamente reducida, incluso sin detectarse valores significativos de reducción de acetileno ( $0 \mu\text{moles de C}_2\text{H}_4$ ); no así durante la floración, donde a pesar de que fue abatida la actividad nitrogenasa, no se obtuvieron valores de cero.

## II. INTRODUCCIÓN

La sequía no necesita ser prolongada para hacer evidentes sus efectos en la producción agrícola, *Linsley, et. al.* (1959) (citados por *Palec y Aspinall, 1981*) definieron a la sequía como un prolongado período de tiempo sin lluvia significativa. A su vez *Katz y Glants* (1977) (citados por *Palec y Aspinall, 1981*) sugieren dos definiciones de sequía: meteorológica y agrícola.

La sequía meteorológica, puede ser definida, como un período de tiempo donde la cantidad de precipitación es menor al porcentaje designado como media del período largo. Por otra parte, la sequía agrícola, puede ser definida en términos del desarrollo de la vegetación estacional. Sin embargo, debe considerarse que en el campo, a una temporada seca no se le llama sequía, sino hasta que afecta seriamente la estabilidad económica de lo que se cultiva.

En muchas regiones agrícolas, las plantas están continuamente expuestas a períodos de sequía. Por otra parte, sabemos que, básicamente el crecimiento potencial está dado por la constitución genética de la planta, pero el ambiente puede modificar o limitar dicho crecimiento.

Como respuesta a la tensión hídrica (estres hídrico), algunas veces la planta dispone de una marcada adaptación, obviamente como un intento de disminuir el efecto deletereo de la sequía. Esta adaptación, esencial para que la planta sobreviva, puede deberse a una plasticidad fenotípica de los individuos, capacitandolos así para hacer uso de las condiciones prevalecientes. Otra posibilidad es la variabili

dad genética, presente también en las poblaciones, la cual resulta en una selección de ecotipos, genéticamente más adaptados a una localidad dada.

Se sabe que los cambios ambientales operan mayormente en plantas que son componentes de un sistema simbiótico (Lie, 1981). En el caso particular de la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* L., el macrosimbionte debe expresar también el efecto que causa la sequía sobre las propiedades simbióticas de *Rhizobium*.

Así, existen numerosos trabajos que muestran el efecto de la sequía sobre algunos procesos fisiológicos del frijol (Serrano, 1964; Harrison y Walton, 1975; Ochoa, 1977; González, 1981; Larqué-Saavedra, et. al. 1982; Nava, 1984), y sobre los microorganismos del suelo, como *Rhizobium* (Sprent, 1971; Sprent, 1972a; Sprent, 1972b; Sprent, 1972c; Engin y Sprent, 1973; Mahler y Wollum II, 1980; Rathore, et. al. 1981; Osa-Afiana y Alexander, 1982). Sin embargo, prácticamente no se tiene conocimiento acerca de la influencia de la tensión hídrica sobre la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* L.

En México, el factor sequía se hace evidente en una considerable parte del año agrícola. De los 10 cultivos principales para nuestro país, el frijol ocupa el 2o. lugar en superficie cosechada. En 1980, se sembraron en el país 1,763 347 ha, siendo ésta cantidad 78% mayor que en 1979. Aunque el frijol es la principal fuente de proteína, existen otras leguminosas que la contienen en mayor cantidad (Vincent, et. al., 1976). La mayor superficie de frijol en México se cultiva bajo condiciones de temporal, casi en un 90% del total, por lo cual,

las precipitaciones son determinantes en los rendimientos (Banco de México, 1982).

Por las razones antes expuestas, se llevó a cabo un experimento en invernadero, usando tres genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para estudiar el efecto de la sequía sobre la fijación simbiótica del nitrógeno, y al mismo tiempo, determinar la sobrevivencia y competitividad en el rizosfera, de cepas introducidas de *Rhizobium phaseoli*, en tres estados fenológicos de la planta.

Esta investigación, deberá originar trabajos tendientes a incrementar los estudios sobre *Rhizobium* en la producción de frijol, en zonas donde la disponibilidad de agua para las plantas es una limitante.



### III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

#### 1. SEQUIA Y ALTERACIONES MORFO-FISIOLOGICAS EN LA PLANTA.

Son básicamente dos los factores que afectan la pérdida de agua en las plantas: los físicos o ambientales (intensidad de la luz, presión de vapor, temperatura del aire y de las hojas, y el suministro de agua a la raíz) y los morfo-fisiológicos (la estructura de la planta y el comportamiento de los estomas).

Se ha observado que cualquier desajuste de los factores ambientales e intrínsecos de la planta, pero principalmente los físicos, conducen a la alteración del coeficiente de Transpiración y de la Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) (Kramer, 1974).

Las hojas de las plantas, se hallan cubiertas a ambos lados, por una capa de células llamada epidérmis, cuyas células se encuentran estrechamente ajustadas entre sí, sin espacios intercelulares. Sin embargo, la epidérmis está perforada por numerosos poros pequeños llamados estomas, los cuales son más abundantes en la cara inferior (abaxial) de la hoja. Cada poro estomático está rodeado por dos células epidérmicas especializadas llamadas células guarda o acompañantes. Cuando el estoma se abre, proporciona una conexión directa entre el aire externo y los espacios de aire del tejido interno (Ray, 1980).

La habilidad de los estomas para abrir o cerrarse permite que la Transpiración disminuya cuando no se está efectuando la fotosíntesis. Debido a esto, en muchas plantas los estomas están abiertos

durante, cuando menos parte del día, que es cuando la fotosíntesis se puede efectuar eficientemente, pero se cierran durante la noche, retardando la pérdida de agua, aunque de cualquier manera se pierde algo de agua por Transpiración a través de la cutícula en la superficie de la hoja (Salisbury y Parke, 1968).

Dentro de una misma planta, dependiendo del estrato o dosel vegetal, se han detectado diferentes valores de Transpiración y de Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) (Turner, 1969; Larqué-Saavedra, et. al., 1982). Incluso, hay evidencias de que en una misma hoja, el comportamiento de los estomas en ambas superficies (abaxial y adaxial) es muy diferente (Davies, 1977).

La "hormona" vegetal ABA (Acido Abscísico), ha sido involucrada para explicar procesos intrínsecos de las plantas, tales como: la dormancia y la abscisión de las hojas (bajo heladas y sequía, respectivamente), la caída de los frutos y la inhibición del crecimiento (Ray, 1980). Sin embargo, el ABA es una "hormona" vegetal que induce el cierre de los estomas cuando la planta se encuentra bajo condiciones de sequía, siendo esto, la evidencia más clara del papel natural que realiza esta "hormona". Los estomas son el control principal en la pérdida de agua, de tal forma que el cierre estomatal es un importante mecanismo para habilitar a la planta a sobrevivir en ambientes secos. Se ha visto que la cantidad de ABA en tejidos de muchas especies vegetales se incrementa rápidamente cuando las plantas son sometidas a déficits de agua, principalmente (Harison y Walton, 1975; Jones, 1978).

*Itai, et. al.*, (1978) e *Itai y Meidner* (1978) dan fuertes evidencias del papel del ABA en la fisiología Estomatal. Usando microautoradiografía del tejido epidérmico, y empleando ABA marcado con  $^{24}\text{C}$ , encontraron que la "hormona" puede acumularse en los supuestos sitios de acción (aparato Estomatal).

Los cambios en la apertura Estomatal son causados directamente por alteraciones en el balance entre la presión interna de las células guarda y las demás células epidérmicas (*Winter, 1981*). Las presiones altas necesarias para abrir los estomas, se originan de la activa acumulación de moléculas osmóticamente activas, especialmente potasio.

La Transpiración está determinada por la diferencia de gradientes de vapor de agua, dentro y fuera de la hoja; un aumento en la temperatura de la hoja elevará la diferencia de presión de vapor de agua de la hoja y la atmósfera, y como consecuencia, se incrementará la Transpiración (*Meidner y Sherifff, 1976*; citado por *Larqué-Saavedra, et. al., 1982*).

Generalmente, la densidad de estomas es alta en la superficie abaxial de la hoja, en contraste con la superficie adaxial, a excepción de las gramíneas, en donde la densidad es más o menos igual en ambas superficies. Se ha observado que los movimientos naturales de los estomas de diferentes especies en campo durante el día, y la abertura de estos inducida con luz en el laboratorio, acompañados por cambios en la concentración de almidón y potasio en las células guarda, son substancialmente más pronunciados en los esto

mas de la región abaxial que en los estomas de la región adaxial de las hojas (Pemadasa, 1979).

Las mismas diferencias en comportamiento Estomatal encontradas por Pemadasa [1979] en ambas superficies de la hoja, fueron encontradas por Ehler y Van Bavel [1968], para *Phaseolus vulgaris* L. y *Zea mays*.

Las plantas que crecen en el campo bajo condiciones restringidas de humedad, poseen significativamente mayor frecuencia Estomatal y menor área foliar, a diferencia de las plantas que crecen bajo condiciones normales de humedad (Ciha y Brun, 1975).

Larqué-Saavedra, et. al., (1984) han propuesto un parámetro fisiológico de sequía relacionado con la producción agrícola para plantas de tipo mata de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Proponen que la sequía comienza en el momento en que el valor de la Transpiración cae hasta  $0.5 - 1.0 \mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ , en lugar de cualquier otro parámetro del suelo o del estado hídrico de la planta.

## 2. SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA.

Usualmente, las leguminosas pueden recibir nitrógeno en dos diferentes formas:

- a) Por asimilación del nitrógeno del suelo. La absorción de nitratos (materia orgánica nitrificada o fertilizantes) se da a través de las raíces.

Estos nitratos son reducidos por la nitrato reductasa, una en-

zima esencialmente localizada en las hojas, para producir amonio. El amonio participará posteriormente en la formación de aminoácidos y proteínas. Todas las leguminosas producen ésta enzima.

- b) Por la fijación de nitrógeno atmosférico. Este proceso se da gracias a la asociación simbiótica de las leguminosas con bacterias del género *Rhizobium*. En el suelo, el nitrógeno atmosférico se pone en contacto con los nódulos, que es el nuevo órgano resultado de la asociación, donde es subsecuentemente reducido a amonio por la nitrogenasa, enzima presente en los bacteroides de *Rhizobium*. Posteriormente, este amonio es incorporado a esqueletos carbonados para producir aminoácidos y proteínas (FAO, 1983).

Balandreau y Knowles (1978), clasificaron a la relación *Rhizobium*-Leguminosa dentro de la categoría de asociación simbiótica obligada, es decir, donde la bacteria necesita al macrosimbionte para fijar nitrógeno. Sin embargo, se ha reportado que *Rhizobium* presenta actividad nitrogenasa (Fijación de Nitrógeno) en cultivos puros (Pagan, et. al., 1975; Kurz y La Rue, 1975; Keister, 1975; Mc Comb, et. al., 1975). Se ha encontrado que la fijación de nitrógeno por rizobias de vida libre es estimulada por el cultivo de células de leguminosas (Scowcroft y Gibson, 1975; De Moranville, et. al., 1981), extracto de raíz (Kurz y La Rue, 1975) y semillas (Anderson y Phillips, 1976).

En la asociación simbiótica, el beneficio que recibe la planta depende de diversos factores, tanto intrínsecos de las rizobias y la planta, como de las condiciones ambientales (Patc, 1976; Dart, et. al., 1976; Lie, 1981).

Las leguminosas han sido clasificadas de varias formas, pero la mayoría de trabajos sobre fijación de nitrógeno ponen a éstas dentro de la familia *Leguminosae*, dividida a su vez en las subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosideae* y *Papilionoideae*. En la Tabla 1, se muestra la incidencia de nodulación de dicha familia. Se observa que el 48% de los géneros del grupo han sido estudiados, y que de estos el 86% forma nódulos. De los géneros examinados en las subfamilias *Mimosideae* y *Papilionoideae*, el 83 y 95% respectivamente, tuvieron nódulos; mientras que en la subfamilia *Caesalpinioideae*, solamente el 40% de los géneros examinados mostró nodulación. A nivel de especie, el 15% de la familia ha sido examinado, y de este, el 91% forma nódulos. Entre las subfamilias *Mimosideae* y *Papilionoideae* se registraron 90 y 98% de nodulación, respectivamente; en la subfamilia *Caesalpinioideae*, solamente el 30% de las especies fueron reportadas como nodulantes (Allen y Allen, 1981).

El nivel promedio de fijación de nitrógeno en leguminosas es de 55-140 Kg de N/ha/año (Quispel, 1974). Se ha estimado que el frijol fija 45 Kg de N/ha/año (Dawson, 1970), por lo que es de las leguminosas comestibles menos eficientes en esta actividad, como puede observarse en la Tabla 2.

TABLA 1. INCIDENCIA DE NODULACION EN LAS SUBFAMILIAS DEL GRUPO LEGUMINOSAE.

SUBFAMILIA	NUMERO DE GENEROS	NUMERO DE GENE- ROS REPORTADOS				NUMERO ES TIMADO DE ESPECIES	NUMERO DE ESPE- CIES REPORTADAS		
		-	+/-	-	TOTAL		-	+/-	TOTAL
<i>Mimosidae</i>	66	18	8	5	31	2 900	351	37	388
<i>Caesalpinioideae</i>	177	13	13	39	65	2 800	72	6*180	258
<i>Papilionoideae</i>	<u>505</u>	<u>241</u>	<u>14</u>	<u>14</u>	<u>269</u>	<u>14 000</u>	<u>2416</u>	<u>46</u>	<u>2462</u>
Total	748	272	35	58	365	19 700	2839	263	3108

\*UNA ESPECIE DE CADA GENERO: *Amherstia*, *Copaifera*, *Esperva*, *Hymenaea*, *Mora* y *Saraca*.

ALLEN Y ALLEN, 1981.

Hernández X., et. al., (1979), calculan una antigüedad de 6 000 años al cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México.

Es factible pensar que durante este tiempo, tanto la bacteria como el macrosimbionte han sufrido cambios en su asociación, de tal forma - que es posible observar una gran cantidad de nódulos inefectivos. La nodulación no necesariamente indica fijación de nitrógeno, pues existen cepas que producen nódulos que fijan poco o nada de nitrógeno, las cuales en casos extremos se comportan como parásitas (Dawson, 1970).

La nodulación, normalmente no ocurre en el campo sino hasta que las - primeras hojas estan abiertas; y la fijación de nitrógeno, generalmen - te no comienza sino hasta que la planta puede aportar una parte de sus fotosintatos para este fin. El proceso de fijación de nitrógeno, ent - onces, requiere sincronía de la planta y del desarrollo de las rizo -

TABLA 2. CANTIDAD DE NITROGENO FIJADO (KG N/HA/AÑO) POR VARIAS LEGUMINOSAS COMESTIBLES Y FORRAJERAS.

P L A N T A		N FIJADO (kg/ha/año)	P L A N T A		N FIJADO (kg/ha/año)
LEGUMINOSAS COMESTIBLES			LEGUMINOSAS FORRAJERAS		
Frijolillo	<i>Calopogonium mucunoides</i>	370-450	Caulotillo	<i>Desmodium intortum</i>	897
Haba	<i>Vicia faba</i>	45-552	Sesbania	<i>Sesbania cannabina</i>	542
Chicharo gandul	<i>Cajanus cajan</i>	168-280	Guaje	<i>Leucaena leucocephala</i>	74-584
Frijol de Castilla	<i>Vigna unguiculata</i>	73-354	Centro	<i>Centrocema pubescens</i>	126-398
Frijol mungo	<i>Vigna mungo</i>	63-342	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	229-290
Guar	<i>Cyanopsis tetragonoloba</i>	41-220	Trébol	<i>Trifolium subterraneum</i>	207
Soya	<i>Glycine max</i>	60-168	Trébol ladino	<i>T. repens var. gigantea</i>	165-189
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	103	Trébol blanco	<i>T. repens</i>	128
Lenteja	<i>Lens esculenta</i>	88-114	Estilo	<i>Stylosanthes spp.</i>	34-220
Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	72-124	Veza velluda	<i>Vicia villosa</i>	110
Chicharo	<i>Pisum sativum</i>	52-77	Puero	<i>Pueraria phaseoloides</i>	99
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	40-70			

FAO, 1984.



TABLA 2. CANTIDAD DE NITROGENO FIJADO (KG N/HA/AÑO) POR VARIAS LEGUMINOSAS COMESTIBLES Y FORRAJERAS.

P L A N T A		N FIJADO (kg/ha/año)	P L A N T A		N FIJADO (kg/ha/año)
LEGUMINOSAS COMESTIBLES			LEGUMINOSAS FORRAJERAS		
Frijolillo	<i>Calopogoninimum mucunoides</i>	370-450	Caulotillo	<i>Desmodium intortum</i>	897
Haba	<i>Vicia faba</i>	45-552	Sesbania	<i>Sesbania cannabina</i>	542
Chicharo gandul	<i>Cajanus cajan</i>	168-280	Guaje	<i>Leucaena leucocephala</i>	74-584
Frijol de Castilla	<i>Vigna unguiculata</i>	73-354	Centro	<i>Centrocma pubescens</i>	126-398
Frijol mungo	<i>Vigna mungo</i>	63-342	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	229-290
Guar	<i>Cyanopys tetragonoloba</i>	41-220	Trébol	<i>Trifolium subterraneum</i>	207
Soya	<i>Glycine max</i>	60-168	Trébol ladino	<i>T. repens var. gigantea</i>	165-189
Garbanzo	<i>Cicer arietinum</i>	103	Trébol blanco	<i>T. repens</i>	128
Lenteja	<i>Lens esculenta</i>	88-114	Estilo	<i>Stylosanthes spp.</i>	34-220
Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	72-124	Veza velluda	<i>Vicia villosa</i>	110
Chicharo	<i>Pisum sativum</i>	52-77	Puero	<i>Pueraria phaseoloides</i>	99
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	40-70			

FAO, 1984.

bias que se refleja en una serie de pasos los cuales se inician en el suelo (Sprent, 1979). La secuencia de estos eventos aparece resumida en la Tabla 3.

Cuando las semillas de las leguminosas germinan en suelos que contienen una población natural de microorganismos, esto puede o no tener efecto sobre cualquier rizobia presente. La mayoría de estudios sobre los efectos de las rizobias en la germinación de las plántulas, han sido llevadas a cabo en leguminosas de semillas pequeñas, especialmente en especies de *Trifolium*. Sin embargo, algunos estudios donde se usaron leguminosas de semillas grandes, particularmente de *Pisum sativum*, demostraron como el hospedero puede estimular la población de rizobias. Igualmente, como en las leguminosas de semillas grandes, *P. sativum* posee una prominente raíz primaria. Se ha observado que esto no favorece la multiplicación de las rizobias y que sus exudados pueden ser inhibitorios (Van Engeraat, 1975a).

Rodríguez y Ferrera-Cerrato, (1980) encontraron que durante el proceso de germinación de *Phaseolus vulgaris* L., a los cinco días aproximadamente, aumenta la sobrevivencia de *R. phaseoli*, pero posteriormente a los 20 días, las poblaciones decaen.

Se ha observado que cuando las raíces laterales comienzan a emerger, se liberan varios compuestos, incluyendo aminoácidos como la homoserina, la cual ha sido encontrada en semillas de chícharo, usualmente en altas cantidades. La homoserina, preferentemente estimula el crecimiento de *R. leguminosarum*, lo cual resulta en una

TABLA 3. INTERACCION HOSPEDERO-RHIZOBIUM EN LA FORMACION DE NODULOS.

ESTADOS DE "DESARROLLO"	REQUISITOS GENETICOS/FISIOLOGICOS	COMENTARIOS
Multiplicación de <i>Rhizobium</i> en el suelo.	Las secreciones del hospedero pueden estimular o inhibir.	Grado de especificidad variable.
Enrollamiento y ramificación del pelo radical.	Hospedero y <i>Rhizobium</i> compatibles.	Grado de especificidad variable.
Atracción entre células compatibles del hospedero y de <i>Rhizobium</i> .	Grupos combinados de reacción cruzada? Construcción de puentes de lectinas?	Iniciada por alguna célula, por ser altamente específica; otras son menos específicas.
Entrada de la bacteria	Disolución o Alargamiento de la rizobia con el material de la pared celular del hospedero.  Desarrollo combinado de la rizobia con el material de la pared celular del hospedero.	La entrada de <i>Rhizobium</i> y el desarrollo del hilo son afectados por la temperatura. Las plantas pueden tener controladas genéticamente factores antinodulantes.
Formación de nódulos.	Balance correcto de factores de crecimiento de ambos participantes.	Conocidos mutantes de <i>Rhizobium</i> causan desarrollo para detenerse en cualquier estado. Es esencial la correcta combinación de los genotipos del hospedero y la rizobia.
Formación de células maduras infectadas.	Liberación de las rizobias de los hilos. Crecimiento combinado de las rizobias y las membranas del hospedero.	
Formación de bacteroides, desarrollo de Nitrogensa y haemoglobina, etc.	Interacciones específicas involucrando a ambos participantes.	El hospedero puede actuar proveyendo un ambiente correcto.
Mantenimiento del tejido de bacteroides.	Correcto intercambio de materiales entre los simbiosistas.	No está bien entendida. Fuertemente condicionado por el ambiente.

SPRENT, 1979.

51

cantidad suficiente de bacterias listas para nodular a la planta en el momento apropiado. Los primeros nódulos, al igual que en leguminosas similares, son formados sobre la raíz primaria. No hay información detallada disponible para otras leguminosas, pero es razonable suponer que éstas pueden fomentar el crecimiento de rizobias compatibles, capaces de nodular a ese hospedero en particular (Van Engehaat, 1975b).

Una vez que se tienen suficientes rizobias, estas pueden comenzar a influir y posiblemente infectar a la planta hospedera. El primer síntoma obvio, es la deformación de pelos radicales. Han sido descritas tres categorías de deformación: 1) Ramificación, 2) Enrollamiento moderado (extremo del pelo enrollado de 90-360°), y 3) Marcado enrollamiento, con la punta doblada por lo menos 360°). No todos los pelos de una raíz responden, y algunas veces el pelo radical crece sin virar, aún cuando se desarrolle entre rizobias (Yao y Vincent, 1969).

La naturaleza de los factores responsables del enrollamiento del pelo radical aún no son completamente entendidos, se sugiere que una auxina (Ácido indolacético) es un esencial componente, aunque esto no es apoyado por recientes evidencias discutidas por Yao y Vincent, (1976). Estos investigadores concluyen que la ramificación del pelo radical y el moderado enrollamiento pueden ser causados por un producto o productos de la rizobia, los cuales son dialisables y estables al calor. El marcado enrollamiento resulta -- del contacto con la rizobia viable, pero no necesariamente con la

rizobia efectiva. Los pelos radicales muy enrollados pueden reflejar una reacción altamente localizada, incluyendo esto posiblemente los primeros estados de infección. Un enrollamiento, podría delimitar una área donde alguna o algunas sustancias vitales se acumulan. Es también posible que, en los orificios de entrada hechos sobre la curva del enrollamiento, éstas sustancias prevengan la entrada de patógenos. En general, la incidencia de patogenicidad parece ser baja (Yao y Vincent, 1976).

Antes de la entrada, las bacterias pueden ser afectadas, éstas deben estar correctamente alineadas sobre el pelo radical. Durante este período, las bacterias se ven frecuentemente embebidas en mucilago, una sustancia originada por el hospedero, la cual puede cubrir las puntas de las raíces y los pelos, ayudando esto a unir raíces con suelo, y proveer un posible sustrato para el crecimiento bacteriano. Varias sugerencias han sido dadas para explicar la alta especificidad requerida en la interacción entre bacterias y la superficie de pelos radicales. La más reciente vislumbra una atracción similar a la que se da entre antígenos y anticuerpos en animales. ¿Qué sustancia producida por ambos simbioses puede ser suficientemente específica? Las leguminosas son bien conocidas por la producción de proteínas que pueden aglutinar glóbulos rojos y causar síntomas de envenenamiento en algunas gentes. Estas proteínas, antiguamente llamadas Fitoheмоglutininas, ahora son usualmente conocidas como Lectinas; muchos investigadores creen que estas pueden contribuir en la especificidad *Rhizobium*-Leguminosa (Currier y Strobel, 1976; Fahraeus y Sahlman, 1977; Dazzo, et. al., 1978; Sprent,

1979; Dazzo y Brill, 1979).

Se piensa que las Lectinas producidas por el hospedero son las responsables de la unión de la superficie del pelo radical y la cápsula de la rizobia compatible (Dazzo, 1980). Los sitios de unión sobre los dos simbiosites, estructural y antigénicamente, son polisacáridos similares (Brill, 1977). Observaciones al microscopio han mostrado que la adhesión de la rizobia al pelo radical y otras superficies es polar. Se ha sugerido que ésta unión inicial, es cementada por fibrillas de celulosa de origen rizobial (Napoli, et al., 1975; Dazzo, et al., 1982a).

El  $\text{NO}_3^-$  (16 mM) ó el  $\text{NH}_4^+$  (1mM) inhiben completamente tanto la infección como la nodulación de plántulas de trébol blanco (*Trifolium repens*) inoculado con *Rhizobium trifolii*. La unión de *R. trifolii* con los pelos radicales y los niveles inmunológicamente detectables de la lectina de la planta, *Trifolina* (Dazzo, et al., 1979), sobre la superficie del pelo radical presentaron un paralelo declive conforme las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  fueron incrementándose en el medio. La aglutinación de *R. trifolii* debida a la *trifolina* de semillas no fue inhibida por los mencionados niveles de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ . Estos resultados sugieren que estos iones pueden jugar un papel importante en la regulación de un temprano proceso de reconocimiento en la simbiosis *R. trifolii*-trébol, especialmente en la acumulación de un alto número de rizobias infectivas sobre el pelo radical (Dazzo y Brill, 1978).

Por otro lado, Dazzo, et al., (1982b), encontraron que durante el desarrollo de plántulas de trébol blanco, los ápices de pelos radi

cales adyacentes se unieron entre sí, debido a que en ésta región se detectó la mayor acumulación de *Trifolium A*. Sin embargo, también se presentaron uniones de ápices con regiones no apicales. Estos resultados sugieren que la *Trifolium A* está involucrada en la formación y/o estabilidad de las uniones célula-célula, las cuales son precedidas por el Modelo de Uniones Entrecruzadas de Lectinas (Dazzo y Hubbel, 1975) para explicar el ataque de los pelos radicales por rizobias específicas.

Dazzo, et. al., (1984), observaron que cuando  $10^7$  rizobias encapsuladas o más son adicionadas a plántulas de trébol blanco, las bacterias atacan en pocos minutos el ápice del pelo radical formando aglutinaciones orientadas completamente al azar. Pero varias horas después, las bacterias de manera individual, atacan polarmente los lados del pelo radical. Se cree que el gradiente de *Trifolium A* va de mayor a menor del ápice a la base del pelo radical. En la interfase entre la unión polar de la bacteria y la pared de la célula del pelo radical se demostró la presencia de *Trifolium A*; igualmente se encontraron en dicha interfase, gránulos densos originados por el hospedero. La microscopía electrónica de Scanning reveló una acumulación de microfibrillas extracelulares asociadas con el ataque de las superficies polar y lateral de la bacteria, a las 12 horas de incubación con raíces de plántulas.

Aunque el papel de las Lectinas es una hipótesis atractiva, debe aclararse que no todos los investigadores han encontrado este requisito de alto grado de unión entre las Lectinas y las rizobias (Law y Strijdom, 1977), aunque es posible que éstos representen -

sólo una parte del proceso de reconocimiento (Beringer, 1978). Una buena evidencia, por otro lado, que sostiene el papel de las Lectinas, es el reporte de Sanders, et. al., (1978), quienes empleando mutantes de *Rhizobium* carentes de exopolisácarido, observaron que no formaron nódulos.

El siguiente problema es, saber cómo entran las bacterias a las células del hospedero. Estrictamente hablando, éstas nunca lo hacen, porque permanecen encerradas por una membrana del hospedero, derivada de la invaginación del plasmalema. Cuando las bacterias compatibles están firmemente adheridas al pelo de la raíz, una mancha refractil (o hialina) se vuelve visible en la pared del pelo radical, lo cual indica cambios estructurales. Esto puede involucrar una auxina, la cual se ha encontrado en altas concentraciones tanto en raíces infectadas como no infectadas, se sabe además que ésta auxina se halla asociada con la pérdida de la pared celular y el crecimiento. Una gran actividad metabólica, en la célula del hospedero, es indicada por citoplasma más ópaco, incremento de flujo citoplasmático y aumento de tamaño (al doble) del núcleo. Solamente una proporción de los pelos radicales es infectado (cerca del 28% en *Pisum sativum*), y solamente una proporción de éstos últimos da origen a nódulos. Uno de los factores que afecta ésta última proporción es la particular combinación hospedero-*Rhizobium* (Sprent, 1979).

Unas pocas horas después, son visibles las manchas hialinas, los hilos de infección se vuelven evidentes. El crecimiento de estos, finalmente es un proceso balanceado; esto puede ser considerado como



una competencia entre las bacterias, que intentan entrar, y el hospedero, que secreta material de la pared celular alrededor de la bacteria para contenerla. Si las bacterias obtienen la victoria, estas podrán ser vistas nadando libremente dentro del pelo radical. Si la planta obtiene el triunfo, ésta habrá cortado el hilo de infección por depositación de material de la pared celular, antes de que la bacteria haya tenido tiempo de dividirse ampliamente (Dart, 1975; citado por Sprent, 1979).

Los simbioses cooperativos, se caracterizan por coordinar la división bacteriana y la depositación del material de la pared celular; de esto resulta un funcional hilo de infección. Este hilo consiste de una o más hileras de bacterias alineadas dentro de una envoltura originada de la pared celular que crece hacia abajo del pelo radical. En las sucesivas infecciones, el núcleo del pelo radical permanece inactivo para el final crecimiento del hilo de infección. El hilo de infección crece entre la célula del pelo radical y a través de las células de la corteza de la raíz, algunas veces con considerables ramificaciones (Sprent, 1979).

Aunque la infección vía pelo radical es más común, ésta no es universal. En el cacahuete (*Arachis hypogaea*), los pelos radicales solamente son formados hacia los puntos de emergencia de las raíces laterales. Estos pelos son inducidos a enrollarse por rizobias compatibles, pero la entrada es en la unión del pelo radical y las células epidérmicas. No se forman hilos de infección, en cambio, las separadas células de la lámina media y los espacios intermedios se llenan de bacterias. En un determinado momento, una masa de bacte-

rias entra a las células corticales de la raíz lateral; finalmente, las bacterias y las células del hospedero se dividen repetidamente para formar un nódulo (Chandler, 1978).

Así como en el modo de infección, existen también variaciones en el patrón de desarrollo de los nódulos. De manera general, se reconocen dos tipos: 1), aquel en el cual la infección de nuevas células se da por medio del hilo de infección; y 2), aquel donde las bacterias son mayormente esparcidas por la división de células preinfectadas. La segunda, puede carecer o no de hilos de infección, como en el cacahuate (*Arachis hypogaea*), o tener hilos que no se ramifiquen extensamente, como en la soya (*Glycine max* (L.) Merr.). Generalmente estos nódulos, sin extensos hilos de infección son más o menos esféricos, carentes de un meristemo persistente (por lo tanto tienen crecimiento determinado) y con un sistema vascular cerrado. Los nódulos con un meristemo de larga vida son indeterminados, generalmente elongados y algunas veces ramificados; éstos necesitan persistentes hilos de infección para infectar células nuevamente formadas. Este tipo de nódulos indeterminados han sido ampliamente estudiados, particularmente en chícharo (*Pisum sativum*) y trébol (*Trifolium spp.*). Una de las investigaciones más detalladas, de los estados iniciales del desarrollo de nódulos, es el de Libbenga y Harkes (1973) (citado por Sprent, 1979), quienes usaron *P. sativum* y modernas técnicas de microscopía de fluorescencia y estudios fisiológicos.

La fijación de nitrógeno, es la "reducción" del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) por el hidrógeno, en amoníaco ( $NH_3$ ), que es la forma de nitró-

geno que las plantas y animales pueden usar para la fabricación de sus productos celulares. Biológicamente, el amoniaco lo fabrican las bacterias que transportan un complejo de genes (aproximadamente 17) fijadores de nitrógeno. Tres de esos genes codifican la formación de proteínas que se combinan formando la Nitrogenasa, que es la enzima que cataliza en realidad la Reducción del Nitrógeno a Amoniaco [Marx, 1982].

3. USO DE MUTANTES DE RHIZOBIUM RESISTENTES A ANTIBIOTICOS EN ESTUDIOS ECOLOGICOS.

Para estudiar en orden las relaciones ecológicas entre poblaciones introducidas y nativas de *Rhizobium* en el campo, se hacen necesarios métodos que ayuden a distinguir ambas poblaciones. Las técnicas serológicas [Brockwell, et. al., 1977; Diatloff, 1977; Gibson, et. al., 1976] incluyendo la microscopía de inmunofluorescencia [Bohlool y Schmidt, 1970] han sido usadas ampliamente para identificación de cepas de *Rhizobium* responsables de la formación de nódulos en estudios ecológicos. Sin embargo, el tiempo que se emplea en este procedimiento de identificación algunas veces limita el número de nódulos que pueden ser probados [Hale, 1978].

Ha sido reportado por muchos investigadores el uso de marcadores genéticos, como la resistencia a antibióticos, para distinguir cepas de *Rhizobium*. Obaton [1971], citado por Hale [1978], usó mutantes resistentes a Estreptomocina de *R. trifolii* para estudiar la competencia y la sobrevivencia en el suelo; Franco y Vincent [1976] emplearon mutantes resistentes a Estreptomocina para distinguir cepas

de *Rhizobium* compitiendo por la colonización y nodulación de leguminosas tropicales.

Schwinghamer y Dudman (1973), sugirieron que en estudios ecológicos, los mutantes resistentes a Espectinomicina de varias especies de *Rhizobium* pueden suplantar a los mutantes resistentes a Estreptomina.

En un exámen crítico de la estabilidad de Estreptomina y los marcadores antigénicos, Brockwell, et. al. (1977), concluyeron que éstos son igualmente dignos de confianza cuando se usan para la identificación de cepas de *Rhizobium trifolii* reaisladas del campo.

Los mutantes espontáneos de especies de *Rhizobium* resistentes a antibióticos, pueden estar acompañadas por cambios en la habilidad para formar nódulos (infectividad) o en la habilidad para fijar nitrógeno (efectividad). Schwinghamer (1967), encontró que la resistencia a antibióticos (tales como la Estreptomina, Espectinomina y Cloranfenicol), además de inhibir la síntesis proteica, está asociada con poca, pero no con la pérdida total de la efectividad simbiótica; por otro lado, la resistencia a antibióticos, los cuales no afectan la síntesis ni la permeabilidad de la pared celular, fue comunmente acompañada con la pérdida de efectividad. En contraste, Zelazna-Kowalska (1971), reportó la pérdida de infectividad de *R. trifolii* resistente a Estreptomina, y la dependencia a 100 µg/ml de éste antibiótico.

Gollobin y Levin (1974) sugieren que no necesariamente una cepa

resistente a antibiótico va acompañada del cambio morfológico colonial (de liso a rugoso), la incapacidad de infectar al hospedero y la inefectividad simbiótica para fijar nitrógeno, ya que encontramos que de 92 mutantes obtenidos de 2 cepas de *R. japonicum*, resistentes a diferentes concentraciones de Estreptomina, todas exhibieron, después de ser realizadas del hospedero: la misma morfología colonial, no dependencia del antibiótico y la misma capacidad para infectar y fijar nitrógeno que las cepas parentales. Por otro lado, determinaron que hay un límite superior para la resistencia a antibióticos en dichas cepas, obteniendo solamente 3 mutantes resistentes a 10,000 µg/ml, y uno resistente a 25,000 µg/ml de Estreptomina.

No es sencillo saber cómo la mutación para la resistencia a Estreptomina podría tener efecto sobre las propiedades simbióticas de la célula bacteriana. La mutación cromosómica bien caracterizada para la resistencia a Estreptomina, resulta en una alteración de una proteína específica sobre la subunidad ribosomal 30S. Otras bacterias resistentes a Estreptomina, deben ésta resistencia a la presencia de un plásmido que dirige la alteración de la molécula de Estreptomina por acetilación, adenilación o fosforilación. Después de que ciertos estudios con otras especies de rizobias demostraron que los eventos mutacionales resultaron en una alteración de la pared celular, o en última instancia, en una alteración de la estructura de la membrana celular y en un decremento general de la eficacia para la simbiosis, la pared y la membrana celular han asumido gran importancia para explicar la formación de nódulos

efectivos (Schwinghamer, 1967). Una modificación de la pared y de la estructura de la membrana, ha sido también reportada en el proceso de desarrollo del bacteroide en el nódulo efectivo (Jordan, 1962), lo cual sugiere que cualquier mutación que altere la periferia celular puede tener un efecto substancial sobre las propiedades simbióticas del mutante.

Kleezkowska (1971), encontró que, al igual que en las colonias de rizobias resistentes a antibióticos, las resistentes a fagos, presentaron cambio en la morfología colonial de liso a rugoso y cambios en la consistencia y transparencia de la mucosidad.

Un efecto secundario, del ya mencionado cambio en la envoltura celular, puede ser una sutil alteración en la permeabilidad de la célula, de tal forma que la Estreptomicina es excluida, y la resultante resistencia a Estreptomicina es fenotípicamente indistinguible de la resistencia de una célula a una droga por alteración en la subunidad ribosomal 30S (Gollobin y Levin, 1974).

Ordinariamente, en genética microbiana, se considera que los experimentos ecológicos, en los cuales son usados marcadores genéticos como trazadores, no son rígidos, a no ser que sean usadas cepas con doble marcaje. Por ejemplo, si se usa una cepa marcada con Estreptomicina y Acido Nalidíxico, después de reaislada por selección de una sola marca (Estreptomicina, por ejemplo), la presencia de la marca no seleccionada (Acido Nalidíxico) puede ser aceptada como prueba definitiva de que se trata de la cepa originalmente intrducida (Postgate, 1979).

A pesar de estos conflictivos resultados, la facilidad con la cual pueden obtenerse mutantes resistentes a Estreptomina de la mayoría de especies de *Rhizobium*, la estabilidad del carácter y la infrecuencia de reportes acerca de la pérdida de la efectividad simbiótica, han hecho de este marcador genético el que con más frecuencia se use en estudios ecológicos. Sin embargo, llevando en mente la evidencia de *Zelazna-Kowalska* (1971), es importante chequear con regularidad la efectividad de las cepas resistentes a antibióticos para posteriormente usarlas en estudios ecológicos (*Hale*, 1978).

Cuando se usan cepas resistentes a antibióticos, debe tenerse en mente que dicha resistencia puede ser llevada en un plásmido y que ésta puede ser transferida a bacterias de otra especie. Es posible, que en el caso de los animales, esto tenga una implicación médica o veterinaria, cuando se usa Estreptomina o Espectinomicina, que son antibióticos usados como medicamento. Sin embargo, en el ambiente suelo, es improbable que éste sea una presión selectiva para la resistencia a antibióticos, por lo que la posibilidad de la transferencia de resistencia a otras bacterias es remota (*Hale*, 1978).

*Hale* (1978), ha obtenido y usado exitosamente un mutante de *R. trifolii* resistente a Estreptomina en estudios de competencia entre poblaciones introducidas y nativas en suelos donde la producción de trébol blanco-pasto no ha sido satisfactoria. La cepa de *R. trifolii* usada, fue resistente a 200 µg/ml de Estreptomina, efectiva y no dependiente de la Estreptomina después de subcultivos y liofilización.

Hale (1978), ha observado que cuando *R. trifolii* resistente a Estreptomycin es mezclada con turba e impregnada en semillas de trébol blanco, y sembrada en suelos con altas poblaciones de rizobias nativas, menos del 30% de los nódulos formados a los 6 semanas presentaron la cepa marcada. Sin embargo, cuando un inoculante líquido de la misma cepa, fue incorporado al suelo antes o al mismo tiempo de la siembra, hubo un incremento significativo en el número de nódulos formados por el mutante, de 80 al 90%.

La estrecha correspondencia entre los resultados obtenidos usando métodos inmunológicos y caracteres de resistencia a antibióticos (Brockwell, et. al., 1977), como la conveniencia del procedimiento de muestreo de nódulos (Franco y Vincent, 1976), hacen de éste, un método particularmente atractivo para distinguir entre cepas de *Rhizobium* en estudios ecológicos.

#### 4. EFEECTO DE LA SEQUIA (TENSION HÍDRICA) EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA.

Existen numerosos estudios que muestran el efecto de la humedad del suelo sobre la actividad de los microorganismos y el efecto de la tensión hídrica sobre varios procesos fisiológicos de las plantas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la influencia de la tensión hídrica en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa.

Una alteración en el metabolismo hídrico del macrosimbionte puede causar un deterioro en el sistema agua-suelo-planta, y esto también puede conducir al abatimiento de la fijación de nitrógeno (Rathore, et. al., 1981). Tanto los efectos de la tensión hídrica



(duración e intensidad) como el rango de recuperación de los nódulos después de una sequía parcial, no han sido establecidos para la relación *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* L. (Graham, 1981).

*Rhizobium* es un género sensible a condiciones de baja humedad del suelo (Boonkerd y Weaver, 1982). La sobrevivencia de *Rhizobium* en suelos mantenidos a baja tensión hídrica (cercana a la capacidad de campo) es mucho más alta que la sobrevivencia en suelos con alta tensión hídrica. Las poblaciones de *Rhizobium* van decreciendo conforme los potenciales de agua del suelo van acercandose a -15 barías (Mahler y Wollum II, 1981).

Debido a la extrema sensibilidad que existe entre los simbiotes *Rhizobium* y leguminosa, ésta última no tolera la escasés ni el exceso de agua (tensión hídrica e inundación, respectivamente). En el campo, es común encontrar condiciones de inundación, después de que ha llovido; pero en pocos días, el efecto combinado del sol y el aire pueden producir marchitez en las plantas. En general, el sistema simbiótico se recupera después de un corto período de exposición a la tensión hídrica o a la inundación, pero prolongados períodos de tiempo bajo alguna de estas condiciones pueden conducir al daño permanente y a la abscisión de los nódulos (Lil, 1981).

La infección se encuentra restringida en suelos secos a causa de la ausencia de pelos radicales normales, dandose en lugar de estos, pelos radicales cortos y anchos, los cuales son inadecuados para la infección de *Rhizobium*. Bajo condiciones de riego, los pelos radicales anormales pueden recuperar su crecimiento normal, resultando

en una estructura delgada, la cual eventualmente puede ser infectada. Una vez formados los nódulos, bajo condiciones adecuadas de agua, estos pueden ser retardados en su crecimiento si son expuestos a condiciones de sequía, dando un desarrollo parcial de estos, enclavados en la corteza de la raíz (Worrall y Roughley, 1976).

Rathore, et. al. (1981), encontraron que la tensión hídrica (stress hídrico) en soya (*Glycine max* (L.) Merr.) reduce el número de nódulos, el contenido de Leghemoglobina de los nódulos y la incorporación de nitrógeno a la planta. Aunque el número de bacteroides no es afectado (Rathore, et. al., 1981; Worrall y Roughley, 1976), en la planta se ven retardados particularmente los estados de floración y madurez. El efecto de la tensión hídrica es especialmente severa en el estado de floración temprana, en el cual el crecimiento de la planta se reduce en un 50% (Rathore, et. al., 1981).

La significativa reducción en el contenido de Leghemoglobina y la baja acumulación de nitrógeno en el follaje, pueden ser atribuidos a un serio deterioro de la asociación entre los dos simbiositos, donde tanto carbohidratos como agua fueron limitantes. Si la fotosíntesis es afectada por la tensión hídrica, su efecto sobre la fijación de nitrógeno, es obvio. Un bajo suministro de carbohidratos, por lo tanto, puede resultar en un desordenado funcionamiento del microsimbionte, lo cual conduce a la reducción del contenido de Leghemoglobina y el subsecuente bajo contenidos de nitrógeno en el follaje. Es bien conocida la correlación entre estos dos parámetros (Kellin y Smith, 1947).

Peña-Cabriales y Alexander (1979), encontraron que a medida que el suelo pierde agua, la caída de las poblaciones de diferentes especies de *Rhizobium*, presenta un comportamiento bifásico. En la primera fase, el número de células cae rápidamente, y esto coincide con la pérdida mínima de agua del suelo; en la segunda fase, el número de células cae lentamente, coincidiendo con un estado de alta sequedad del suelo. Por otro lado, observaron que en 10 días de déficit de agua en el suelo, el número de células de seis especies de *Rhizobium* [*R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*] y de rizobias del grupo cowpea fueron reducidas en orden de magnitud de dos números logarítmicos, y además no se encontraron diferencias de susceptibilidad entre las rizobias de crecimiento lento y las de crecimiento rápido.

La falta de agua y los subsiguientes humedecimientos del suelo, tienen diferente efecto sobre las distintas especies de *Rhizobium*. Se ha observado que, un día después de haber humedecido suelo que permaneció 21 días bajo déficit de agua, *R. japonicum* y *Rhizobium* del grupo cowpea crecieron considerablemente, en contraste con el nulo crecimiento de *R. meliloti*, o *R. phaseoli* que fue particularmente sensible a la desecación (Peña-Cabriales y Alexander, 1983).

La desecación del suelo y la alta temperatura tienen un marcado detrimento sobre la sobrevivencia de *Rhizobium* (Mahler y Wollum II, 1980; Mahler y Wollum, 1981; Marshall, 1964; Osa-Afiana y Alexander, 1982).

Aunque han sido reportadas las diferencias que existen entre las

especies de *Rhizobium* sensibles a la sequía, el grado de variación dentro de una especie no ha sido establecido (Bushby y Marshall, 1977a).

Osa-Afiana y Alexander (1982) encontraron que tanto en suelo esterilizado como no esterilizado, las cepas de *Rhizobium* difieren ampliamente en su resistencia a la desecación, presentando en general altos porcentajes de sobrevivencia.

Se ha observado que después de un período de desecación del suelo, éste no permanece biológicamente inactivo, ya que se han observado ciertas transformaciones en los microorganismos sobrevivientes, especialmente en bacterias Gram-Negativas, en las cuales se ha detectado la formación de una cubierta de polisacárido extracelular (Kilbertus, et. al., 1979).

Las cepas de *Rhizobium* que se encuentran dentro del grupo de crecimiento lento, han sido consideradas como más resistentes a la desecación, a diferencia de las rizobias del grupo de crecimiento rápido (Bushby y Marshall, 1977a).

Osa-Afiana y Alexander (1982), encontraron que ésta relación la velocidad de crecimiento y la tolerancia a la desecación de las cepas no es muy evidente, ya que cepas de rizobias de crecimiento rápido, fueron también resistentes a la desecación. Encontraron también que, existe una relación entre la sensibilidad a la sequía y la producción de polisacárido extracelular por la cepa. La razón de esta relación no es clara, es posible que el polisacárido sea producido a expensas del material de reserva intracelular y que sea usado du

rante períodos de tensión hídrica.

La reacción fluorescente entre los materiales secretados por las bacterias nodulantes, cuando son sujetas a desecación y rehidratación y el 1 anilo - 8 Naftalen Sulfonato (ANS), sugiere que la muerte de las bacterias está asociada con cambios en la permeabilidad de la membrana. Las bacterias de crecimiento lento y algunas de crecimiento rápido como *Rhizobium meliloti*, difieren de las bacterias de crecimiento rápido del grupo de *R. leguminosarum* en que exhiben poca fluorescencia en presencia de ANS. Esto, probablemente refleja diferencias entre estos grupos de bacterias en la naturaleza polar y no polar de la envoltura externa de las células (Bushby y Marshall, 1977b).

Al estimar la sobrevivencia de *R. trifolii* y *R. japonicum* usando cuatro niveles de humedad (10, 22, 35 y 40%), Osa-Afiana y Alexander (1979), observaron crecimiento en ambas especies bajo los cuatro niveles, pero en el nivel más bajo (10%), detectaron la sobrevivencia más alta. En los niveles de humedad superiores al 10%, en el caso de *R. trifolii*, se hicieron evidentes dos fases en sus curvas de sobrevivencia; en la primera (a las 2 semanas después de la inoculación), ocurrió una drástica disminución en el número de rizobias, pero en la siguiente, la caída fue gradual. Los potenciales de agua de cada nivel de humedad fueron: 8.0, 1.5, 0.1 y 0.02 barías, respectivamente.

El género *Rhizobium* es capaz de soportar potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo más bajo que su propio hospedero y esto es de gran signi

cancia ecológica, ya que la bacteria tiene que sobrevivir prolonga dos periodos de sequía antes de nodular a la leguminosa respectiva (Singleton y Cuautle-Fabián, 1982).

El funcionamiento de los nódulos es severamente restringido por la tensión hídrica. La pérdida de agua por evaporación de la superficie del nódulo y especialmente por la exportación de material nitrógeno de los nódulos hacia el xilema, debe ser compensada, si el nódulo está trabajando bien. Parece que el nódulo incorpora solamente el 13% del agua por su superficie, tomándola del medio, mentras que el resto llega por el floema y por el movimiento lateral del agua de las raíces adyacentes. Esto puede explicar la presencia de nódulos activos en el estrato superior seco del suelo, debido que las raíces tienen acceso al agua de las capas profundas del suelo (Lie, 1981).

El déficit de agua induce una rápida inactivación de la fijación de nitrógeno, pero la actividad puede ser restablecida mediante el riego, si la pérdida de humedad no excede del 20% del peso fresco de los nódulos (Sprent, 1971).

Las plantas, con nódulos de crecimiento meristemático restringido (nódulos esféricos), son más sensibles que las plantas con nódulos elongados, los cuales pueden reiniciar su crecimiento si se suministra agua, debido a que el tejido meristemático se encuentra en el ápice de los nódulos (Engin y Sprent, 1973).

La tensión hídrica aplicada tanto a nódulos sueltos como a raíces noduladas, reduce la fijación de nitrógeno y la respiración; la re-

ducción se da dentro de ciertos límites, proporcional al grado de pérdida de agua de los nódulos (Sprent, 1971).

La tensión hídrica reduce la fijación de nitrógeno en plantas de soya crecidas en macetas con suelo. Considerando que los nódulos retienen algo de actividad, la recuperación bajo riego se alcanza normalmente en una hora. Usando agua tritiada ( $^3\text{HOH}$ ), se ha confirmado que el agua puede ser retenida por los nódulos EN ROUTE de la raíz al sistema aéreo (Sprent, 1972c).

En un ensayo en campo usando *Vicia faba*, se observó que existe un alto grado de correlación entre el contenido de agua del suelo y la fijación de nitrógeno. La máxima fijación de nitrógeno se obtuvo con valores cercanos al riego a capacidad de campo; los valores por arriba del riego a capacidad de campo, abatieron la fijación de nitrógeno debido a la inundación. La tensión hídrica afecta directamente la actividad del nódulo, pero éste efecto puede ser agravado por la disminución en el suministro de fotosintatos de hojas marchitas (Sprent, 1972c).

Durante los períodos de sequía, el daño osmótico para la fijación de nitrógeno puede ocurrir debido a la alta concentración de sales cerca o sobre el nódulo (Sprent, 1972b).

La tensión hídrica sobre nódulos de soya, abate la reducción de acetileno y la incorporación de Oxígeno pero incrementa la evolución del  $\text{CO}_2$  y el etanol. Resultados similares han sido encontrados en nódulos sujetos a inundación (Van Straten y Schmidt, 1974). El efecto de la tensión hídrica puede ser vencido parcial o total-

mente por la incorporación de Oxígeno. Tanto la deficiencia como el exceso de agua pueden abatir la actividad Nitrogenasa (Reducción de acetileno), por restricción del suministro de intermediarios de las rutas aeróbicas. Al mismo tiempo son estimuladas las rutas fermentativas y pueden dirigir la inhibición de concentraciones de etanol ya producidas. Ambos simbiontes poseen sistemas para la producción de etanol (Sprent y Gallacher, 1976).

Se ha observado que la irrigación de las parcelas, después de un período de sequía, incrementa la fijación de nitrógeno más de 10 veces (Sprent, 1976).

La tensión hídrica, reduce en forma severa el crecimiento y desarrollo de los nódulos, abatiéndose también la incorporación de Oxígeno, la reducción de acetileno ( $C_2H_2$ ) y la evolución del  $H_2$ , cuando en los nódulos el potencial de agua ( $\Psi_w$ ) declina de -6 a -18 barias (Jih-Min Sung, 1982).

Han sido propuestas muchas hipótesis para explicar esta relación inversa entre la fijación de nitrógeno y la tensión hídrica. Chi-Ying Huang, et. al., (1975 a y b), concluyeron que la inhibición de la fotosíntesis contribuye para que decline la fijación de nitrógeno por el nódulo. Pankhurst y Sprent (1975) y Sprent (1976) sugiere que el primer efecto de la tensión hídrica sobre el nódulo fue disminuir la incorporación del  $O_2$ , lo cual redujo el suministro de metabolitos disponibles (como el ATP), esenciales para la fijación de nitrógeno.

Chi-Ying Huang, et. al., (1975a), no detectaron reducción de aceti-



leno en suelos inundados ni en suelos secos con potenciales de agua de -19.5 barias. Entre estos extremos, la reducción de acetileno mostró un óptimo bien definido. Al remover el suelo, eliminaron los efectos inhibitorios de la inundación, sugiriendo ésto que, el rango de intercambio gaseoso entre los nódulos y la atmósfera estuvo restringido a potenciales de agua del suelo menores a -2 barias. En el caso de los suelos desecados, el abatimiento en la reducción de acetileno estuvo correlacionado con la disminución de la fotosíntesis y de la transpiración.

La inhibición de la reducción de acetileno causada por bajos potenciales de agua y sus consiguientes efectos, pueden ser reproducidos privando el follaje del  $\text{CO}_2$  atmosférico, aun cuando el suelo permanezca con potenciales de agua que permitirían una rápida reducción de acetileno. La inhibición de la reducción de acetileno a bajos potenciales de agua, entonces, podría ser parcialmente invertida por exposición del follaje a altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  [Chi-Ving Huang, et. al., 1975b].

Ismaili, et. al., (1983), al suspender el riego y así someter al siratro [*Macroptilium atropurpureum*] bajo tensión hídrica, encontraron que cuando los valores de potencial de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo fueron menores a -1.5 MPa, los potenciales de agua de los nódulos fueron mucho más negativos que los del follaje. Los valores de potencial de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo por abajo de -1.5 MPa mermaron el crecimiento de los nódulos y follaje y abatieron los rangos de reducción de acetileno.

La tensión hídrica, también incrementa el gasto respiratorio de los nódulos en la soya (*Glycine max* (L.) Merr.), siendo evidente una relación lineal entre la reducción de acetileno y la incorporación de Oxígeno [Jin-Min Sung, 1982].

Lo anterior nos llevó a plantear los siguientes objetivos e hipótesis.

## IV. OBJETIVO , HIPÓTESIS Y PREMISAS DE TRABAJO

### O B J E T I V O

Evaluar en invernadero la eficiencia de la relación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* L. y mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos bajo condiciones restrictas de humedad (sequía), para lo cual:

1. Se estableció la sequía en los genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. considerando sus valores de Transpiración y Resistencia Estomatal ( $r_s$ ).
2. Se determinó la sobrevivencia de los mutantes de *R. phaseoli* en la rizosfera bajo sequía y riego en tres estados fenológicos de *P. vulgaris* L.: vegetativo, floración y llenado de vaina.
3. Se estimó la capacidad competitiva de los mutantes de *R. phaseoli* introducidos frente a las cepas nativas bajo condiciones de sequía y riego en los mismos estados fenológicos, y
4. Se estimó la Actividad Nitrogenasa de la simbiosis *Rhizobium Phaseoli-Phaseolus vulgaris* L.

### H I P Ó T E S I S

1. La baja disponibilidad de agua es una limitante para el desarrollo normal de la simbiosis *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris* L.

2. La tensión hídrica (estres hídrico) del suelo abate tanto la sobrevivencia como la competitividad de las cepas nativas e introducidas.
3. La tensión hídrica reduce la Actividad Nitrogenasa del sistema simbiótico.

## P R E M I S A S   D E   T R A B A J O

1. Con base en le hábito de crecimiento del frijol, existe compatibilidad entre los tres genotipos de *P. vulgaris* L. usados y las dos cepas de *R. phaseoli* introducidas. La posibilidad que no se de la nodulación, se deberá a otros agentes externos.
2. El suelo de Lomas de Sn. Juan, utilizado en este experimento, no tiene problemas de Mo, Co ó Fe.
3. En el suelo de Lomas de Sn. Juan, el fósforo es un factor limitante, debido a esto, se aplicó una dosis uniforme a todos los tratamientos.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. OBTENCION DE MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

- a). Las cepas de *Rhizobium* fueron crecidas en Caldo de Extracto de Levadura Manitol, CELM (Apéndice I) durante tres días en agitación (120 rpm) a 28°C.
- b). Estos cultivos fueron sembrados sobre placas de Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo, ELMARC (Apéndice II) con diferentes concentraciones de antibiótico (25, 50, 75, 100..µg/ml).
- c). Se seleccionaron colonias obtenidas en la concentración más alta de antibiótico y se cultivaron éstas células en CELM sin antibiótico durante tres días en agitación (120 rpm) a 28°C.
- d). Se inoculó 0.1 ml del cultivo anterior en placas de ELMARC con teniendo una concentración de antibiótico igual de donde se aisló originalmente.
- e). Se aislaron nuevamente colonias típicas y fueron crecidas en medio CELM con la misma concentración de antibiótico y se deja rón crecer en agitación (120 rpm) a 28°C.
- f). Se repitió el paso d.
- g). Esta cepa, fue nuevamente resembrada para inducirle resistencia a concentraciones más altas del mismo antibiótico.

2. PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MARCAJE GENETICO DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.

- a). Las cepas marcadas con antibiótico fueron crecidas en CELM sin antibiótico durante tres días, en agitación (120 rpm) a 28°C.
- b). De cada uno de estos cultivos se elaboraron diluciones decimales.
- c). De cada una de estas diluciones (desde  $10^3$  hasta  $10^9$ ) se inocu-  
laron con 0.1 ml placas de ELMARC que contenían la concentra-  
ción de antibiótico con la que se marcó la cepa en cuestión y  
placas de ELMARC sin antibiótico. Por cada dilución se inocu-  
laron tres placas.
- d). Se consideró que la marca quedó estabilizada cuando en placas  
con antibiótico y sin antibiótico, de la dilución seleccionada,  
creció el mismo número de colonias.

3. EXPERIMENTO PRELIMINAR PARA EVALUAR EN INVERNADERO LA EFECTIVIDAD DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

Para evaluar la efectividad de los mutantes de *R. phaseoli* obtenidos en el laboratorio, se instaló un experimento preliminar en invernadero.

Se emplearon macetas de plástico del Núm.8 con capacidad para 2.5 kg de sustrato, a las que se les adaptó un tubo de vidrio con tapón de baquelita por donde se hicieron los riegos con agua estéril y con Solución Nutritiva Sadman (Apéndice III), alternadamente.

Como sustrato se empleó tezontle estéril.

La siembra se hizo directa usando semillas de frijol (*Phaseolus vul*

garis L.) que previamente fueron desinfectadas con bicloruro de mercurio acidificado. Se mantuvieron dos plantas por unidad experimental.

Diez días después de la siembra, las plántulas fueron inoculadas (al pie del tallo) con 1 ml de suspensión bacteriana conteniendo  $10^9$  células por ml. Se montaron tres unidades experimentales por cada cepa mutada.

La cosecha se realizó cuando el cultivo presentó el 50% de floración.

4. INSTALACION DEL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA FIJACION DE NITROGENO.

A. Descripción del material biológico.

A.1. Genotipos de *Phaseolus vulgaris* L.

Para este experimento fueron empleados tres genotipos de frijol: Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, siendo el primero y el último, genotipos resistentes a sequía (Dr. Larqué-Saavedra, comun. person.).

Negro 150G3. Proviene de una selección individual del frijol Hidalgo 48-A-1. Es una variedad con hábito de crecimiento de guía larga (clasificado como tipo IV, según CIAT).

Algunas de sus características agronómicas son:

Días a floración . . . . .	62
Color de la flor . . . . .	morada
Días a madurez . . . . .	120

Color del grano . . . . . negro brillante  
Distancia entre surcos . . . . . 70 cm  
Kg de semilla/ha para siembra . . . . . 30-35  
Densidad (pl/ha) recomendada . . . . . 95,000

Bayo Durango. Es una variedad usada ampliamente en la zo  
na frijolera de Zacatecas, Durango y Aguascalientes; con  
hábito de crecimiento III. Algunas de sus característi-  
cas agronómicas son:

Días a floración . . . . . 60  
Color de la flor . . . . . blanca y morada  
Días a madurez . . . . . 100  
Color del grano . . . . . café claro

Michoacán 12A3. Esta variedad proviene de una colecta ori  
ginal que se realizó en el Municipio de Briseñas, Michoa-  
cán. Es una variedad de tipo guía corta indeterminado  
(Tipo II, según CIAT). Algunas características agronómi-  
cas son:

Días a floración . . . . . 47  
Color de la flor . . . . . morada  
Días a madurez . . . . . 97  
Color del grano . . . . . negro ópaco  
Distancia entre surcos . . . . . 65 cm  
Plantas/metro lineal . . . . . 10  
Kg de semilla/ha para siembra . . . . . 50  
Densidad (pl/ha) recomendada . . . . . 150,000



A.2. Cepas de *Rhizobium phaseoli*.

Las cepas de *Rhizobium phaseoli* CPMEX1 y CPMEX22, con sus respectivos mutantes, CPMEX1<sub>Str150</sub> (Resistente a 150 µg/ml de Estreptomocina) y CPMEX22<sub>Spe200</sub> (Resistente a 200 µg/ml de Espectinomocina) pertenecen a la Colección Microbiana del Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de Suelos del Centro de Edafología del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México, (Tabla 4).

B. Descripción del suelo de Lomas de Sn. Juan, Texcoco, México.

El suelo de Lomas de Sn. Juan, de acuerdo a *Moreno Dahme (1970)*, es un migajón arcilloso arenoso, con pH ligeramente ácido, sin problemas de sales. Presenta baja cantidad de materia orgánica, un contenido medianamente bajo de fósforo, muy alta concentración de potasio aprovechable un contenido medio de calcio, extremadamente alto en cuanto a magnesio y muy bajo contenido de nitrógeno total (Tabla 5).

Los suelos de Lomas de Sn. Juan, se localizan en la Región Oriental del Valle de México, aproximadamente entre los 19°22'00'' y los 19°48'27'' Latitud Norte y entre los 98°48'27'' y los 98°57'30'' de Longitud Oeste. El clima del Valle de México está clasificado como Cw (*García, 1980*); y el clima de la zona de Chapingo (*García, 1968*) está definido como Cw1b(l'). El significado de ésta clasificación es el siguiente: Subhúmedo con lluvias en verano, con cociente P/T entre 43 y 55, con un porcentaje de lluvia invernal inferior de 5% del total anual (Cw1); templado

TABLA 4. LUGAR DE ORIGEN Y CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS DE *Rhizobium phaseoli* CPMEX1 Y CPMEX22.

DESCRIPCION	CPMEX1	CPMEX22
Clave original:	EL 63	EL 111
Lugar de origen:	Texcaltepec, Hgo.	Las Mesas, Tlax.
Tamaño de nódulos formados:	pequeños	medianos
Velocidad de crecimiento:	2-3 días	3-4 días
Resistencia Intrínseca a Antibióticos:	Furadantina ( 300µg ) Carbencilina ( 50 µg ) Sulfametoxazol ( 25 µg ) Cefalosporina ( 30 µg ) Ac. Nalídixico ( 30 µg ) Ac. Oxonílico ( 10 µg ) Cloranfenicol ( 30 µg )	Furadantina ( 300µg ) Ac. Oxonílico ( 10 µg ) Cloranfenicol ( 30 µg )
Producción de Acido o Alcalí:	Acido	Acido
Reacción a la Leche Tornasolada:	Formación de ligera zona de suero.	Formación de ligera zona de suero.
Tolerancia al NaCl:	Negativa.	Negativa.

RODRIGUEZ Y FERRERA-CERRATO, 1984; Y COMUN. PERS.

TABLA 5. ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL SUELO DE LOMAS DE SN. JUAN, TEXCOCO, MEXICO, QUE ES UN MIGAJOON ARCILLOSO, UTILIZADO EN EL EXPERIMENTO DE INVERNADERO.

PROPIEDADES DEL SUELO	VALORES Y CONCENTRACION	
Textura	Arena	50%
	Limo	23%
	Arcilla	27%
Reacción pH	6.40	
Conductividad eléctrica	0.35 (mohms/cm a 25° C)	
Materia Orgánica		1.57 ppm
	Fósforo	0.74 ppm
	Potasio	196 ppm
	Calcio	1706 ppm
	Magnesio	492 ppm
	Sodio	124 ppm
	Nitrógeno total (Nt)	0.06 ppm

ANALISIS REALIZADO EN 1983, EN LA SECC. DE QUIMICA DE SUELOS, CEDAF-COLEGIO DE POSGRADUADOS, CHAPINGO, MEXICO.

con verano fresco largo, temperatura media anual entre 12°C y 18°C, temperatura media del mes más caliente entre 5.5 y 22°C (b); con poca oscilación anual de las temperaturas y precipitaciones promedio mensuales registradas en la Estación Meteorológica de Chapingo, México, durante un período de 10 años (c').

C. Preparación de las unidades experimentales.

Se emplearon macetas de plástico del número 12 con capacidad para 8.5 kg de sustrato. Estas fueron horadadas en su base para facilitar el drenaje y provistas de un tutor para permitir el enredamiento de las plantas.

Se determinó el contenido de humedad del suelo, secando diez muestras de éste a 105°C durante 24 hrs., y se calculó el riego a capacidad de campo para 8.5 kg de sustrato.

D. Determinación del número más probable (NMP) de rizobias por gramo de suelo de Lomas de Sn. Juan.

Para ésta determinación se empleó la técnica de infección en planta (Vincent, 1975). Las bolsas de crecimiento (growth pouch) fueron substituídas por las Unidades de Crecimiento CP (Apéndice IV) diseñadas en este Laboratorio de Microbiología (Guzmán-Plazola, et. al., 1983).

Dichas Unidades de Crecimiento están constituídas por un frasco de vidrio transparente de 6 cm de diámetro y 11 cm de altura al que se le agregó tezontle (con un diámetro de partícula menor o igual a 2 mm) previamente lavado. Estos recipientes poseen además una tapa de rosca metálica la cual lleva dos ranuras laterales continuas (de 1.5 x 0.5 cm) por las cuales se introdu-

cen asépticamente las radículas de las plantas pregerminadas en Agar-Agua (10-12 g de Agar en 1000 ml de agua). Por último, la tapa lleva en el centro un tubo, cuya finalidad es permitir el riego con agua o Solución Nutritiva estériles sin abrir la unidad. Para evitar la contaminación, éste tubo lleva un tapón de baquelita forrado con papel aluminio. Antes de trasplantar, las unidades completas son esterilizadas a 18 libras durante 2.5 hrs.

Después de trasplantar y de agregar la alícuota de dilución de suelo correspondiente, las ranuras de la tapa fueron cubiertas con algodón estéril. Se prepararon diluciones decimales (desde  $10^1$  hasta  $10^9$ ) y se agregó 1 ml de cada dilución por unidad en los controles se agregó solamente una alícuota de agua estéril. Se mantuvo una sola planta por Unidad de Crecimiento, montándose tres Unidades por cada dilución. Todas las Unidades fueron crecidas bajo condiciones de invernadero, a una temperatura que fluctuó entre 24 y 29°C, vigilándose la humedad de estas para evitar la desecación de las plántulas. Después de 21 días, las raíces de las plantas fueron examinadas para determinar si hubo o no nodulación. Finalmente, se calculó el valor del NMP con la ayuda de las Tablas correspondientes (Vincent, 1975).

#### E. Preparación del inoculante.

Cada mutante de *Rhizobium phaseoli* fue crecido en medio CELM (Apéndice I), agregando 30 ml de éste en botellas de dilución. Las botellas inoculadas fueron incubadas en agitación a 28°C

durante cinco días. Al final de este período, la densidad óptica de cada cultivo fue medida con la Escala de Mc Farland (Apéndice V) para obtener una concentración de  $10^9$  células/ml.

#### F. Fertilización, siembra e inoculación.

Como resultado del bajo contenido de fósforo del suelo de Lomas de Sn. Juan, todas las unidades experimentales fueron fertilizadas con 60 kg de P/ha. Los controles nitrogenados fueron fertilizados con 60 kg N/ha. En cada caso, el fertilizante fue disuelto en 20 ml de agua y aplicado junto con el riego. Como fertilizante se emplearon:  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , respectivamente.

La siembra se hizo por trasplante. Antes de la siembra, las unidades experimentales fueron regadas a capacidad de campo. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente poniéndolas en alcohol etílico al 95% durante 20 segundos, después enjuagadas con agua estéril y pasadas a una solución de Biclورو de Mercurio acidificada (1g  $\text{HgCl}_2$ ; 5 ml HCl; 1 000  $\text{H}_2\text{O}$ ) durante un minuto. Finalmente, fueron enjuagadas cinco veces con agua destilada estéril y puestas a germinar sobre placas de Agar-Agua (10-12 g de Agar en 1 000 ml de agua) durante 3 días (Somasegaran, *et. al.*, 1981).

La inoculación se hizo simultáneamente en el momento del trasplante aplicando 1 ml de la suspensión bacteriana en la raíz de la plántula. Inmediatamente después de la inoculación, la raíz fue cubierta con el sustrato, evitando así el efecto de-

letero de la luz sobre las rizobias. Finalmente, se montaron también los controles absolutos (no inoculados ni fertilizados).

G. Aplicación de la sequía en las plantas.

La sequía fue dada a las plantas suspendiendo el riego. Después de aplicado el último riego a capacidad de campo, en los tratamientos bajo sequía, se registró periódicamente la Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) y la Transpiración empleando un Porómetro (STEADY STATE POROMETER MODEL LI-1600) hasta que las plantas presentaron valores de  $r_s$  y Transpiración correspondientes a sequía:  $30 \text{ seg cm}^{-1}$  y  $1 \mu\text{g H}_2\text{O cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ , respectivamente (Navarro, 1984).

Simultáneamente fueron medidas la  $r_s$  y la Transpiración de los tratamientos bajo riego a capacidad de campo, pesando las macetas cada dos o tres días y aplicando la cantidad de agua faltante. Las mediciones de  $r_s$  y Transpiración se hicieron a las 12:00 hrs., sobre el trifolio central de la última hoja completamente expuesta. La sequía fue aplicada, en cada cultivar, en tres estados fenológicos (estado vegetativo, floración y llenado de vaina).

H. Tiempo de cosecha y procesamiento del material vegetal.

La cosecha se realizó entre 3 y 5 días después de que se alcanzaron los valores de  $r_s$  y Transpiración correspondientes a sequía. Cada genotipo fue cosechado en tres estados fenológicos (estado vegetativo, floración y llenado de vaina). La Tabla 6, muestra la edad de las plantas, de cada genotipo, en el momento

de la cosecha. El material vegetal cosechado (Follaje, Raíz y Nódulos Totales) fue secado (a 70°C durante 72 hrs.) e inmediatamente pesado.

TABLA 6. EDAD DE LAS PLANTAS (DIAS) AL MOMENTO DE LA COSECHA EN CADA ESTADO FENOLOGICO.

G E N O T I P O	ESTADO FENOLOGICO		
	ESTADO VEGETATIVO	FLORACION	LLENADO DE VAINA
Negro 150G3	30	84	112
Bayo Durango	30	61	98
Michoacán 12A3	30	61	98

I. Determinación de los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) de la planta y del suelo.

Para determinar el Potencial de Agua de la planta se empleó una bomba de Presión (SOIL MOISTURE EQUIPMENT CORPORATION) en la -- cual se colocó, inmediatamente después de cortado, el trifolío i n v e r t i d o , de tal forma que la parte seccionada quedó hacia arriba y fuera de la bomba. Por último, ésta fue cerrada herméticamente y se aplicó flujo lento de aire a presión hasta que comenzaron a aparecer burbujas en la superficie del peciolo donde se hizo el corte; la presión ejercida sobre el peciolo se registró simultáneamente en un manómetro. Esta presión fue considerada como el Potencial de Agua ( $\Psi_w$ ) de la planta, es decir, la presión que impulsó al agua del xilema hacia afuera (Larqué-Saavedra, 1980). El potencial de agua de la planta se registró en varias.

El potencial de agua fue determinado por el método Psicrométrico de punto de Rocío (Larqué-Saavedra, 1980), empleando una Cámara C-52 (WESCOR INC.) la cual va conectada a un Voltímetro de punto de Rocío (HR-33T WESCOR INC.). Dentro de la Cámara se colocó la muestra de suelo, en el momento de la cosecha, luego fue cerrada y se dejó equilibrar la humedad relativa durante 15 minutos para después obtener los valores de  $\Psi_w$  en microvolts. Finalmente, estos valores fueron divididos por una constante para convertirlos a barías.

J. Determinación del número de rizobias por gramo de suelo de la rizosfera.

En el momento de la cosecha fueron tomadas muestras de suelo (10g) de la rizosfera de cada genotipo, con las cuales se elaboraron diluciones decimales (desde  $10^1$  hasta  $10^9$ ), sembrándose una alícuota de 0.1 ml de cada dilución en placas de medio ELMARC (Apéndice II) conteniendo la correspondiente concentración de Estreptomicina (150  $\mu\text{g/ml}$ ) o Espectinomicina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) y Actidiona (40  $\mu\text{g/ml}$ ) en ambos casos, para evitar el crecimiento de hongos.

Las placas fueron incubadas a 28°C de 3 a 5 días y finalmente leídas en un contador de colonias (DARKFIELD QUEBEK/AMERICAN OPTICAL).

K. Estimación del porcentaje de competencia de las cepas introducidas.

En el momento de la cosecha, las raíces noduladas fueron lavadas perfectamente para eliminar el suelo y la contaminación superfi-



cial gruesa. De cada planta, se tomó al azar el 40% de los nódulos formados, dejándole a cada nódulo 0.5 cm de raíz a cada lado del sitio de unión, para manipularlos fácilmente con pinzas, reduciendo así el riesgo de dañarlos.

Los nódulos fueron sumergidos de 1 a 5 segundos en etanol al 95%, y en seguida, transferidas a una solución de Bicloruro de Mercurio acidificada (1g HgCl<sub>2</sub>; 5 ml HCl; 1 000 ml de H<sub>2</sub>O) durante cuatro minutos. Por último, se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.

Los nódulos esterilizados fueron colocados, cada uno, en cavidades de placas usadas para pruebas hematológicas (TEST PLATES. LINBRO IS-MRC-96-CLEAR) y maceradas en una alícuota de agua destilada estéril (Ferra-Cerrato y López-Alcocer, 1985).

De cada macerado, se tomó una impronta y se colocó en placas de medio ELMARC (Apéndice II) sin y con antibiótico (150 µg/ml de Estreptomina ó 200 µg/ml de Espectinomicina).

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 8 ó 10 días, después de los cuales se leyeron, estableciéndose finalmente el % de nódulos que fueron formados por los mutantes CPME<sup>1</sup><sub>Str150</sub> y CPME<sup>22</sup><sub>Spe200</sub>.

#### L. Determinación de la actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa de los tratamientos bajo riego y sequía de los tres genotipos, se determinó por el método de Reducción de Acetileno (Dilworth, 1966; Scholhorn y Burris, 1967).

Las raíces noduladas se separaron de la parte aérea y se sacudieron levemente para dejarlas libres de suelo. Estas se depositaron en recipientes de plástico (de 1 200 cc de capacidad) los cuales fueron cerrados herméticamente. El 10% de la fase gaseosa de los recipientes fue reemplazada con Acetileno ( $C_2H_2$ ). Las raíces noduladas fueron incubadas por un período de 2 hrs., tomándose en seguida muestras de 2 cc de gas y guardadas en tubos al vacío (VACUTAINER B-D). Las muestras fueron corridas en un Cromatógrafo de Gases Varian Modelo 1440, con Detector de Ionización de Flama de Hidrógeno y una Columna de acero inoxidable de 2 metros de largo y 1/8 de pulgadas de diámetro, empacada con Porapak N, para determinar la cantidad de Etileno ( $C_2H_4$ ) producido.

M. Descripción de tratamientos y diseño experimental.

Cada uno de los tres genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. (Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3) utilizados, fueron sometidos a las siguientes condiciones:

- a). Cuatro fuentes de Nitrógeno: Cepa CPME<sup>X</sup>1<sub>Str</sub>150  
Cepa CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe</sub>200  
0 Kg N/ha  
60 Kg N/ha
- b). Dos niveles de Humedad: Riego  
Sequía

c). Tres momentos o épocas de cosecha: Estado vegetativo  
Floración  
Llenado de vaina

El número de tratamientos fue 72, con 3 repeticiones cada uno, dando un total de 216 unidades experimentales. El experimento se realizó en condiciones de invernadero, usando macetas con suelo procedente de campo donde se ha cultivado maíz y frijol, bajo un diseño experimental completamente al azar.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. OBTENCION Y EVALUACION DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI.

De los mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos obtenidos en el laboratorio, se seleccionaron dos: CPME<sup>1</sup><sub>Str150</sub> y CPME<sup>2</sup><sub>Spe200</sub>, los cuales al ser evaluados en invernadero, presentan los valores más altos en la producción de follaje, raíz y número de nódulos efectivos (Cuadro 1), en relación a los demás mutantes y cepas parentales (Wild type).

CUADRO 1. EVALUACION EN INVERNADERO DE LOS MUTANTES DE *R. phaseoli* RESISTENTES A ANTIBIOTICOS USANDO LA VARIEDAD DE *Phaseolus vulgaris* L. NEGRO 150G3.

C E P A	PESO SECO DE FOLLAJE $\bar{x}$	PESO SECO DE RAIZ $\bar{x}$	NUMERO DE NODU LOS EFECTIVOS $\bar{x}$
CP MEX <sup>1</sup> <sub>w.t.</sub>	2.52 a	0.62 a	200.14 a
CP MEX <sup>1</sup> <sub>Str150</sub>	<u>3.02 b</u>	<u>0.66 a</u>	<u>375.36 b</u>
CP MEX <sup>2</sup> <sub>w.t.</sub>	2.89 a	0.76 a	208.75 a
CP MEX <sup>2</sup> <sub>Str200</sub>	2.56 b	0.66 b	174.73 b
CP MEX <sup>2</sup> <sub>Spe100</sub>	2.61 b	0.61 b	181.69 b
CP MEX <sup>2</sup> <sub>w.t.</sub>	1.85 a	0.64 a	144.31 a
CP MEX <sup>2</sup> <sub>Str300</sub>	1.79 a	0.60 a	106.88 b
CP MEX <sup>2</sup> <sub>Spe200</sub>	<u>2.10 b</u>	<u>0.68 a</u>	<u>150.50 a</u>

LAS CIFRAS CON LETRAS IDENTICAS SON ESTADISTICAMENTE IGUALES

(Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

w.t. = Cepa parental o silvestre (Wild type)

Str = Resistente a Estreptomycin (µg/ml)

Spe = Resistente a Espectinomycin (µg/ml)

En el cuadro anterior se observa que, contrariamente a lo que han reportado algunos autores (Zelazna-Kowalaska, 1971; Kleczkowska, 1971), la Resistencia a antibióticos no necesariamente abatió la efectividad de las cepas sino que incluso, en algunos casos, la incrementó.

Sin embargo, es importante revisar con regularidad la efectividad de los mutantes de *Rhizobium* resistentes a antibióticos antes de usarlos en algún experimento.

El hecho de que los dos mutantes de *R. phaseoli* seleccionados, hayan sido reaislados con éxitos de nódulos del hospedero inoculado, crecido tanto en medio hidróponico como en suelo sugiere que el uso de trazadores resistentes a antibióticos, puede considerarse igualmente confiable que el uso de marcadores antigénicos (Brockwell, et. al., 1977).

Por otro lado, la presencia de mutantes espontáneos resistentes a altas concentraciones de antibiótico en el suelo, por transferencia de un plásmido, es improbable, ya que el suelo no constituye una presión selectiva para que se de dicha mutación. Esto último, también ha sido sugerido por Hale (1978).

2. COMPORTAMIENTO ESTOMATAL DE LOS TRES GENOTIPOS DE PHASEOLUS VULGARIS L. BAJO RIEGO Y SEQUIA.

A. En estado vegetativo.

En las Figs. 1, 2 y 3 se muestran graficados los valores de Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) y Transpiración (Apéndice VI) de los

genotipos Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, durante el estado vegetativo, respectivamente. Se encontró que, una vez suspendido el riego, en los tratamientos bajo sequía, la Transpiración comenzó a elevarse, debido posiblemente a un aumento en la temperatura de la hoja, que alteró los gradientes de vapor de agua dentro y fuera de esta (Meidner y Sherif, 1976; citados por Larqué-Saavedra, et. al. 1982). Posteriormente se presentó una disminución drástica de la Transpiración, debida al cierre de los estomas como respuesta al déficit de agua en la planta (Harrison y Walton, 1975; Jones, 1978).

Por otra parte, la  $r_s$  de las plantas bajo sequía, después de mantenerse en valores por abajo de  $3 \text{ seg} \cdot \text{cm}^{-1}$ , se elevó automáticamente cuando la planta comenzó a transpirar  $1 \mu\text{g}$  ó menos de  $1 \mu\text{g}$  de  $\text{H}_2\text{O} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ . El déficit de agua en el suelo y el aire seco del ambiente propiciaron el incremento de la Resistencia Estomatal (Schulze, et. al., 1972).

Los valores de  $r_s$  y Transpiración que Nava (1984) consideró como valores equivalentes a sequía o tensión hídrica, trabajando con *Phaseolus vulgaris* L. ( $30 \text{ seg} \cdot \text{cm}^{-1}$  y  $1 \mu\text{g} \text{H}_2\text{O} \text{ cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ , respectivamente), fueron obtenidos a los 11 días después de suspendido el riego, por el genotipo Negro 150G3 y a los 12 días por los genotipos Bayo Durango y Michoacán 12A3.

La  $r_s$  y la Transpiración de los tres genotipos bajo riego a capacidad de campo, se mantuvieron con ligeras oscilaciones, debidas a las variaciones de temperatura y humedad relativa (Kramer,

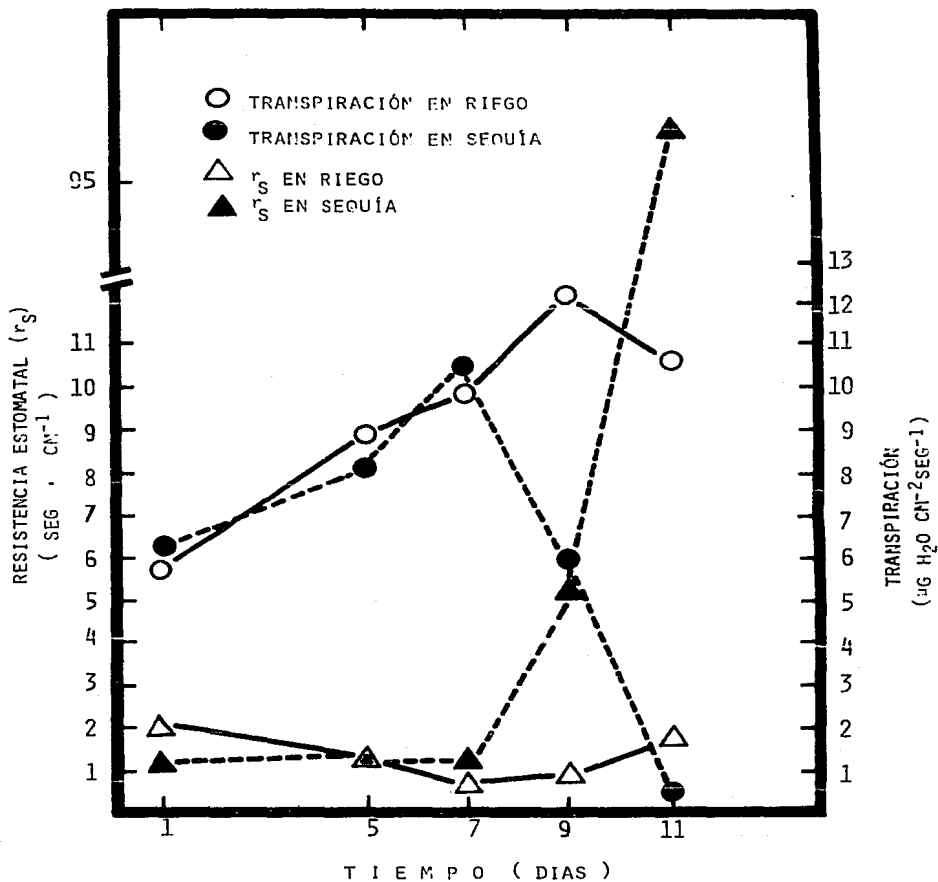


FIG. 1 TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) EN LA VARIEDAD NEGRO 150 G3 DURANTE EL ESTADO VEGETATIVO, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ÚLTIMA HOJA. CADA PUNTO CORRESPONDE DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

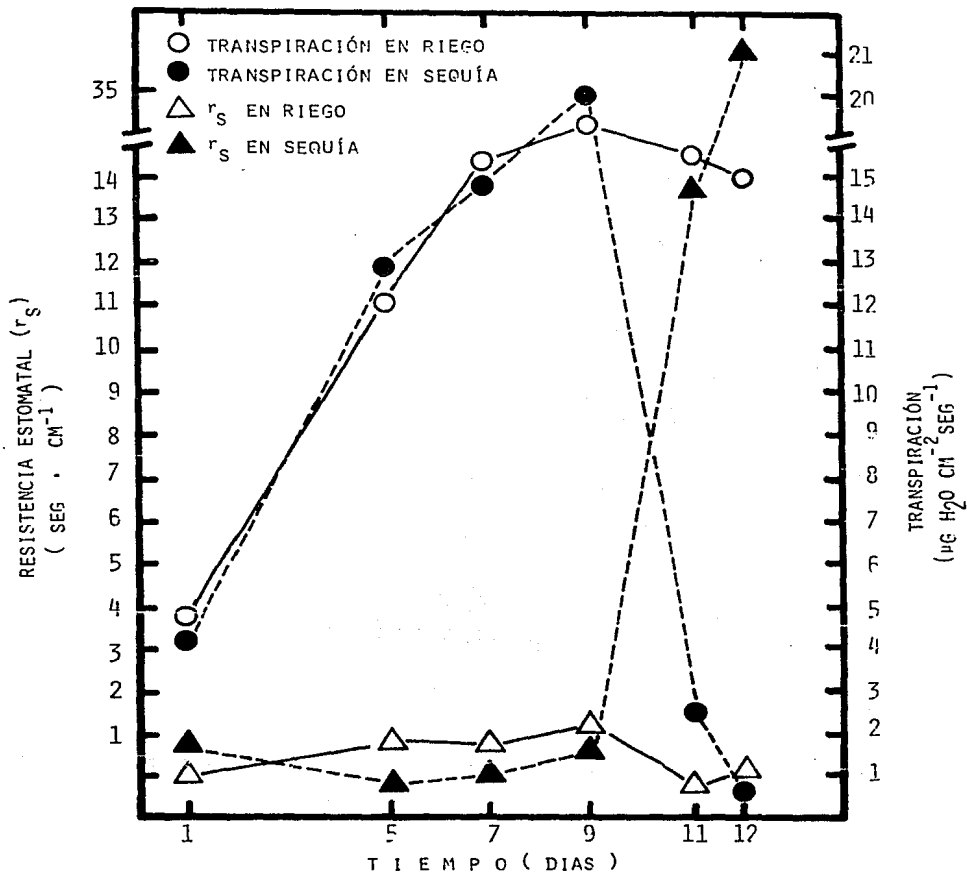


FIG. 2 TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) EN LA VARIEDAD BAYO DURANGO DURANTE EL ESTADO VEGETATIVO, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.



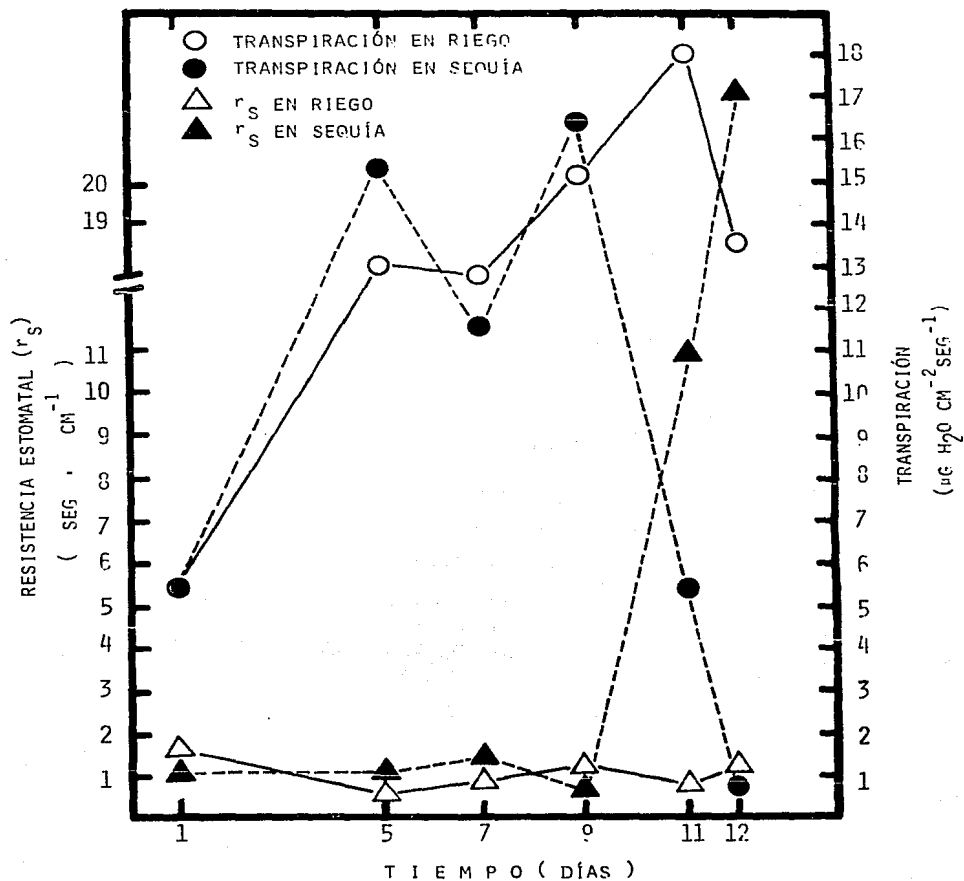


FIG.3. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD MICHOCACÁN12A<sup>3</sup> DURANTE EL ESTADO VEGETATIVO, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

1974) que se presentaron en el invernadero a lo largo del experimento.

#### B. En floración

En las Figs. 4, 5 y 6 se muestran graficados los valores de Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) y Transpiración (Apéndice VII), de los genotipos Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, durante la floración, respectivamente.

A diferencia del estado vegetativo, los valores de  $r_s$  y Transpiración equivalentes a la sequía durante la floración, fueron alcanzados por los tres genotipos, en un período de tiempo más coto, 8 días después de suspendido el riego. Esto se debió, posiblemente, a la plasticidad que presentan las plantas en períodos de desarrollo temprano, para soportar por más tiempo la tensión hídrica. *Villareal y Larqué-Saavedra (1981)*, trabajando con aplicación de 1 a 3 tratamientos de sequía a plántulas de frijol antes del trasplante, encontraron que dos períodos drásticos de sequía durante ésta etapa de crecimiento, no repercutieron en la producción final de la planta.

La Transpiración de los tres genotipos bajo sequía, no se elevó una vez que se suspendió el riego, sino que desde el primer día, ésta comenzó a disminuir. La inmediata disminución de la Transpiración durante la floración, puede explicarse como una rápida respuesta de la planta, que cierra sus estomas para economizar agua, ya que es precisamente durante este período, donde la planta necesita una fotosíntesis eficiente, para la elaboración de

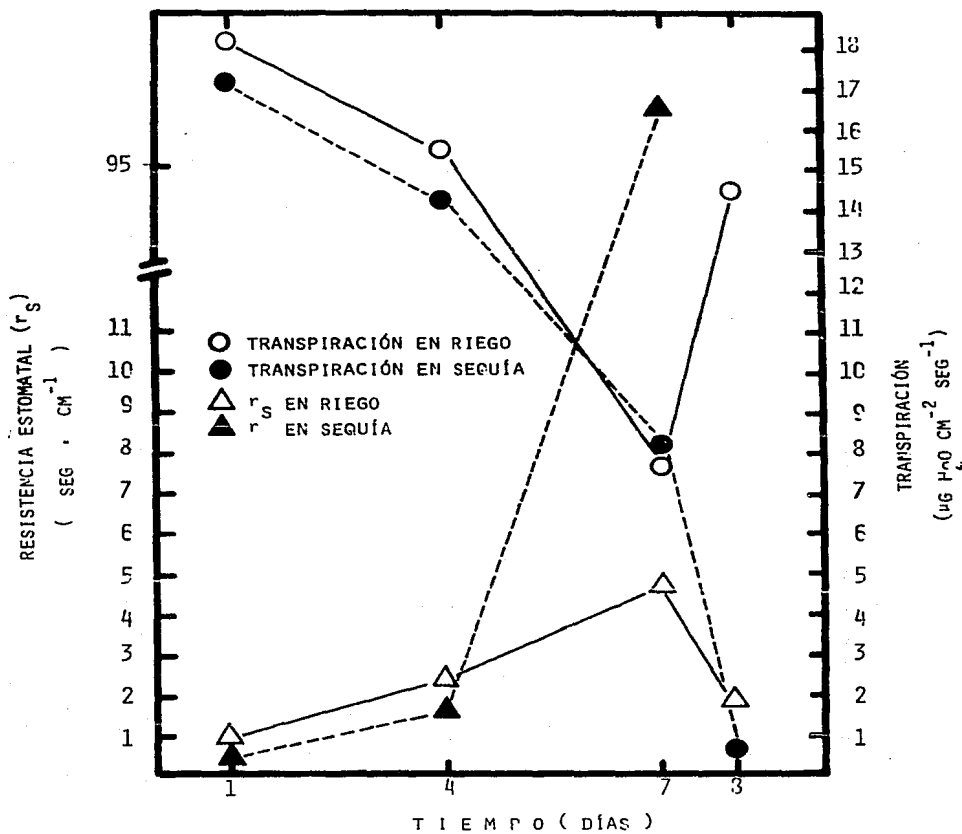


FIG. 4. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD NEGRO 150 G3 DURANTE LA FLORACIÓN, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

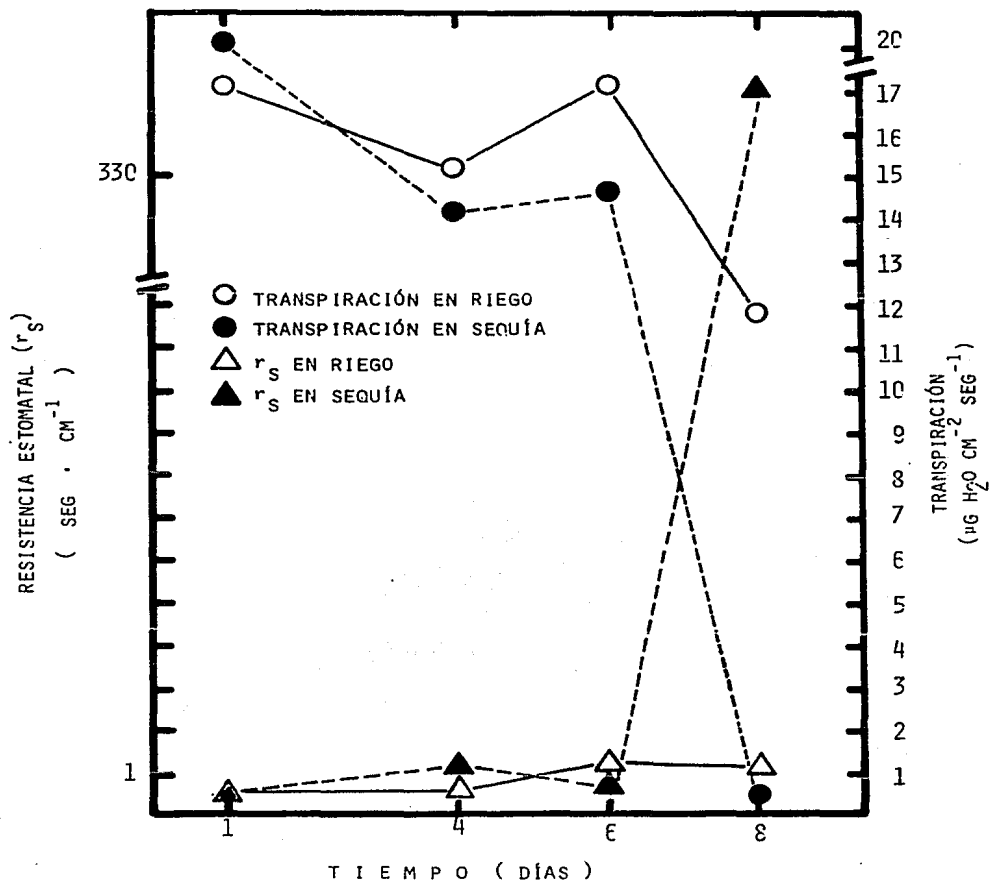


FIG. 5. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD BAYO DURANGO DURANTE LA FLORACIÓN, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

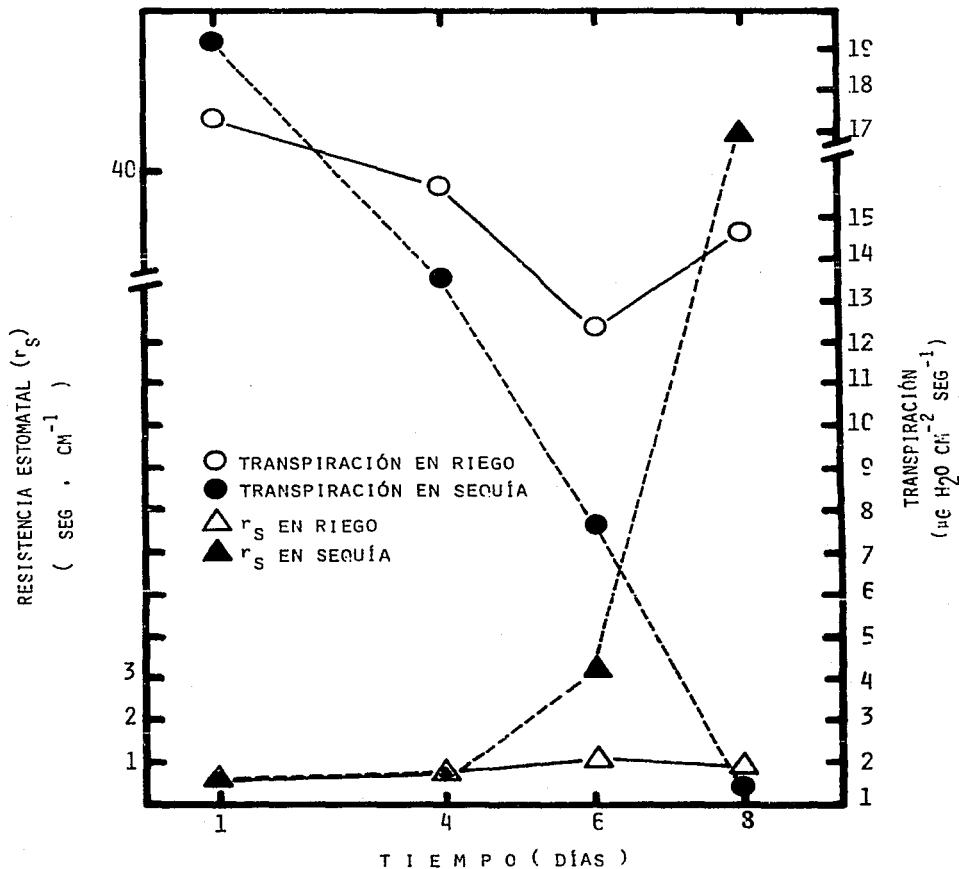


FIG. 6. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD MICHOCAN 12A3 DURANTE LA FLORACIÓN, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

carbohidratos que participarán en la formación y en el llenado de vaina. Rathore, et. al. (1981), por otro lado, observaron que la tensión hídrica es severa durante este período, ya que además de retardar la floración, redujo el crecimiento de la planta en un 50%.

C. En Llenado de vaina.

En las Figs. 7, 8 y 9 se muestran graficados los valores de Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) y Transpiración (Apéndice VIII), de los genotipos Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, durante el llenado de vaina, respectivamente.

Se encontró que los valores equivalentes a sequía, fueron alcanzados a los 7, 8 y 6 días después de suspendido el riego, en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, respectivamente. En términos generales, puede observarse que, la sensibilidad a la sequía fue menor, media y mayor en los estados vegetativo, floración y llenado de vaina, respectivamente.

Con la finalidad de estandarizar las lecturas prométricas, la  $r_s$  y la Transpiración fueron medidas siempre a las 12:00 hrs. sobre el trifolio central de la última hoja.

3. POTENCIALES DE AGUA ( $\Psi_w$ ) DEL SUELO Y LA PLANTA OBTENIDOS AL MOMENTO DE LA COSECHA.

En el Cuadro 2, se muestran los Potenciales de Agua ( $\Psi_w$ ) del suelo y la planta, de los tres genotipos, en cada uno de los estados fenológicos, al momento de la cosecha.

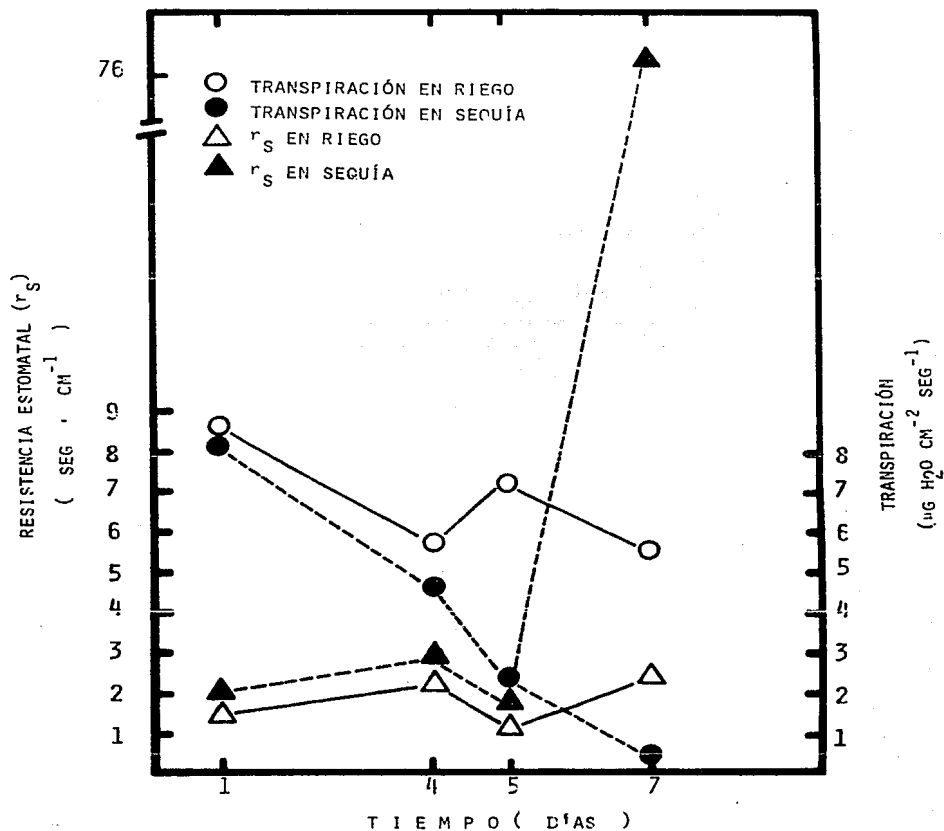


FIG. 7. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD NEGRO 150 G3 DURANTE EL LLENADO DE VAINA, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ÚLTIMA HOJA. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

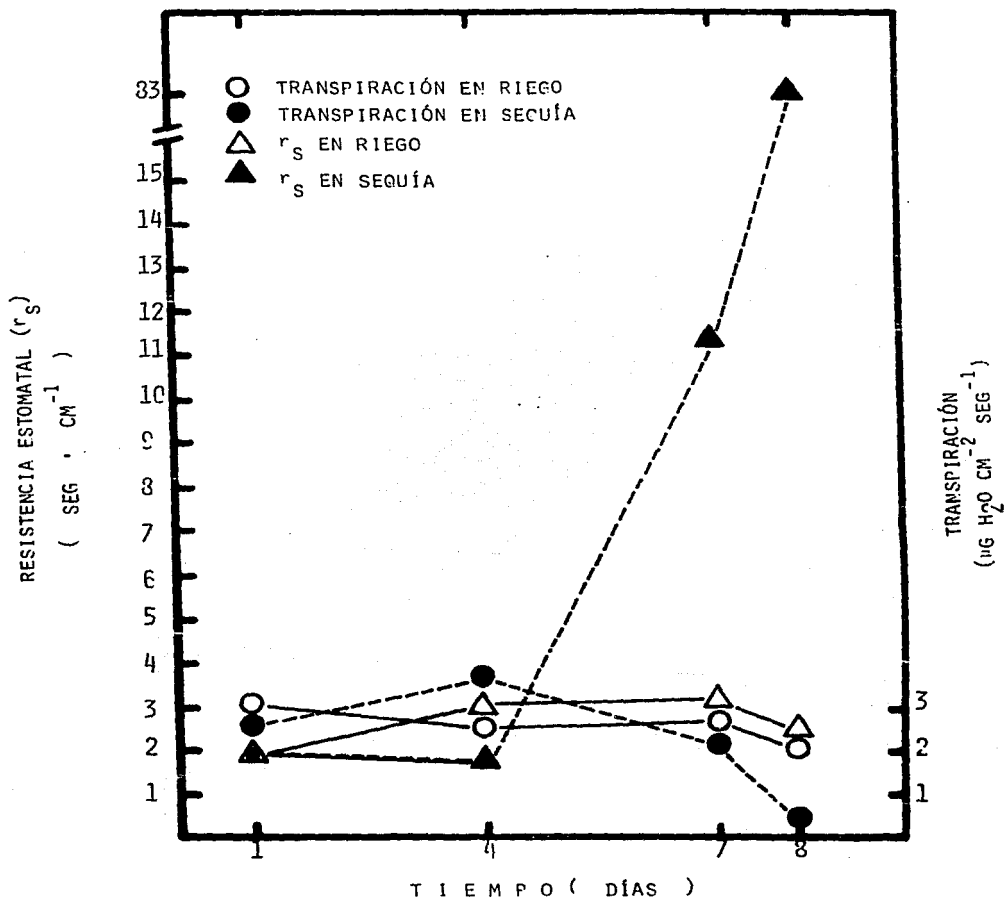


FIG. 8. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD BAYO DURANGO DURANTE EL LLENADO DE VAINA, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.



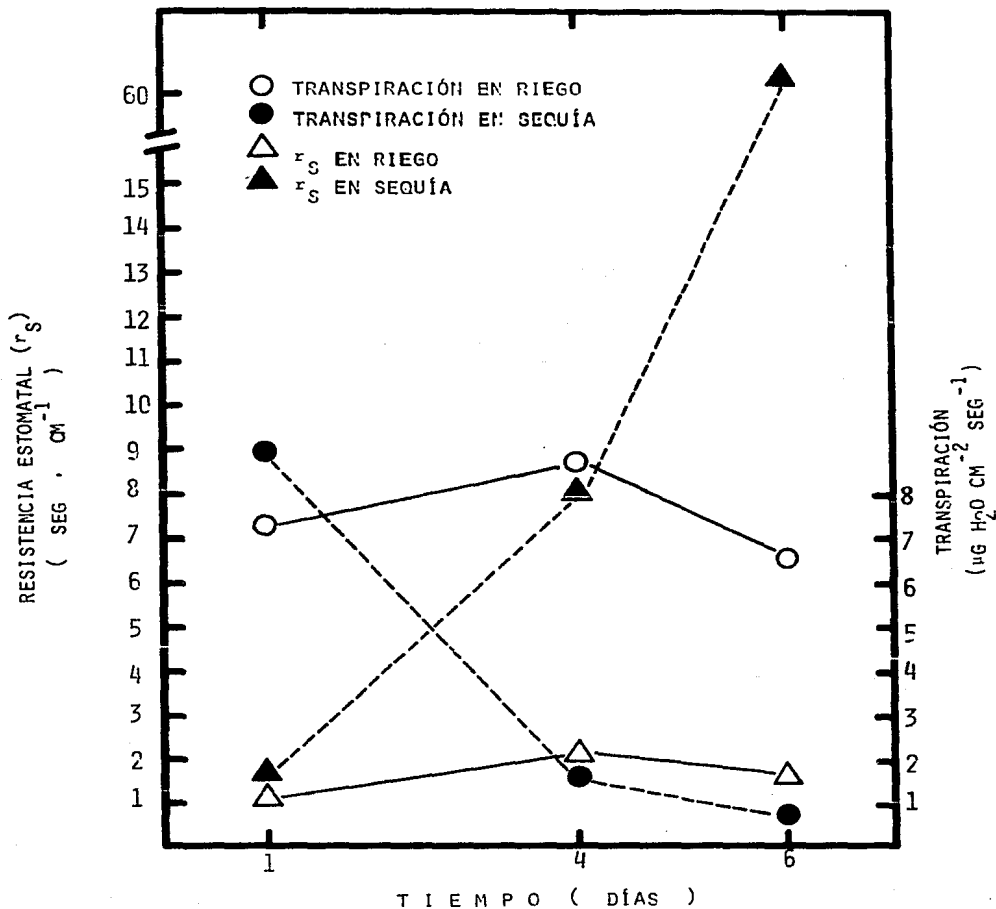


FIG. 9. TRANSPIRACIÓN Y RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) DE LA VARIEDAD MICHOCÁN 12A3 DURANTE EL LLENADO DE VAINA, MEDIDAS A LAS 12:00 HRS., SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ÚLTIMA HOJA. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

CUADRO 2. POTENCIALES DE AGUA\* ( $\Psi_w$ ) DEL SUELO Y DE LA PLANTA BAJO RIEGO Y SEQUIA EN EL MOMENTO DE LA COSECHA.

G E N O T I P O	ESTADO FENOLOGICO	NIVEL DE HUMEDAD	$\Psi_w$ (barias)		
			PLANTA	SUELO	
NEGRO 150G3	ESTADO VEGETATIVO	RIEGO	- 7.8	- 0.33	
		SEQUIA	- 3.5	-16.0	
	FLORACION	RIEGO	- 3.9	- 0.60	
		SEQUIA	- 3.2	-20.21	
	LLENADO DE VAINA	RIEGO	- 5.9	- 1.20	
		SEQUIA	- 3.8	-21.66	
	BAYO DURANGO	ESTADO VEGETATIVO	RIEGO	-10.4	- 1.00
			SEQUIA	- 3.0	-25.82
FLORACION		RIEGO	- 5.6	- 0.40	
		SEQUIA	- 3.1	-16.00	
LLENADO DE VAINA		RIEGO	- 6.8	- 2.00	
		SEQUIA	- 2.4	-21.33	
MICHOACAN 12A3		ESTADO VEGETATIVO	RIEGO	- 9.7	- 1.34
			SEQUIA	- 3.8	-15.9
	FLORACION	RIEGO	-10.7	- 1.46	
		SEQUIA	- 4.4	-17.5	
	LLENADO DE VAINA	RIEGO	- 9.4	- 1.37	
		SEQUIA	- 5.2	-26.66	

\*CADA CIFRA CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE 2 UNIDADES EXPERIMENTALES.

Se observó que, a medida que la planta agotó el agua del suelo, después de suspendido el riego, el potencial de agua del suelo disminuyó en todos los casos, hasta valores por abajo de -15 barías.

Este punto, denominado "punto de marchitez permanente" (PMP), representa el límite de sequedad del suelo y el potencial de agua más allá del cual, el mecanismo de la planta para mantener el equilibrio de agua, deja de ser efectivo (Sutcliffe, 1968; Ray, 1980; Winter, 1981).

Se encontró, por otro lado, que los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) de la planta, bajo tensión hídrica, permanecieron menos negativos que los valores de las plantas bajo riego; es decir, ninguna planta bajo sequía, presentó pérdida total de la turgencia; aunque al momento de la cosecha se empezaron a ser evidentes los síntomas de marchitez.

4. EFFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES: NITROGENO, HUMEDAD, VARIEDAD Y ESTADO FENOLOGICO.

A. Efecto en la producción de peso seco de follaje.

En el Cuadro 3, se presenta el efecto de las fuentes principales en la producción de peso seco de follaje (g). Se encontró que la mejor fuente de nitrógeno, en seguida de la fertilización con 60 kg N/ha, fue la cepa CPME<sub>X1</sub>Str<sub>150</sub>, que superó a la cepa CPME<sub>X22</sub>Spe<sub>200</sub> en un 8.9%.

El efecto de la sequía fue estadísticamente significativo, reduciendo la producción de follaje en un 20.5%, en contraste con el

CUADRO 3. EFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE FOLLAJE (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM PHASEOLI* - *PHASEOLUS VULGARIS* L.

FUENTE PRINCIPAL		$\bar{x}$
NITROGENO	60 kg N/ha	16.349 a
	CP MEX1 <sub>Str150</sub>	13.021 b
	CP MEX22 <sub>Spe200</sub>	11.859 c
	0 kg N/ha	9.675 d
HUMEDAD	RIEGO	14.067 a
	SEQUIA	11.178 b
VARIEDAD	NEGRO 150G3	18.662 a
	BAYO DURANGO	10.686 b
	MICHOACAN 12A3	6.465 c
ESTADO FENOLOGICO	LLENADO DE VAINA	20.428 a
	FLORACION	16.918 b
	EDO. VEGETATIVO	3.122 c

LAS MEDIDAS CON LETRAS IDENTICAS SON ESTADISTICAMENTE IGUALES (Tukey,

$\alpha = 0.05$ ).

riego. Rathore, et. al., (1981), encontraron el mismo efecto trabajando con soya (*Glycine max* (L.) Merr.).

La variedad más exitosa en la producción de follaje fue la Negro 150G3 (con hábito de crecimiento IV), a diferencia de las variedades Bayo Durango (con hábito de crecimiento III) y Michoacán 12A3 (con hábito de crecimiento II), siendo ésta última la que presentó la menor producción. Las tres variedades fueron estadísticamente diferentes entre sí.

La producción más alta de follaje se obtuvo en el llenado de vaina, siguiendo en orden decreciente, la floración y el estado vegetativo. Los tres estados fenológicos fueron estadísticamente diferentes entre sí.

En el Apéndice IX, se muestra el Análisis de Varianza de la variable de respuesta peso seco de follaje.

#### B. Efecto en la producción de peso seco de raíz.

En el Cuadro 4, se muestra el efecto de las fuentes principales en la producción de peso seco de raíz (g). Se encontró que, en seguida de la fertilización con 60 Kg N/ha, ambas cepas, CPME<sup>1</sup><sub>Str150</sub> y CPME<sup>2</sup><sub>Spe200</sub>, estadísticamente presentaron el mismo efecto.

La sequía tuvo un efecto estadísticamente significativo, reduciendo la producción de peso seco de raíz en un 20.3%, en contraste con el riego. Winter (1981), encontró este mismo efecto. Con la variedad Negro 150G3 se obtuvo la mayor producción de pe

CUADRO 4. EFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE RAIZ (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM PHASEOLI* - *PHASEOLUS VULGARIS* L.

FUENTE	PRINCIPAL	$\bar{x}$
NITROGENO	60 kg N/ha	1.7069 a
	CP MEX1 <sub>Str150</sub>	1.5378 b
	CP MEX22 <sub>Spe200</sub>	1.5098 b
	0 kg N/ha	1.1293 c
HUMEDAD	RIEGO	1.6285 a
	SEQUIA	1.2971 b
VARIEDAD	NEGRO 150G3	1.6275 a
	BAYO DURANGO	1.4187 b
	MICHOACAN 12A3	1.3422 c
ESTADO FENOLOGICO	LLENADO DE VAINA	2.4051 a
	FLORACION	1.5772 b
	EDO. VEGETATIVO	0.4061 c

LAS MEDIAS CON LETRAS IDENTICAS SON ESTADISTICAMENTE IGUALES (Tukey,

$\alpha = 0.05$ ).

so seco de raíz, coincidiendo esto, con su alta producción de - follaje. En orden decreciente le siguieron las variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3. Las tres variedades fueron estadísticamente diferentes entre sí.

La producción más alta de raíz, se presentó en el llenado de vaina, a diferencia de la floración y el estado vegetativo, siendo éste último, en donde se obtuvo el menor peso seco de raíz. Los tres estados fenológicos fueron estadísticamente diferentes entre sí.

En el Apéndice X, se muestra el Análisis de Varianza de la variable de respuesta peso seco de raíz.

#### C. Efecto en la producción del número total de nódulos.

En el Cuadro 5, se presenta el efecto de cada una de las fuentes principales en la producción del número total de nódulos.

Se encontró que ambas cepas, se comportaron estadísticamente igual en la producción de nódulos. Se encontró también que la fertilización nitrogenada (60 Kg N/ha) abatió en un 29.8% la producción de nódulos, en relación al control absoluto (0 Kg N/ha), de igual modo como lo reportaron *Alcantar (1978)* y *Cuauhtle (1979)*.

En este caso, se observó que la sequía tuvo un efecto drástico en la producción de nódulos, abatiéndola en un 41.3% en relación a la producción bajo riego. Este mismo efecto fue encontrado por *Engin y Sprent (1973)* y *Rathore, et. al. (1981)*. Además del

CUADRO 5. EFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES EN LA PRODUCCION DEL NUMERO TOTAL DE NODULOS EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM PHASEOLI - PHASEOLUS VULGARIS L.

FUENTE	PRINCIPAL	$\bar{x}$	
NITROGENO	CP MEX22 <sub>Spe200</sub>	253.79629	a
	CP MEX1 <sub>Str150</sub>	249.62963	a
	0 kg N/ha	136.12281	b
	60 kg N/ha	95.50981	c
HUMEDAD	RIEGO	232.35	a
	SEQUIA	136.31	b
VARIEDAD	NEGRO 150G3	311.54	a
	BAYO DURANGO	130.75	b
	MICHOACAN 12A3	110.69	c
ESTADO FENOLOGICO	FLORACION	401.72	a
	LLENADO DE VAINA	78.15	b
	EDO. VEGETATIVO	73.11	c

LAS MEDIAS CON LETRAS IDENTICAS SON ESTADISTICAMENTE IGUALES (Tukey,

$\alpha = 0.05$ ).



abatimiento en el número de nódulos, la sequía indujo la abscisión de estos, efecto que coincide con lo encontrado por *Lie* (1981).

La mayor producción de nódulos se presentó en la variedad Negro 150G3, siguiendo en orden decreciente las variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3. Las tres variedades fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Se encontró que en la floración se produjo la mayor cantidad de nódulos, en contraste con el llenado de vaina y con el estado vegetativo, en donde el número de nódulos disminuyó por la senescencia de los mismos (*Martínez, et. al. 1985*) y por ser el período temprano en el proceso de infección (*Bushby, 1981*), respectivamente. Los tres estados fenológicos fueron estadísticamente diferentes entre sí. En el Apéndice XI, se muestra el Análisis de Varianza de la variable de respuesta número total de nódulos.

#### D. Efecto en la producción de peso seco de nódulos.

En el Cuadro 6, se muestra el efecto de las fuentes principales en la producción de peso seco de nódulos (g). Se encontró que la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub> fue estadísticamente superior a la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub>. El hecho de que el efecto de ambas cepas resultó estadísticamente igual en la producción del número total de nódulos (Cuadro 5) pero estadísticamente diferente en el peso seco de los mismos, se explica por la gran heterogeneidad en el tamaño de los nódulos, siendo generalmente más grandes en la ce

CUADRO 6. EFECTO DE LAS FUENTES PRINCIPALES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE NODULOS (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM PHASEOLI*-*PHASEOLUS VULGARIS* L.

FUENTE	PRINCIPAL	$\bar{x}$
NITROGENO	CP MEX22 <sub>Spe</sub> 200	0.24825 a
	CP MEX1 <sub>Str</sub> 150	0.17465 b
	0 kg N/ha	0.12423 c
	60 kg N/ha	0.07888 d
HUMEDAD	RIEGO	0.21585 a
	SEQUIA	0.09841 b
VARIEDAD	NEGRO 150G3	0.21116 a
	BAYO DURANGO	0.15093 b
	MICHOACAN 12A3	0.10931 c
ESTADO FENOLOGICO	FLORACION	0.38362 a
	LLENADO DE VAINA	0.06828 b
	EDO. VEGETATIVO	0.01949 c

LAS MEDIAS CON LETRAS IDENTICAS SON ESTADISTICAMENTE IGUALES (Tukey,

$\alpha = 0.05$ ).

pa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub> que en la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>.

El efecto de la sequía fue estadísticamente significativo, abajando en un 54.4% el peso de nódulos secos, en contraste con el riego.

La variedad Negro 150G3, presentó el valor más alto de peso seco de nódulos, y en orden decreciente siguieron las variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3; coincidiendo este orden con la producción del número total de nódulos. Las tres variedades fueron estadísticamente diferentes entre sí.

El valor más alto de peso seco de nódulos, se obtuvo en la floración, siguiendo el llenado de vaina y finalmente el estado vegetativo. Los tres estados fenológicos fueron estadísticamente diferentes entre sí. En el Apéndice XII, se muestra el Análisis de Varianza de la variable de respuesta peso seco de nódulos.

5. INTERACCIONES ENTRE LAS FUENTES PRINCIPALES: NITROGENO, HUMEDAD, VARIEDAD Y ESTADO FENOLOGICO.

A. Interacción entre las fuentes principales en la producción de peso seco de follaje (Apéndice XIII).

A.1. Fuente de nitrógeno por variedad.

En la Fig. 10, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y la variedad. La mayor producción de peso seco de follaje en las tres variedades, fue dada por el efecto de fertilización nitrogenada. Se encontró también, que en los tres casos, el efecto de la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub>

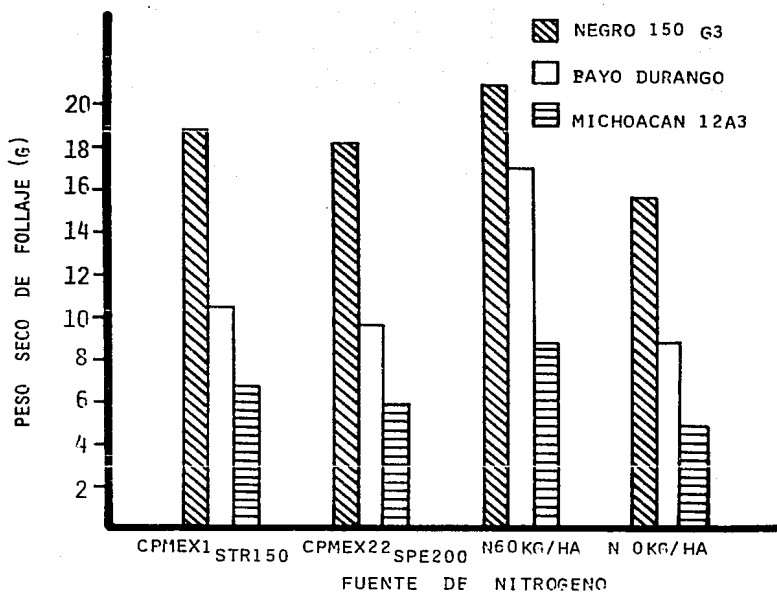


FIG.10. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y LA VARIEDAD EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE FOLLAJE ( $P \leq 0.01$ )

superó al de la CPME<sup>22</sup>Spe200 en la producción de follaje.

#### A.2. Fuente de nitrógeno por estado fenológico.

En la Fig. 11, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el estado fenológico. Lógicamente, se observó que en el llenado de vaina se presentó la mayor producción de follaje, siguiendo en orden decreciente, la floración y el estado vegetativo. Se puede notar con facilidad, en las Figs. 10 y 11, que hubo efecto de cepas, al comparar sus efectos en producción, con respecto al valor de producción de peso seco de follaje en relación al tratamiento con 0 kg N/ha.

#### A.3. Nivel de humedad por estado fenológico.

En la Fig. 12, se muestra la interacción entre el nivel de humedad y el estado fenológico. Se encontró que la sequía abatió la producción de peso seco de follaje en los tres estados fenológicos, siendo más drástico el efecto durante la floración, estos datos concuerdan con lo reportado por Rathore, *et. al.* (1981).

#### A.4. Variedad por estado fenológico.

En la Fig. 13, se muestra la interacción entre la variedad y el estado fenológico. En la variedad Negro 150G3, se encontró la mayor producción de follaje durante la floración, siguiendo en orden decreciente, el llenado de vaina y el estado vegetativo. No así, en el caso de la variedad Bayo Durango donde, la mayor producción se presentó en el lle-

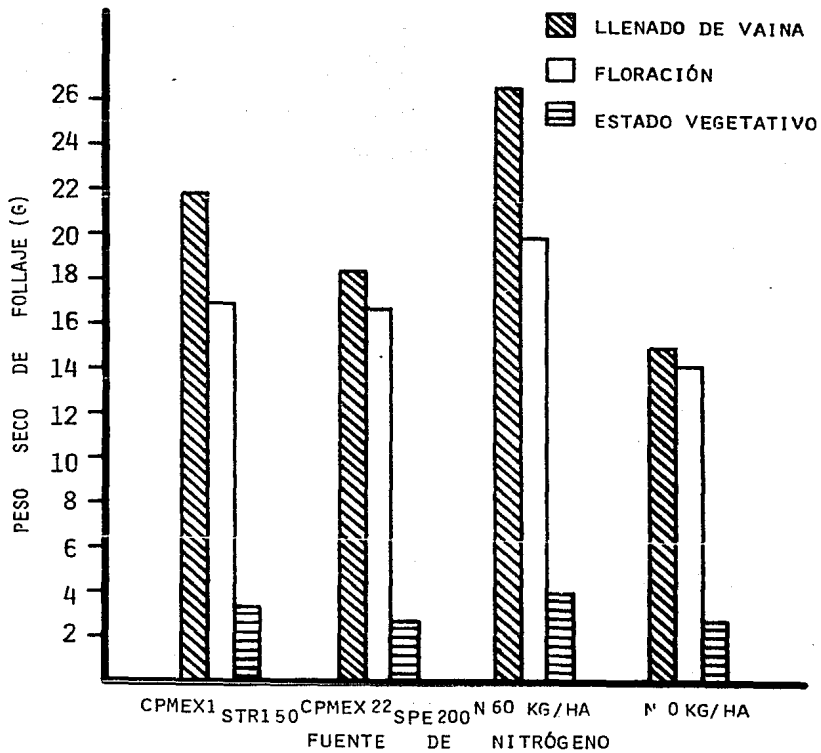


FIG. 11. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE FOLLAJE ( $p \leq 0.01$ )

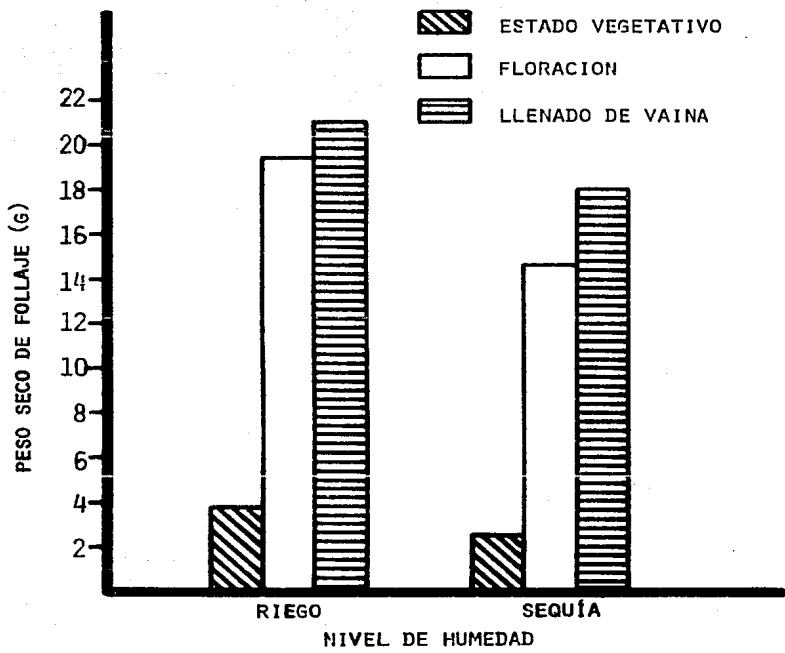


FIG.12. INTERACCIÓN DEL NIVEL DE HUMEDAD Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE FOLLAJE ( $p \leq 0.01$ ).

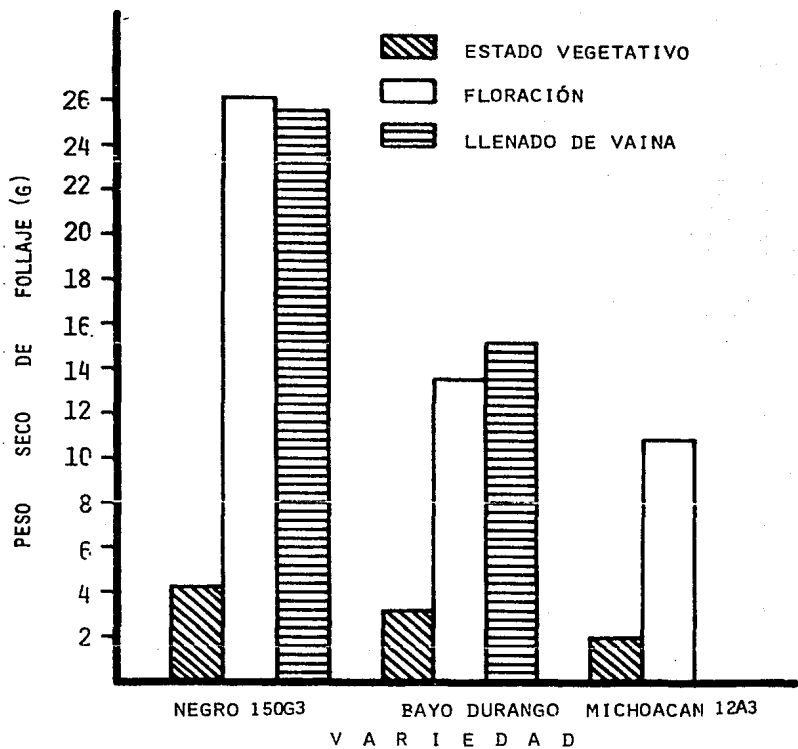


FIG. 13. INTERACCIÓN DE LA VARIEDAD Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DEL PESO SECO DE FOLLAJE ( $p \leq 0,01$ ).



nado de vaina, mientras que la mínima se presentó en el estado vegetativo. En la variedad Michoacán 12A3, no se determinó el peso seco de follaje durante el llenado de vaina, por la defoliación precóz, debido al efecto de la sequía. Sin embargo, al igual que en las otras dos variedades, la floración superó en producción al estado vegetativo.

B. Interacción entre las fuentes principales en la producción de peso seco de raíz (Apéndice XIV).

B.1. Fuente de nitrógeno por estado fenológico.

En la Fig. 14, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el estado fenológico. Al igual que en la producción de follaje, se encontró que la mayor producción de raíz, se debió al efecto de la fertilización con 60 kg N/ha, pero solamente en los estados de floración y llenado de vaina, ya que durante el estado vegetativo, la cepa CPMEX1<sub>Str150</sub> superó a la fertilización nitrogenada.

Se observó también, que la cepa CPMEX1<sub>Str150</sub> superó a la CPMEX22<sub>Spe200</sub> en los estados vegetativo y llenado de vaina, pero no en la floración, donde ambas tuvieron el mismo efecto.

B.2. Nivel de humedad por estado fenológico.

En la Fig. 15, se muestra la interacción entre el nivel de humedad y el estado fenológico. Se encontró que el efecto de la sequía fue drástico al reducir en los tres estados

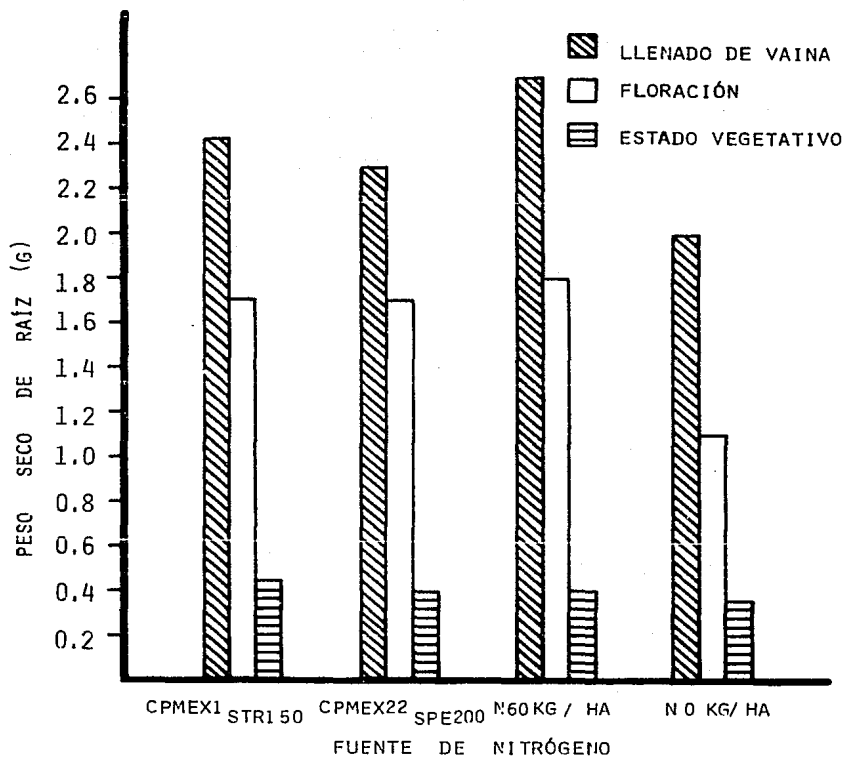


FIG. 14. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE RAÍZ ( $P \leq 0.01$ )

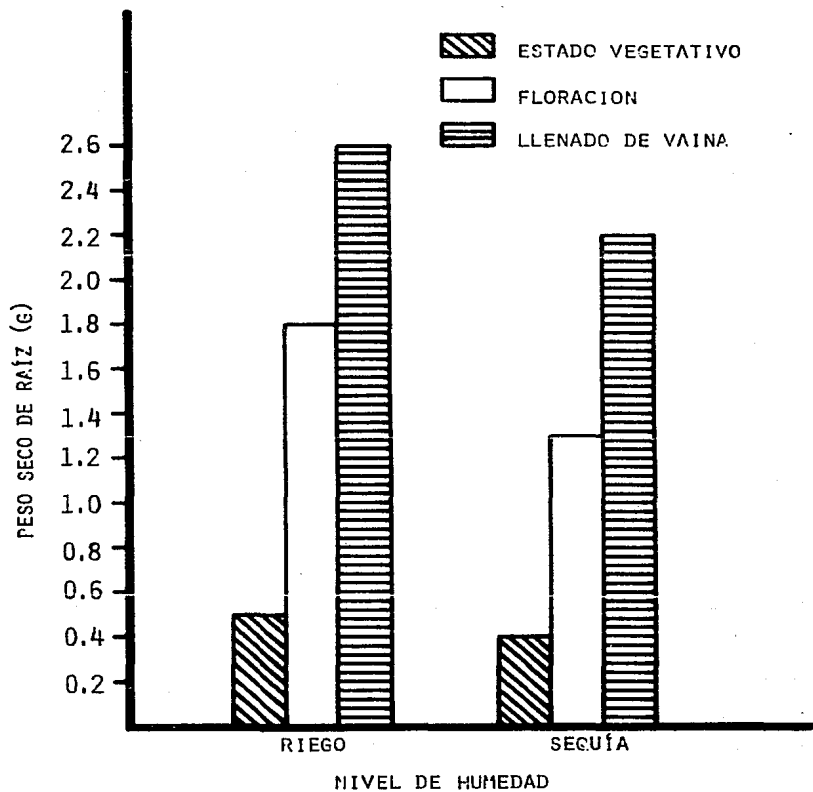


FIG.15, INTERACCIÓN DEL NIVEL DE HUMEDAD Y EL ESTADO FENOLOGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE RAÍZ ( $P \leq 0.01$ ).

fenológicos la producción de raíz. Este efecto de la sequía coincide con el abatimiento en la producción de follaje. Es decir, a medida que la disponibilidad de agua se reduce en el suelo, restringiendo el desarrollo normal de la raíz (Winter, 1981), está no podrá transportar suficiente agua para el desarrollo óptimo del follaje.

### B.3. Variedad por estado fenológico.

En la Fig. 16, se muestra la interacción entre la variedad y el estado fenológico. Se observó que la variedad Negro 150G3, presentó la producción más alta de raíz, tanto en el llenado de vaina como en la floración, no así el estado vegetativo, que fue superior en la variedad Bayo Durango. La variedad Michoacán 12A3, presentó el valor más bajo en la producción de raíz durante el llenado de vaina; pero durante la floración, supero a la variedad Bayo Durango.

## C. Interacción entre las fuentes principales en la producción del número total de nódulos (Apéndice XV).

### C.1. Fuente de nitrógeno por nivel de humedad.

En la Fig. 17, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el nivel de humedad. Se encontró que existe efecto de cepa al comparar el número de nódulos formados en los tratamientos, en relación al número de nódulos formados por el tratamiento con 0 kg N/ha.

Se observó que bajo riego, en los tratamientos inoculados, los mutantes introducidos formaron aproximadamente el 50%

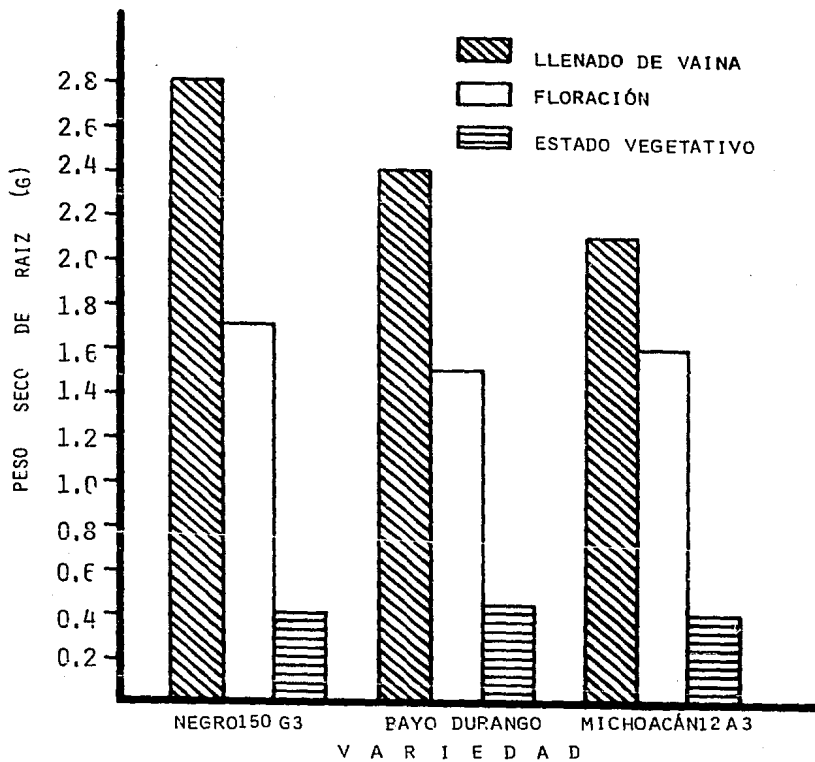


FIG.16. INTERACCIÓN DE LA VARIEDAD Y DEL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECCO DE RAIZ ( $p \leq 0.01$ )

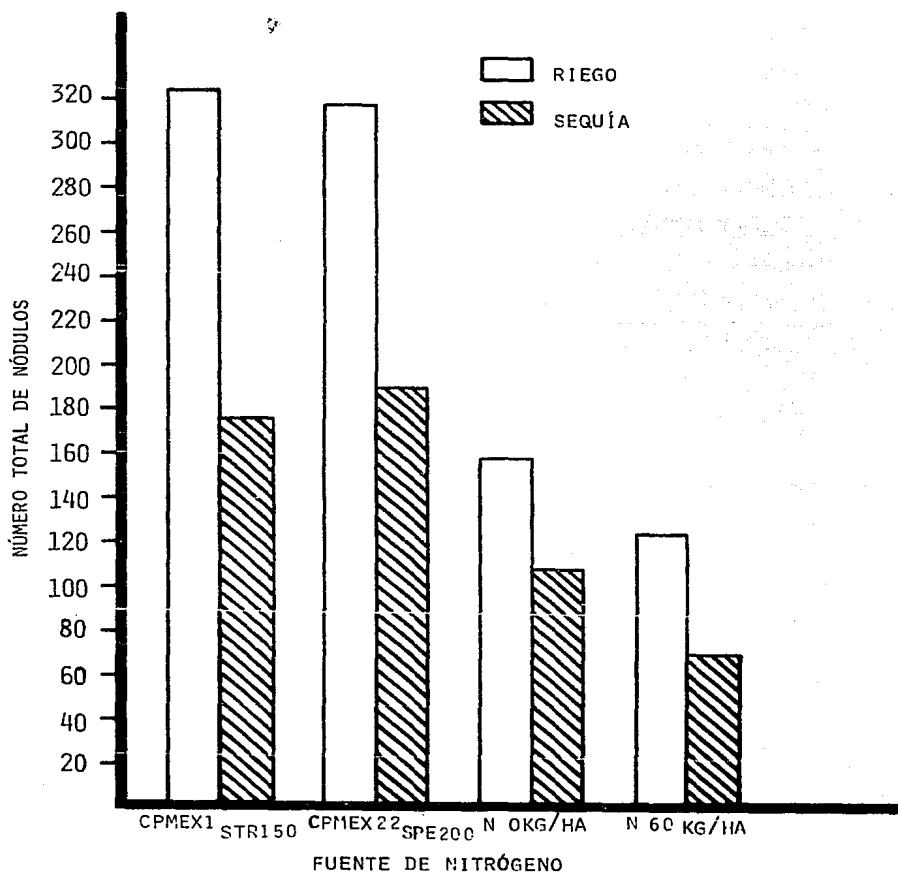


FIG. 17, INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL NIVEL DE HUMEDAD EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS ( $P \leq 0.01$ ).

de los nódulos totales. Por otra parte, la fertilización nitrogenada (60 kg N/ha) abatió la formación de nódulos. *Alcantar (1978)*, encontró el mismo efecto. Se observó también, que la baja disponibilidad de agua en el suelo (sequía) redujo notablemente el número de nódulos. Esto concuerda por lo reportado por *Lie (1981)* y *Jih-Min Sun (1982)*. Es probable, que esta notable reducción en el número de nódulos, esté en función de la susceptibilidad del sistema simbiótico a la sequía. *Engin y Sprent (1973)*, encontraron que las plantas que presentan nódulos de crecimiento meristemático restringido (es decir, nódulos esféricos), como es el caso de *Phaseolus vulgaris L.*, son más sensibles a la sequía que las plantas que forman nódulos elongados.

Bajo tensión hídrica, el número de nódulos producidos por los mutantes de *R. phaseoli* CPMEX1<sub>Str150</sub> y CPMEX22<sub>Spe200</sub>, fueron reducidos en 45.8 y 40%, respectivamente, en relación a los tratamientos bajo riego. En resumen, bajo tensión hídrica, la CPMEX22<sub>Spe200</sub> formó más nódulos que la CPMEX1<sub>Str150</sub>.

#### C.2. Fuente de nitrógeno por variedad

En la Fig. 18, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y la variedad. En todos los casos, se vió que la producción más alta de nódulos se presentó en la variedad Negro 150G3, siguiendo en orden decreciente las

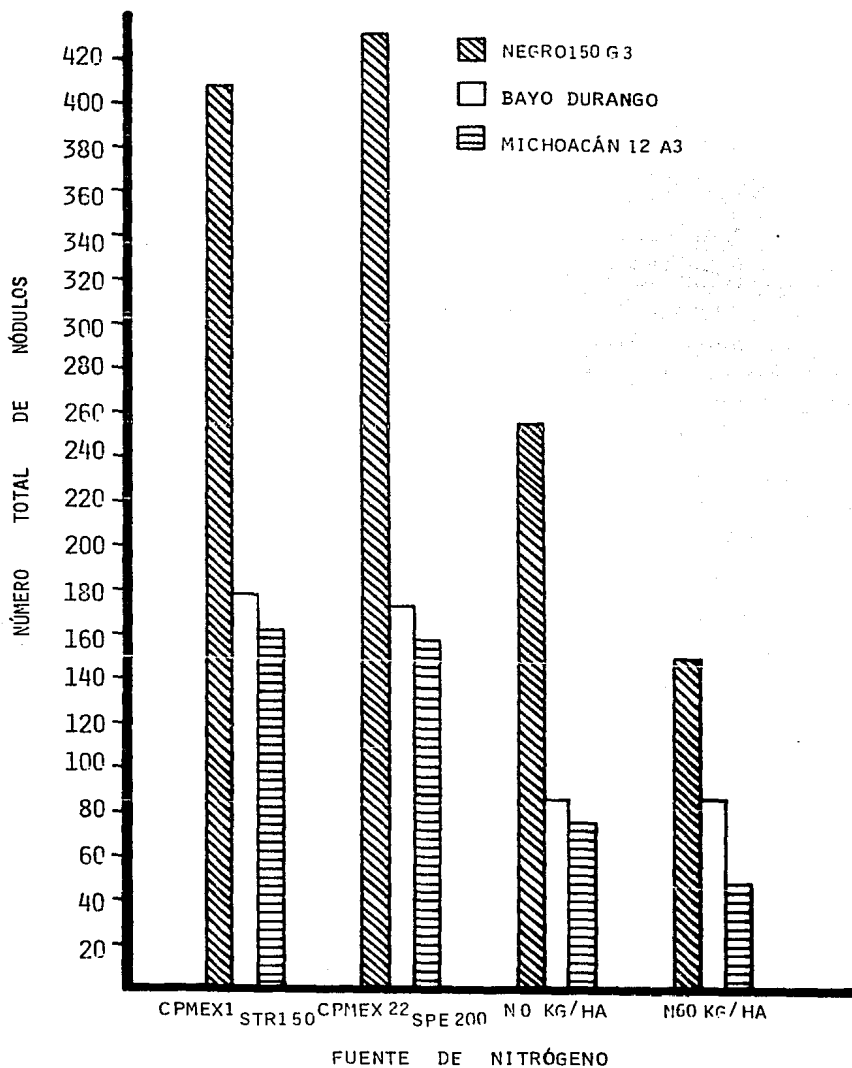


FIG. 18. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y LA VARIEDAD EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS (P < 0.01)



variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3.

Sin embargo, el efecto de la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub> en la producción de nódulos, fue superior al de la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub>. La afinidad de una cepa por un hospedero específico, depende del mecanismo de reconocimiento que exista entre ambos. Se ha propuesto que las Lectinas producidas por el hospedero, son las responsables de la unión de la superficie del pelo radical y la cápsula de la rizobia compatible (Napoli, et. al., 1975; Brill, 1977; Dazzo, 1980).

El hecho de que la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub> haya superado a la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub>, pudo deberse, en primera instancia, al reconocimiento entre ambos simbioses; se observó más afinidad de la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub> por la variedad Negro 150G3, que por cualquiera de las otras dos variedades. Aunque, no debe descartarse la posibilidad de que, ésta cepa haya sido más competitiva que la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub>, vs. las cepas nativas.

Finalmente, se observó que la fertilización nitrogenada abatió notablemente la producción de nódulos, al compararla con el control absoluto (no inoculado ni fertilizado).

### C.3. Fuente de nitrógeno por estado fenológico.

En la Fig. 19, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el estado fenológico. Se encontró que durante la floración se produjo la mayor cantidad de nódulos. Esto no concuerda con la máxima producción de follaje (Fig. 13),

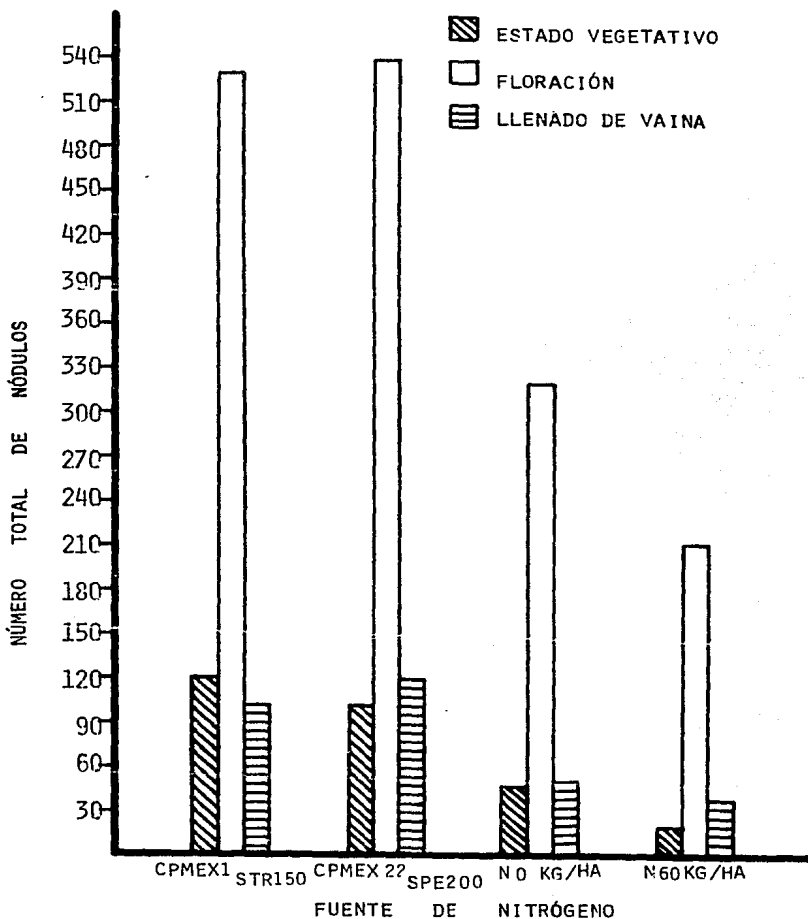


FIG. 19, INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS ( $P \leq 0.01$ )

salvo en el caso de la variedad Negro 150G3, durante la floración, la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub> produjo la mayor cantidad de nódulos. Igualmente, *Armenta* (1983), trabajando en invernadero y *Mathieu* (1982), trabajando en campo, no encontraron relación entre el número de nódulos y la producción de follaje.

La mínima producción de nódulos fue dada por las cepas CPMEEX1<sub>Str150</sub> y CPMEEX22<sub>Spe200</sub> durante el llenado de vaina y el estado vegetativo, respectivamente. Se encontró que la fertilización nitrogenada abatió drásticamente la formación de nódulos. Esto puede notarse fácilmente al comparar este tratamiento (50 kg N/ha) con el tratamiento no inoculado y con 0 kg N/ha.

#### C.4. Variedad por nivel de humedad

En la Fig. 20, se muestra la interacción entre la variedad y el nivel de humedad. La sequía abatió la nodulación en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3 en 40.7, 41.8 y 42.8%, respectivamente. El abatimiento se debió a la muerte de las rizobias en el suelo, fenómeno que también ha sido reportado por *Osa-Afiana y Alexander* (1979); *Mahler y Wollum II* (1980) y *Mahler y Wollum II* (1981), y a la desecación y abscisión de los nódulos ya formados.

#### C.5. Nivel de humedad por estado fenológico.

En la Fig. 21, se muestra la interacción entre el nivel de

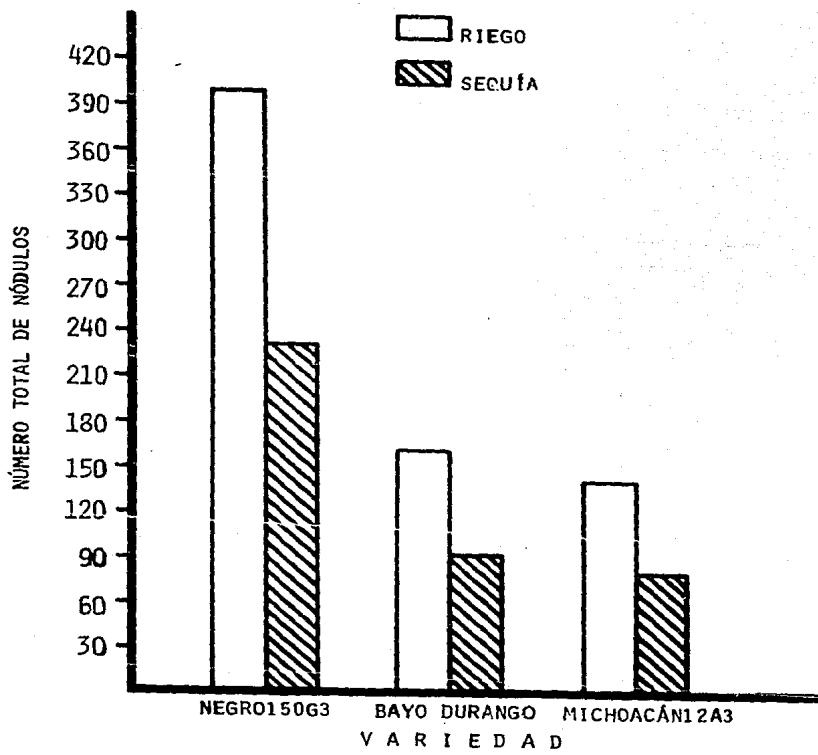


FIG.20. INTERACCIÓN DE LA VARIEDAD Y EL NIVEL DE HUMEDAD EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS ( $P < 0.01$ ).

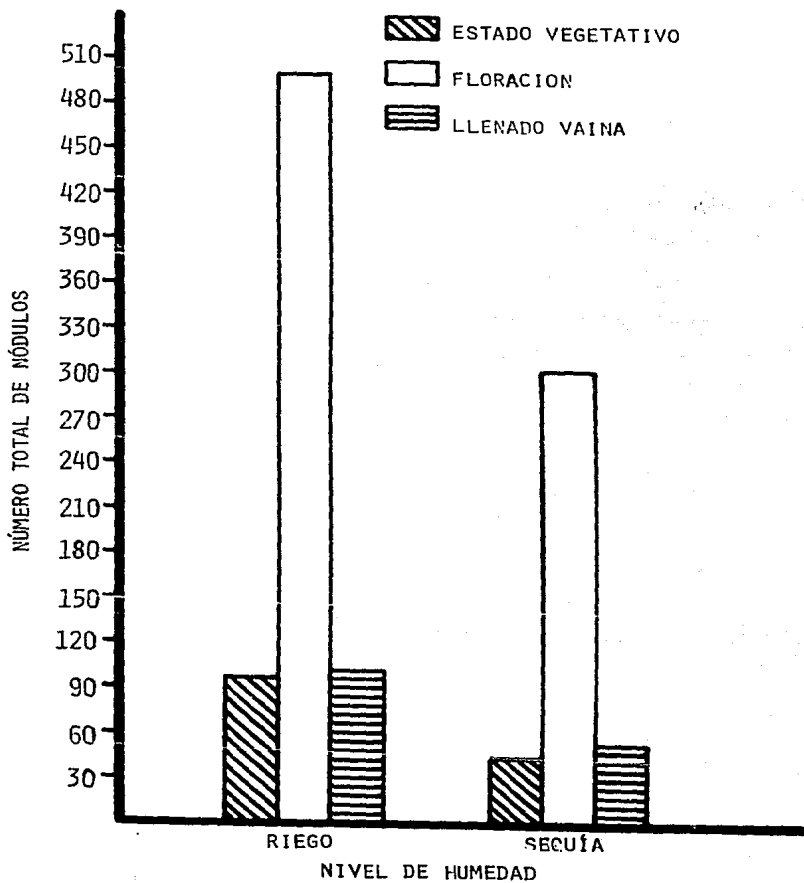


FIG. 21. INTERACCIÓN DEL NIVEL DE HUMEDAD Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS ( $P \leq 0.01$ ).

humedad y el estado fenológico. La producción de nódulos fue alta, media y baja en la floración, llenado de vaina y estado fenológico respectivamente, tanto en sequía como en riego.

La tensión hídrica redujo la producción de nódulos en el estado vegetativo, floración y llenado de vaina en 51.3, 38.8 y 45%, respectivamente. Esto indica que la sequía fue más severa, en relación a la formación de nódulos, en los periodos más tempranos de desarrollo y de madurez de la planta. La sequía también indujo la abscisión de los nódulos en los tres estados fenológicos.

#### C.6. Variedad por estado fenológico.

En la Fig. 22, se muestra la interacción entre la variedad y el estado fenológico. La variedad Negro 150G3 produjo la mayor cantidad de nódulos (Fig. 18), pero fue durante la floración, donde se manifestó la producción más alta. Durante el estado vegetativo Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, respectivamente.

Es importante hacer notar que, en las variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3, durante el llenado de vaina, no se encontraron nódulos como tales, sino solamente restos de la pared nodular.

#### D. Interacción entre las fuentes principales en la producción de peso seco de nódulos (Apéndice XVI).

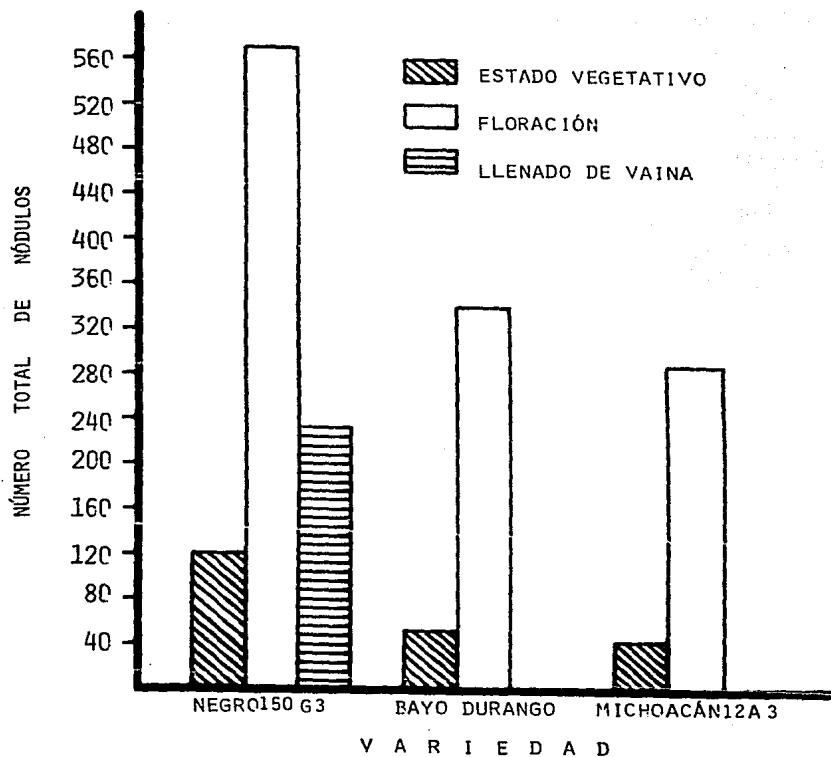


FIG. 22. INTERACCIÓN DE LA VARIEDAD Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE NÓDULOS ( $p \leq 0,01$ )

D.1. Fuente de nitrógeno por nivel de humedad.

En la Fig. 23, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el nivel de humedad. Se encontró que bajo tensión hídrica, los valores de peso seco de nódulos debidos al efecto de las cepas CPME<sub>X1</sub><sub>Str150</sub> y CPME<sub>X22</sub><sub>Spe200</sub>, fueron reducidos en un 46 y 60.5% respectivamente, en relación a los tratamientos bajo riego.

Se observó que el efecto de la cepa CPME<sub>X22</sub><sub>Spe200</sub>, superó al efecto de la cepa CPME<sub>X1</sub><sub>Str150</sub> en lo que respecta a la producción de peso seco de nódulos. Esto se halla relacionado con la producción de nódulos de cada una de éstas cepas (Fig. 17).

D.2. Fuente de nitrógeno por variedad.

En la Fig. 24, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y variedad. Se encontró que los valores más altos de peso seco de nódulos, de los tratamientos inoculados con las cepas CPME<sub>X1</sub><sub>Str150</sub> y CPME<sub>X22</sub><sub>Spe200</sub>, se presentaron en la variedad Negro 15OG3; sin embargo, la cepa CPME<sub>X1</sub><sub>Str150</sub> superó a la cepa CPME<sub>X22</sub><sub>Spe200</sub> en la producción de peso seco de nódulos.

Los valores más bajos de peso seco de nódulos, debidos al efecto de las cepas CPME<sub>X1</sub><sub>Str150</sub> y CPME<sub>X22</sub><sub>Spe200</sub>, se presentaron en las variedades Michoacán 12A3 y Bayo Durango, respectivamente.

Comparando los valores del número total de nódulos formados



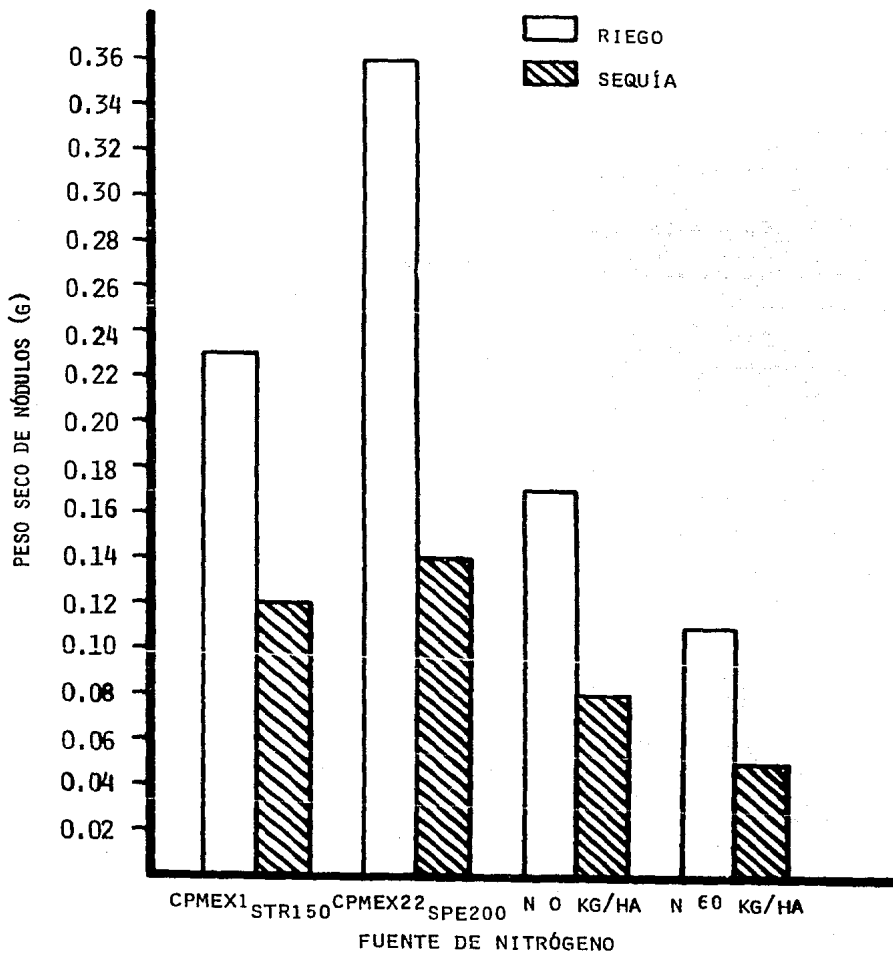


FIG. 23. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL NIVEL DE HUMEDAD EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS ( $P \leq 0.01$ ).

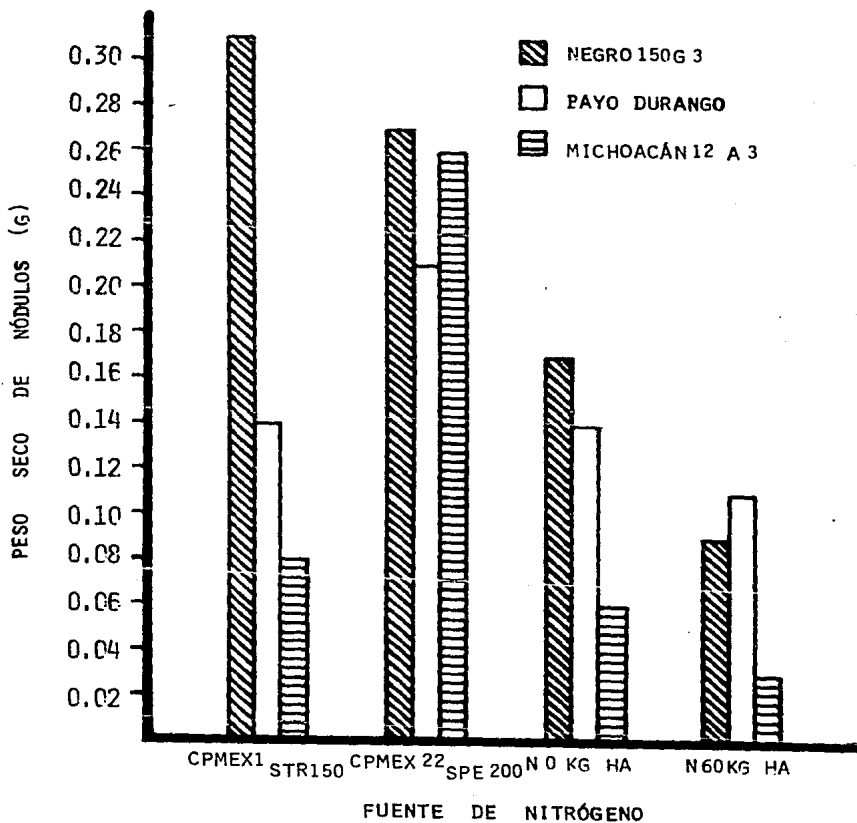


FIG.24. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y LA VARIEDAD EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS ( $p \leq 0.01$ )

y el peso seco de estos, se puede observar que no existe relación en el caso de la CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>, en la variedad Negro 150G3. Esta cepa produjo mayor cantidad de nódulos que la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub>, sin embargo, presentó menor peso seco de estos. Lo anterior puede ser explicado por la heterogeneidad en el tamaño de los nódulos; siendo en general más grandes en la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub> que en la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>.

#### D.3. Fuente de nitrógeno por estado fenológico.

En la Fig. 25, se muestra la interacción entre la fuente de nitrógeno y el estado fenológico. Se encontró que en la floración se presentaron los valores más altos de peso seco de nódulos, siguiendo en orden decreciente el llenado de vaina y el estado vegetativo.

Se observó que en la floración, el valor de peso seco de nódulos más alto estuvo dado por el efecto de la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>; éste resultado coincide con la producción más alta de nódulos (Fig. 19).

#### D.4. Nivel de humedad por estado fenológico.

En la Fig. 26, se muestra la interacción entre el nivel de humedad y el estado fenológico. De igual forma como sucedió en la interacción entre la fuente de nitrógeno y el estado fenológico (Fig. 25), el peso seco de nódulos más alto se obtuvo en la floración, siguiendo en orden decreciente el llenado de vaina y el estado vegetativo.

La sequía redujo los valores de peso seco de nódulos en -

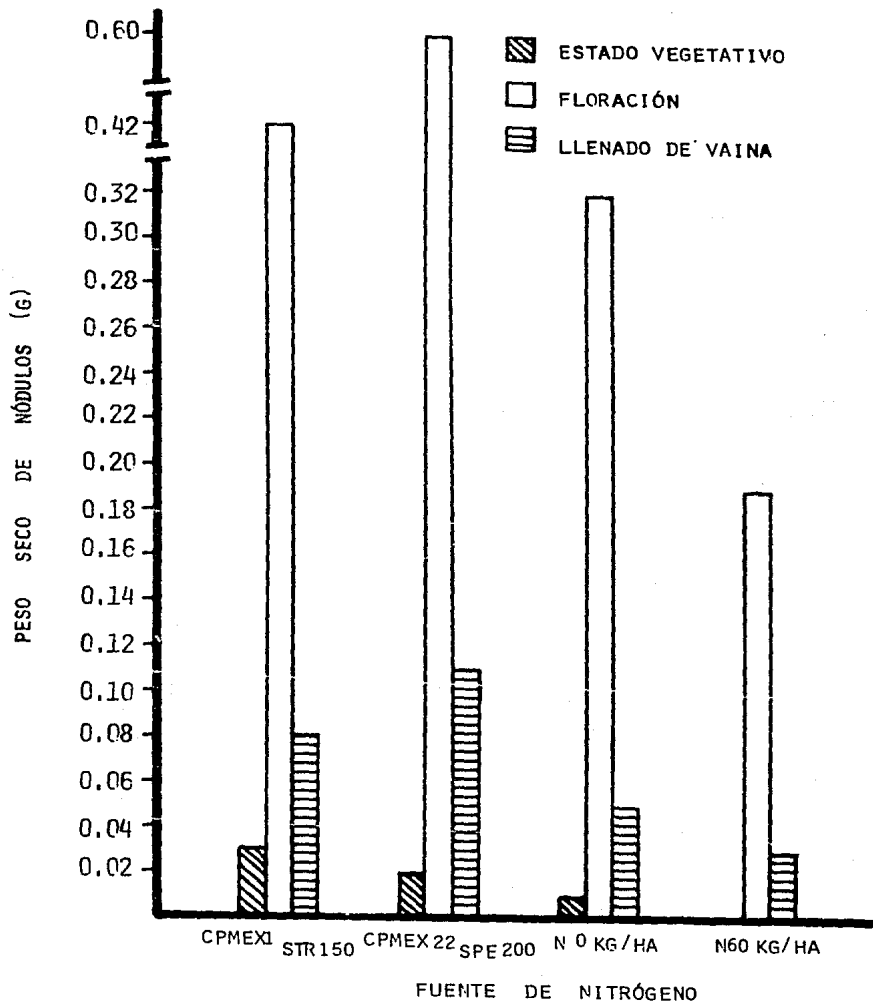


FIG. 25. INTERACCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS ( $p \leq 0,01$ )

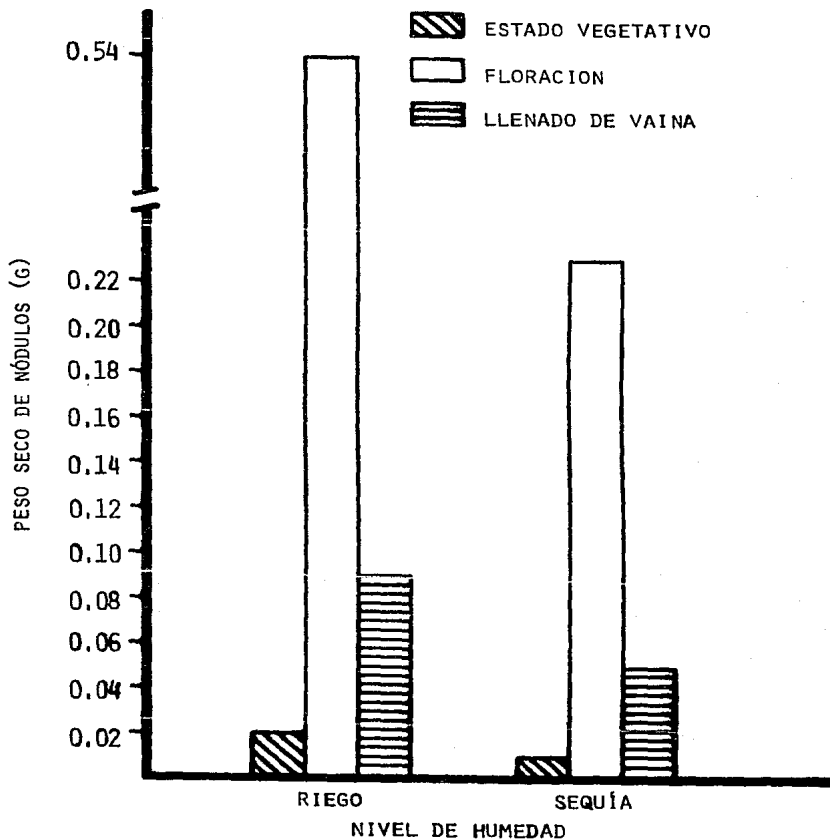


FIG.26. INTERACCIÓN DEL NIVEL DE HUMEDAD Y EL ESTADO FENOLOGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS ( $p \leq 0.01$ ).

29.4, 57.6 y 41.5% en los estados vegetativo, floración y llenado de vaina, respectivamente, en relación a los tratamientos bajo riego.

#### D.5. Variedad por estado fenológico.

En la Fig. 27, se muestra la interacción entre la variedad y el estado fenológico. A diferencia de lo que se encontró con la producción de nódulos, en este caso no se observó que la variedad Negro 150G3 durante la floración, que produjo el mayor número de nódulos, tuvo necesariamente que presentar el valor máximo de peso seco de éstos. Fue la variedad Bayo Durango, durante la floración, la que produjo el valor máximo de peso seco de nódulos. Esto se debe a que, en la variedad Bayo Durango, la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub>, que formó nódulos generalmente más grandes, produjo más nódulos que la CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub> (Fig. 18).

Por otra parte, se encontró que las tres variedades, en el estado vegetativo, presentaron similares valores de peso seco de nódulos.

### 6. SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI EN LA RIZOSFERA DE CADA VARIEDAD PROBADA, BAJO SEQUÍA Y RIEGO.

#### A. Variedad Negro 150G3.

En la Fig. 28, aparecen graficados los valores (Apéndice XVII) de la sobrevivencia de los mutantes de *Rhizobium phaseoli*, CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub> y CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>, en la rizosfera de la variedad

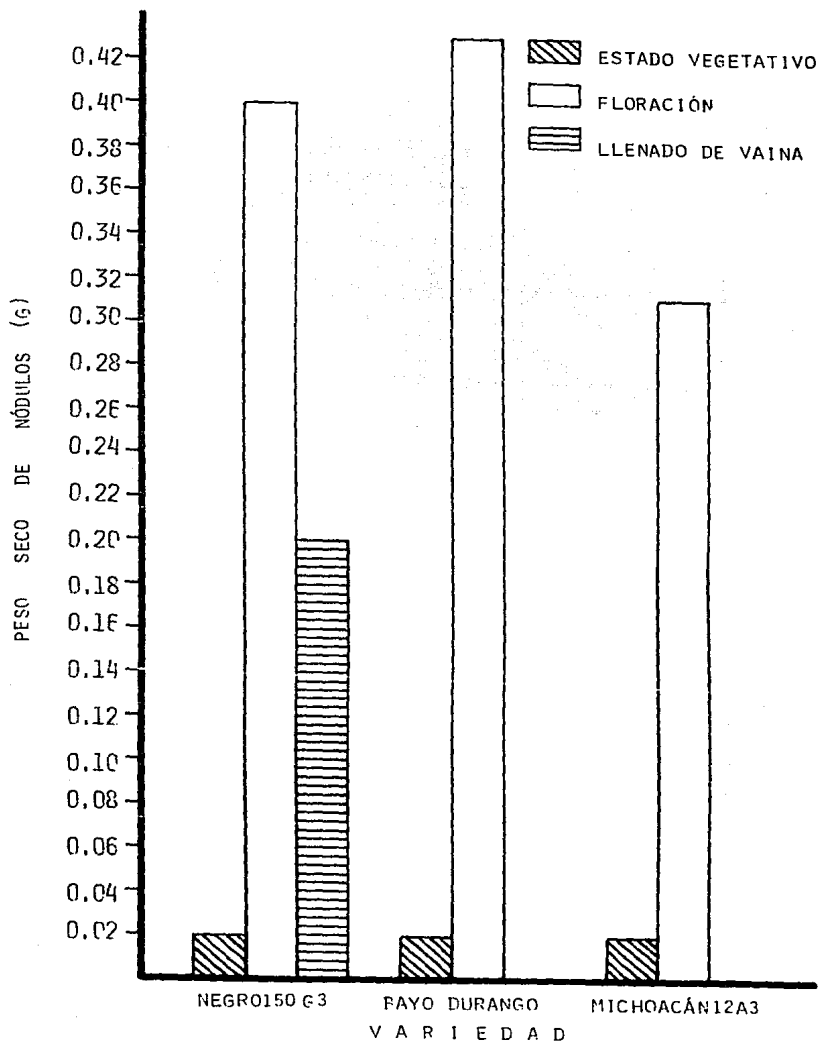


FIG. 27. INTERACCIÓN DE LA VARIEDAD Y EL ESTADO FENOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE PESO SECO DE NÓDULOS (p < 0.01)

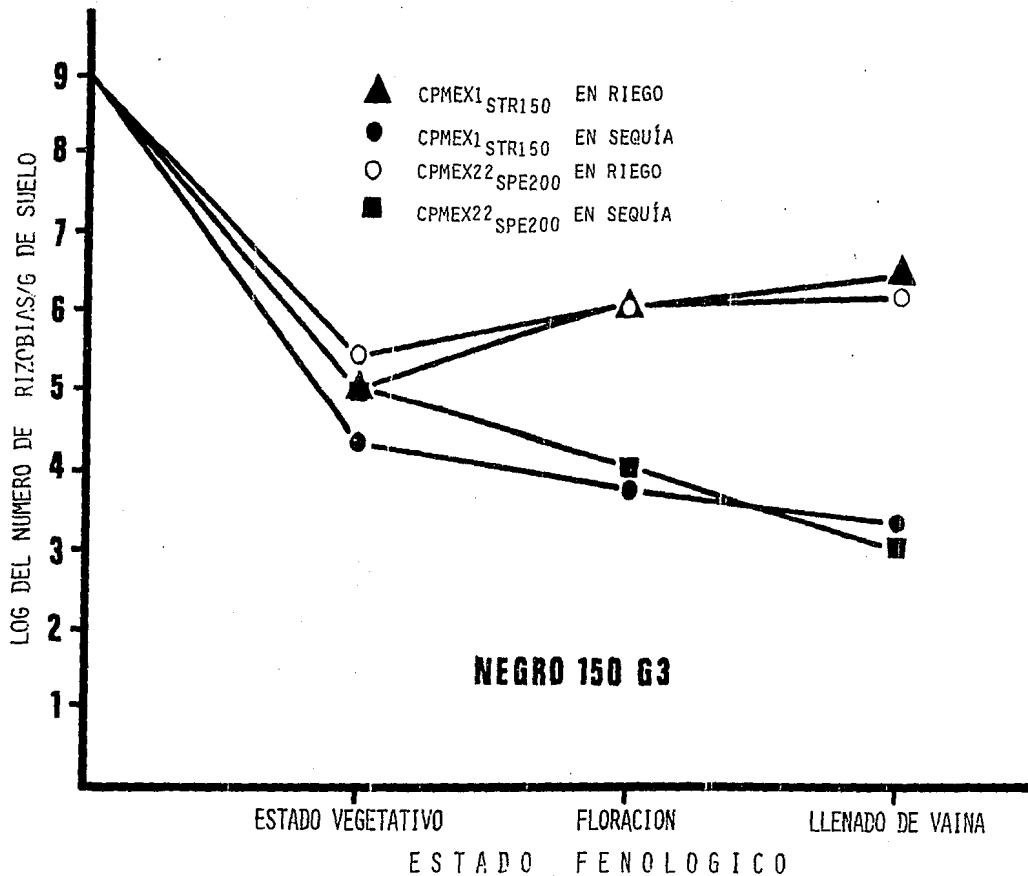


FIG. 28 SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI CPMEX1 STR150 Y CPMEX22 SPE200 EN LA RIZOSFERA DEL FRIJOL VARIEDAD NEGRO150G3 BAJO CONDICIONES DE RIEGO Y SEQUÍA (P≤0.01).



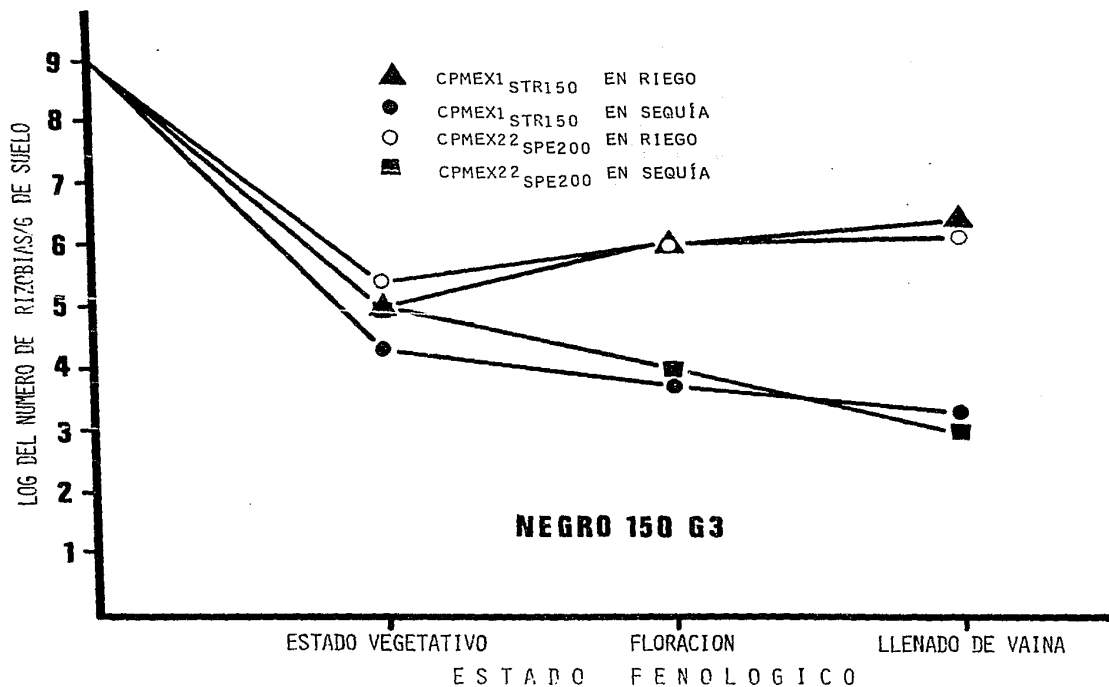


FIG. 28 SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI CPMEX1 STR150 Y CPMEX22 SPE200 EN LA RIZOSFERA DEL FRIJOL VARIEDAD NEGRO150G3 BAJO CONDICIONES DE RIEGO Y SEQUIA (P<0.01).

Negro 150G3 bajo sequía y riego.

El número inicial de mutantes en la rizosfera de la plántula, para todos los casos, fue del orden de  $10^9$  bacterias.

Se encontró que durante el estado vegetativo, tanto en los tratamientos bajo sequía como en riego, el número de ambos mutantes viables decreció en orden de 3 a 4 números logarítmicos.

*Bushby (1981) y Robert y Schmidt (183)*, encontraron igualmente que bajo condiciones normales de humedad, las poblaciones de rizobias disminuyeron en la rizosfera en los primeros estados de desarrollo del hospedero.

Esta caída o disminución en el número de mutantes viables, tiene explicación en el hecho de que es precisamente durante este período en el que se lleva a cabo la infección más significativa.

Se observó, que en los estados de desarrollo posteriores (floración y llenado de vaina), el número de mutantes viables, bajo riego, presentaron un substancial aumento, a diferencia de las poblaciones de mutantes bajo sequía que persistieron en el decremento.

No se observaron diferencias en el grado de sobrevivencia entre uno y otro mutante, bajo riego ni bajo sequía, a lo largo del desarrollo de la planta. Finalmente, en el llenado de vaina, la sequía redujo el número de ambos mutantes viables en orden de 3 números logarítmicos.

B. Variedad Bayo Durango.

En la Fig. 29, aparecen graficados los valores (Apéndice XVII) de la sobrevivencia de los mutantes de *R. phaseoli*,

CPMEX1<sub>Str150</sub> y CPMEX22<sub>Spe200</sub>, en la rizosfera de la variedad Bayo Durango bajo sequía y riego.

De igual forma que en la variedad Negro 150G3, se encontró que durante el estado vegetativo, tanto en los tratamientos bajo sequía como en riego, el número de ambos mutantes viables decreció en orden de 5 números logarítmicos.

Durante la floración, bajo riego, se registró un substancial incremento en el número de mutantes viables, a diferencia de los tratamientos bajo sequía, donde el abatimiento persistió.

Se observó que durante el estado vegetativo y la floración, la cepa CPMEX22<sub>Spe200</sub> fue ligeramente menos sensible a la sequía.

Finalmente, en el llenado de vaina, la sequía redujo el número de ambos mutantes viables en orden de 2 a 3 números logarítmicos.

C. Variedad Michoacán 12A3.

En la Fig. 30, aparecen graficados los valores (Apéndice XVII) de la sobrevivencia de los mutantes de *R. phaseoli*,

CPMEX1<sub>Str150</sub> y CPMEX22<sub>Spe200</sub>, en la rizosfera de la variedad Michoacán 12A3 bajo sequía y riego.

Se encontró que durante el estado vegetativo, el abatimiento del número de ambos mutantes viables bajo sequía fue más drástico (en orden de 5 números logarítmicos) a diferencia de los trata-

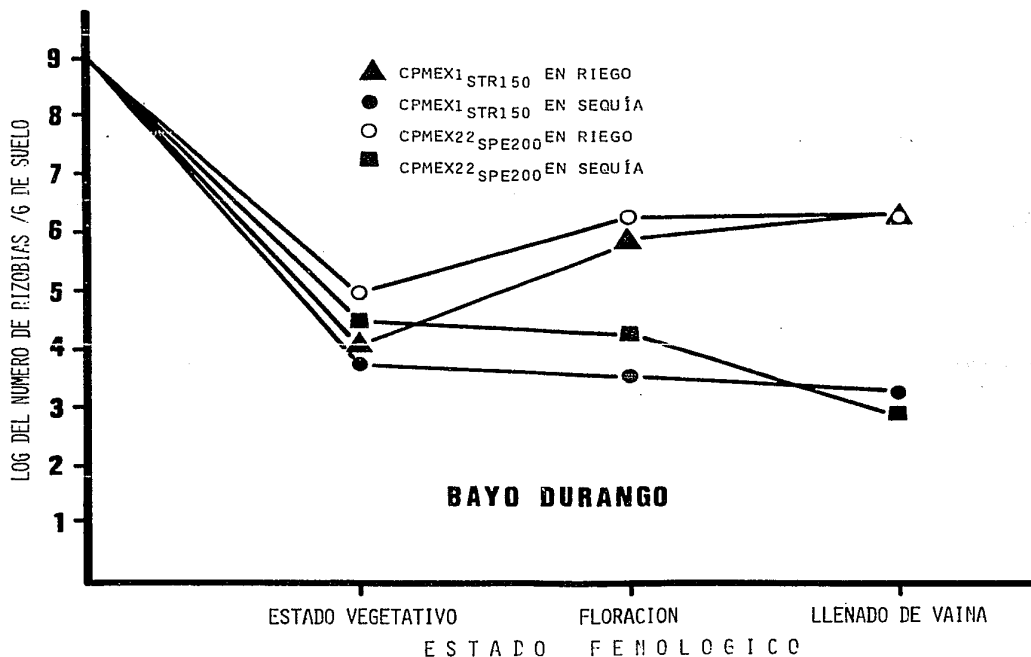


FIG. 29 SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI CPMEX1<sub>STR150</sub> Y CPMEX22<sub>SPE200</sub> EN LA RIZOSFERA DEL FRIJOL VARIEDAD BAYO DURANGO BAJO CONDICIONES DE RIEGO Y SEQUÍA (P<0.01).

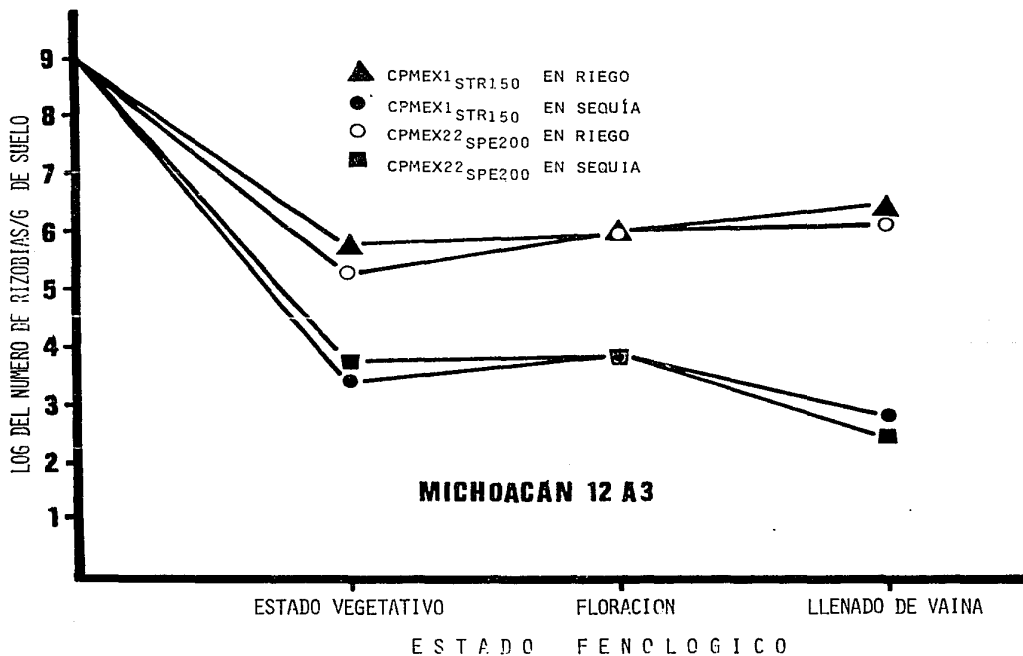


FIG. 30 SOBREVIVENCIA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI CPMEX1<sub>STR150</sub> Y CPMEX 22<sub>SPE200</sub> EN LA RIZOSFERA DEL FRIJOL VARIEDAD MICHOACÁN 12A3 BAJO CONDICIONES DE RIEGO Y SEQUÍA ( $P \leq 0.01$ ).

mientos bajo riego, donde el abatimiento fue del orden de 3 números logarítmicos.

Se observó que en los estados de desarrollo posteriores (floración y llenado de vaina), el número de mutantes viables, bajo riego, presentaron un ligero incremento, en contraste con las poblaciones de mutantes bajo sequía, donde el abatimiento persistió. Finalmente, en el llenado de vaina, la sequía redujo el número de ambos mutantes viables en orden de 3 a 4 números logarítmicos.

La sobrevivencia de ambos mutantes, CPMEX<sup>1</sup> Str150 y CPMEX<sup>22</sup> Spe200' fue abatida cuando los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo fueron iguales o menores a -15 barias. Este mismo efecto fue encontrado por Marshall (1964), Chi Ying Huang (1975 a y b), Osa Afiana y Alexander (1982) y Jin-Min Sung (1982).

Este severo efecto de la sequía en la sobrevivencia de ambos mutantes, en cada estado fenológico en la rizosfera de cada variedad probada, probablemente está relacionado con: 1) la particular sensibilidad de *R. phaseoli* a la desecación (Peña-Cabriales y Alexander, 1983); 2) su condición de rápido crecimiento (Bushby y Marshall, 1977a) y 3) con su inhabilidad de producir suficiente polisacárido extracelular (Kilbertus, et. al. 1979).

Por otro lado, aunque se ha reportado que existen cepas de rápido crecimiento que son tolerantes a la sequía [Osa-Afiana y Alexander, 1982], el grado de tolerancia a la tensión hídrica dentro de una especie, no ha sido establecido.

En este experimento, no se encontró que las rizobias hayan proliferado en condiciones de bajo disponibilidad de agua en el suelo, como lo reporta *Peña-Cabriales y Alexander (1979)*.

Finalmente, la sobrevivencia de las rizobias bajo tensión hídrica, es de gran significancia ecológica, ya que éstas deben permanecer por largos períodos de tiempo bajo dicha condición, antes de nodular al hospedero (*Singleton y Cuautle-Fabán, 1982*).

El número de rizobias nativas en el suelo usado, al momento de establecerse el experimento, presentó una población de  $5.8 \times 10^5$  bacterias/g suelo; al final de este, la población disminuyó hasta  $10^2$  bacterias/g suelo, por efecto de la sequía.

7. CAPACIDAD COMPETITIVA DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI BAJO SEQUÍA Y RIEGO.

A. Estado vegetativo.

En las tres variedades de *Phaseolus vulgaris* L. probadas, se encontró que la cepa CPMEX22<sub>Spe200</sub> presentó los porcentajes más altos de nódulación, tanto en sequía como en riego.

Se observó que la sequía disminuyó la formación de nódulos inducida por la cepa CPMEX1<sub>Str150</sub> en 59.7, 65.9 y 28.5% en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, respectivamente, en contraste con los tratamientos bajo riego.

Por otro lado se observó que la sequía abatió la nodulación inducida por la cepa CPMEX22<sub>Spe200</sub> en un 59.2%, en la variedad Negro 150G3; 34.51%, en la variedad Bayo Durango y 65.1% en la

variedad Michoacán 12A3.

De lo anterior, se puede observar que en la variedad Negro 150G3, la sequía abatió la nodulación de las cepas CPME<sup>X</sup>1<sub>Str150</sub> y CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe200</sub>, en el mismo grado (59.7 y 59.2%, respectivamente).

Por otro lado, en la variedad Bayo Durango, el efecto de la sequía fue más drástico en la cepa CPME<sup>X</sup>1<sub>Str150</sub>, abatiendo la nodulación en un 65.9%, que en la CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe200</sub>, donde la nodulación fue reducida en un 34.51%.

Finalmente, en la variedad Michoacán 12A3, el efecto de la sequía fue más severo en la cepa CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe200</sub>, disminuyendo la nodulación en un 65.1%, a diferencia de la CPME<sup>X</sup>1<sub>Str150</sub>, donde la nodulación sólo fue abatida en un 28.5% (Ver Cuadro 7).

#### B. Floración.

A diferencia del estado vegetativo, durante la floración, se observó que no siempre la cepa CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe200</sub> indujo los porcentajes más altos de nodulación, tanto en riego como en sequía.

Se observó, que la sequía redujo la nodulación inducida por la cepa CPME<sup>X</sup>1<sub>Str150</sub> en 64.6%, 65.8 y 47.6% en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, respectivamente, en contraste con los tratamientos bajo riego.

Por otra parte, la sequía abatió la nodulación por la cepa CPME<sup>X</sup>22<sub>Spe200</sub> en un 37.4%, en la variedad Negro 150G3; 76.8%, en la variedad Bayo Durango y 75.3% en la variedad Michoacán 12A3.



De lo anterior, se puede observar que en la variedad Negro 150G3, el efecto de la sequía fue más drástico sobre la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub>, reduciendo su nodulación en un 64.6%, a diferencia de la CPMEEX22<sub>Spe200</sub> donde la nodulación fue abatida en un 37.4%.

Por otra parte, en la variedad Bayo Durango, el efecto de la sequía en la formación de nódulos por las cepas CPMEEX1<sub>Str150</sub> y CPMEEX22<sub>Spe200</sub>, fue más o menos igual (65.8 y 76.8%, respectivamente).

Por último, en la variedad Michoacán 12A3, el efecto de la sequía fue más severo en la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub>, disminuyendo la nodulación en un 76.8%, con contraste con la cepa CPMEEX1<sub>Str150</sub> donde la nodulación fue abatida en un 47.6% (Ver Cuadro 8).

#### C. Llenado de vaina.

En esta caso, solamente se encontró nodulación en la variedad Negro 150G3. Se observó que igual como en el estado vegetativo, la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub> presentó los porcentajes más altos de nodulación, tanto en riego como en sequía.

La sequía redujo en un 61.2 y 55.9% la nodulación por las cepas CPMEEX1<sub>Str150</sub> y CPMEEX22<sub>Spe200</sub>, respectivamente. La sequía fue menos severa en la cepa CPMEEX22<sub>Spe200</sub>.

Como ya se mencionó antes, el hecho de que una cepa tenga más afinidad por un hospedero particular, está en función del mecanismo de reconocimiento entre ambos simbiositas (Napoli, *et. al.*,

1975; Currier y Strobil, 1976; Fahraeus y Sahlman, 1977; Brill, 1977; Sprent, 1979; Dazzo, 1980).

Sin embargo, cuando ambos simbiontes fueron sometidos a tensión hídrica, el mecanismo de reconocimiento fue modificado. De hecho, el abatimiento de la nodulación, se explica por las alteraciones que la sequía provocó en el mecanismo de reconocimiento entre ambos simbiontes: a) Ausencia de pelos radicales adecuados para la infección; b) Disminución en la producción y/o desecación de los exudados de la raíz; c) Abatimiento en la proliferación de las rizobias en el suelo, y d) Incapacidad de las bacterias para alinearse en el pelo radical.

Estas alteraciones, se presentaron en diferente grado, dependiendo esto, del estado fenológico del hospedero, de la misma capacidad competitiva de cada mutante con relación a las cepas nativas y de los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo. En términos generales, se encontró que la formación de nódulos por la cepa CPME<sup>X</sup><sub>1</sub><sup>Str150</sup> fue ligeramente más sensible a la sequía que la formación de nódulos por la cepa CPME<sup>X</sup><sub>22</sub><sup>Spe200</sup>.

El porcentaje de nodulación más alto, bajo riego (42.42%), estuvo dado por la cepa CPME<sup>X</sup><sub>22</sub><sup>Spe200</sup> en el estado vegetativo; mientras que el porcentaje de nodulación más alto, bajo sequía (23.11%), estuvo dado por la cepa CPME<sup>X</sup><sub>1</sub><sup>Str150</sup> en el estado vegetativo (Ver el Cuadro 7). El efecto de la sequía en el proceso infectivo de las cepas introducidas se manifestó en dos niveles; 1) destruyendo los nódulos formados antes de someter a las

CUADRO 7. PORCENTAJE DE COMPETENCIA\* DE LOS MUTANTES DE RHIZOBIUM PHASEOLI CP MEX1<sup>Str150</sup> Y CP MEX22<sup>Spe200</sup> LAS TRES<sup>Spe200</sup> BAJA CONDICIONES DE RIEGO Y SEQUIA EN DIFERENTES ESTADOS FENOLOGICOS DE LAS TRES<sup>Spe200</sup> VARIEDADES DE PHASEOLUS VULGARIS L. USADAS.

V A R I E D A D	T R A T A M I E N T O		% C O M P E T E N C I A		
	( CEPA - NIVEL DE HUMEDAD)		ESTADO VEGETATIVO	FLORACION	LLENADO DE VAINA
NERGO 150G3	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN RIEGO	33.37	30.12	23.41
	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN SEQUIA	13.46	10.66	9.08
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN RIEGO	39.38	37.40	26.28
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN SEQUIA	16.07	14.01	11.60
BAYO DURANGO	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN RIEGO	35.71	33.42	-
	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN SEQUIA	12.19	11.42	-
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN RIEGO	38.10	40.12	-
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN SEQUIA	13.15	9.31	-
MICHOCAN 12A3	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN RIEGO	32.30	34.35	-
	CP MEX1 <sup>Str150</sup>	EN SEQUIA	23.11	18.00	-
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN RIEGO	42.42	40.60	-
	CP MEX22 <sup>Spe200</sup>	EN SEQUIA			

\*SE PLAQUEO EL 40% DE LOS NODULOS TOTALES DE CADA PLANTA.

CADA CIFRA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.

plantas bajo sequía, y 2) restringiendo la infección una vez que la planta fue sometida a tensión hídrica.

8. ACTIVIDAD NITROGENASA DEL SISTEMA SIMBIOTICO BAJO SEQUIA Y RIEGO.

A. Estado vegetativo.

En las tres variedades se observó que la sequía abatió severamente la actividad nitrogenasa. En los tratamientos inoculados con la CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub>, la actividad nitrogenasa fue reducida en 99.5, 88.3 y 78.8% en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango, y Michoacán 12A3, respectivamente.

Por otra parte, cuando se inoculó con la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>, la actividad nitrogenasa fue disminuida en 99.5, en la variedad Negro 150G3, 83.8%, en la variedad Bayo Durango y 98.3% en la variedad Michoacán 12A3.

Se encontró, que en las variedades Negro 150G3 y Michoacán 12A3, bajo sequía, no se detectó reducción de acetileno ( 0  $\mu$ moles de etileno). *Chi-Ying Huag, et. al. (1975a)*, igualmente, no detectaron reducción de acetileno en suelos con potenciales de agua de -19.5 barias.

En las tres variedades, la sequía abatió por igual la actividad nitrogenasa con ambas cepas (Ver Cuadro 8).

B. Floración.

Durante la floración, bajo riego, se obtuvieron los valores más altos de reducción de acetileno. Sin embargo, al igual que en

CUADRO B. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA\* EN LOS TRATAMIENTOS BAJO RIEGO Y SEQUIA DE LAS TRES VARIETADES DE PHASEOLUS VULGARIS L. USADAS.

V A R I E D A D	T R A T A M I E N T O		μMOL C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> PROD. / PLANTA · H <sup>-1</sup>	
	( CEPA - NIVEL DE HUMEDAD)		ESTADO VEGETATIVO	FLORACION
NEGRO 150G3	CP MEX1	Str150 EN RIEGO	56.971	158.440
	CP MEX1	Str150 EN SEQUIA	0.274	39.333
	CP MEX22	Spe200 EN RIEGO	60.524	200.165
	CP MEX22	Spe200 EN SEQUIA	0.289	12.804
BAYO DURANGO	CP MEX1	Str150 EN RIEGO	42.606	117.513
	CP MEX1	Str150 EN SEQUIA	4.992	6.878
	CP MEX22	Spe200 EN RIEGO	55.855	210.265
	CP MEX22	Spe200 EN SEQUIA	9.043	34.163
MICHOCAN 12A3.	CP MEX1	Str150 EN RIEGO	12.843	32.656
	CP MEX1	Str150 EN SEQUIA	0.160	2.823
	CP MEX22	Spe200 EN RIEGO	18.889	30.050
	CP MEX22	Spe200 EN SEQUIA	0.320	18.690

\*POR EL METODO DE REDUCCION DE ACETILENO.

el estado vegetativo, la sequía redujo severamente la actividad nitrogenasa.

En los tratamientos inoculados con la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub>, la actividad nitrogenasa fue abatida en 75.2, 94.1 y 91.4% en las variedades Negro 150G3, Bayo Durango y Michoacán 12A3, respectivamente.

Por otro lado, cuando se inoculó con la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>, la actividad nitrogenasa fue reducida en 93.6% en la variedad Negro 150G3; 83.8%, en la variedad Bayo Durango y 37.8% en la variedad Michoacán 12A3.

En la variedad Negro 150G3, el abatimiento de la actividad nitrogenasa por efecto de la sequía, fue más severo en los tratamientos inoculados con la cepa CPME<sup>X22</sup><sub>Spe200</sub>; a diferencia de lo que se observó en las variedades Bayo Durango y Michoacán 12A3, donde en los tratamientos inoculados con la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub> se registraron los valores más altos de inactivación de la nitrogenasa.

En general, los valores más altos de inactivación de la nitrogenasa, por efecto de la sequía, se presentaron en los tratamientos inoculados con la cepa CPME<sup>X1</sup><sub>Str150</sub> (Ver Cuadro 8).

Se encontró que el déficit de agua en el suelo, indujo un rápido abatimiento de la fijación de nitrógeno; *Lie, (1981); Sprent, (1971); Sprent, (1972 a y b) e Ismaili, et. al. (1983)* encontraron este mismo efecto.

Se ha reportado que uno de los efectos primarios de la sequía sobre la actividad de los nódulos es el daño osmótico, resultan-

do esto en una alta concentración de sales alrededor del nódulo. Por otra parte, *Pankhurst y Sprent (1975)* y *Sprent (1976)*, sugirieron que el primer efecto de la tensión hídrica sobre el nódulo, fue disminuir la incorporación de  $O_2$ , lo cual resultó en la reducción del suministro de metabolitos disponibles (como el ATP) esenciales para la fijación de nitrógeno.

Sin embargo, el mal funcionamiento de los nódulos, también estuvo condicionado al deficiente aporte de fotosintatos de plantas cercanas al punto de marchitez permanente.

En todos los casos, se encontró que la tensión hídrica abatió la reducción de acetileno ( $C_2H_2$ ). Resultados similares fueron encontrados por *Van Straten y Schmidt (1974)*, *Jin-Min Sung (1982)* y *Chi Ying Huag, et. al. (1975 a y b)*.

Los valores de reducción de acetileno, debidos a las cepas nativas, bajo riego y sequía, nunca sobrepasaron de 6  $\mu$ moles y 10 nmoles de  $C_2H_4$  producido/planta  $\cdot h^{-1}$ , respectivamente.

## VII. CONCLUSIONES

1. El marcaje genético, como la Resistencia a antibióticos, en cepas de *Rhizobium phaseoli*, no necesariamente va acompañado del abatimiento de las propiedades simbióticas (infectividad y efectividad) de la bacteria, sino que incluso, ésta última puede incrementar dichas propiedades.
2. En términos generales, la sensibilidad de las plantas a la sequía fue menor, media y mayor, en los estados vegetativo, floración y llenado de vaina, respectivamente.
3. Los valores de Resistencia Estomatal ( $r_s$ ) y Transpiración, iguales o menores a  $30 \text{ seg cm}^{-1}$  y  $1 \text{ gH}_2\text{O cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ , respectivamente, reducen drásticamente los valores de peso seco de follaje, de raíz, de nódulos y el número total de estos. Por lo cual, son aceptadas las hipótesis planteadas por este experimento.
4. Los potenciales de agua ( $\Psi_w$ ) del suelo menores a -15 barías, abatieron el número de mutantes de *R. phaseoli* viables; presentandose siempre una caída drástica durante el estado vegetativo y una posterior disminución paulatina a lo largo de la floración y el llenado de vaina. En general, el rango de abatimiento de las poblaciones de mutantes introducidas, fue del orden de 2 a 5 números logarítmicos.



5. El severo efecto de la sequía en la sobrevivencia de los mutantes de *R. phaseoli* introducidos, probablemente, esta relacionado con:
  - a). La particular sensibilidad de *R. phaseoli* a la desecación,
  - b). Su condición de rápido crecimiento, y
  - c). Su inhabilidad de producir suficiente polisacárido extracelular.
  
6. Los porcentajes de nodulación bajo sequía dados por las cepas introducidas fueron: alto, medio y bajo en los estados vegetativo, floración y llenado de vaina, respectivamente.
  
7. En los genotipos Negro 150G3 y Bayo Durango, la cepa CPME<sub>X</sub>22<sub>Spe200</sub> dió los valores más altos de nodulación bajo sequía; a diferencia de la variedad Michoacán 12A3, donde la cepa CPME<sub>X</sub>1<sub>Str150</sub> fue la más exitosa. En términos generales, la CPME<sub>X</sub>1<sub>Str150</sub> fue ligeramente más sensible a la sequía, en la formación de nódulos.
  
8. Bajo condiciones restrictas de humedad, la actividad nitrogenasa en el estado vegetativo fue drásticamente reducida, incluso sin detectarse volares significativos de reducción de acetileno ( $0 \mu\text{moles de C}_2\text{H}_4$ ); no así durante la floración, donde a pesar de que fue abatida la actividad nitrogenasa, no se obtuvieron valores de cero.
  
9. En general, los valores más altos de inactivación de la nitrogenasa, bajo sequía, se presentaron en los tratamientos inoculados con la cepa CPME<sub>X</sub>1<sub>Str150</sub>.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN, O.N. AND ALLEN, E.K. 1981. The Leguminosae. A source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. The University of Winsconsin Press, U.S.A.
2. ALCANTAR, G.E. 1978. Estudio del efecto de diferentes dosis de Nitrógeno en dos fuentes, sobre los procesos de nodulación, fijación de  $N_2$  y rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
3. ANDERSON, S.J. AND PHILLIPS, D.A. 1976. Effect of protein additives on acetylene reduction (Nitrogen Fixation) by *Rhizobium* in the presence and absence of soybean cells. Plant Physiol. 57: 890-893.
4. ARMENTA, B.A.D. 1983. Fertilización e inoculación con *Rhizobium* y Endomicorriza (V-A) en garbanzo blanco (*Cicer arietinum* L.) en suelos del Noroeste de México.
5. BALANDREAU, J. AND KNOWLES, R. 1978. The Rhizosphere. In: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Ed. Donmergues, V.R. and Kuupa, S.V. Elsevier Scientific. Publishing Company N.Y.

6. BANCO DE MEXICO, 1982. Cultivos de maíz y frijol en México, participación del FIRA en su producción.  
Banco de México.
7. BERINGER, J. 1978. Rhizobial recognition. Nature, Lond. 271:  
206-207.
8. BOHLOOL, E.B. AND SCHMIDT, E.L. 1970. Immunofluorescent detection of *Rhizobium japonicum* in Soils. Soil Sci. 110(4): 229-236.
9. BOONKERD, N. AND WEAVER, R.W. 1982. Survival of Cowpea Rhizobia in Soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. 43(3): 585-589.
10. BUSHBY, H.V.A. 1981. Changes in the numbers of antibiotic-resistant Rhizobia in the soil and Rhizosphere of field grown *Vigna mungo* cv. Regur. Soil Biol. Biochem. 13: 241-245.
11. BUSHBY, H.V.A. AND MARSHALL, K.C. 1977a. Some factor affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. Soil Biol. Biochem. 9: 143-147.
12. BUSHBY, H.V.A. AND MARSHALL, K.C. 1977b. Desiccation-induced damage to the cell envelope of root-nodule bacteria. Soil Biol. Biochem. 9: 149-152.
13. BRILL, W.J. 1977. Biological Nitrogen Fixation. Scient. Am. 236-68-81.

14. BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E.A. AND GAULT, R.R. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments-V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol. Biochem. 9: 19-24.
15. CAMPBELL, D.H.; GARVEY, J.S.; CREMER, N.E. AND SUSSDORF, D.H. 1970. Methods in Immunology. Second Edition. W.A. Benjamin, Inc, New York.
16. CIHA, A.J. AND BRUN, J.W. 1975. Stomatal size and frequency in soybeans. Crop Sci. 15: 309-315.
17. CUAUTLE, F.M.E. 1979. Efecto de la fertilización, fumigación del suelo e inoculación con *Rhizobium*, sobre la nodulación, contenido de nitrógeno y rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Chapingo, Méx. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
18. CURRIER, W.W. AND STROBEL, G.A. 1976. Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to plant root exudates. Plant Physiol. 57: 820-823.
19. CHANDLER, M.R. 1978. Some observation of infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. J. Exp. Bot. 29: 749-755.

21. CHI-YING HUANG; BOYER, J.S. AND VANDERHOEF, L.N. 1975a. Acetylene reduction (Nitrogen Fixation) and metabolic activities of soybean having various leaf and nodule potentials. Plant Physiol. 56: 222-227.
22. CHI-YING HUANG; BOYER, J.S. AND VANDERHOEF, L.N. 1975b. Limitation of acetylene reduction (Nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. Plant Physiol. 56: 228-232.
23. DART, P.; DAV, J.; ISLAM, R. AND DOBEREINER, J. 1976. Symbiosis in tropical grain legumes: some effects of temperature and the composition of the rooting medium. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. I.B.P. Vol. 7., Ed. by Nutman, P.S. Cambridge University Press, London: 361-384.
24. DAVIES, W.J. 1977. Stomatal responses to water stress and light in plants grown in controlled environments and in the field. Crop. Sci. 17: 735-740.
25. DAWSON, C.R. 1970. Potential for increasing protein production by legume inoculation. Plant and Soil. 32: 655-673.

26. DAZZO, F.B. 1980. Adsorption of microorganisms to root and other plant surfaces. In: Adsorption of microorganisms to surface. Ed. Britton, G. and Marshall, K.C. and Sons. Inc.
27. DAZZO, F.B AND BRILL, W.J. 1978. Regulation by Fixed Nitrogen of Host-Symbiont recognition in the *Rhizobium* - Clover Symbiosis. *Plant Physiol.* 62: 18-21.
28. DAZZO, F.B. AND BRILL W.J. 1979. Bacterial polysaccharide which binds *Rhizobium trifolii* to clover root hairs. *J. Bacteriol.* 137: 1362-1373.
29. DAZZO, F.B. AND HUBBELL, D.H. 1975. Cross-reactive antigens and Lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-Clover association. *Appl. Microbiol.* 30: 1017-1033.
30. DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M. AND GARDIOL, A.E. 1982a. Alteration of Trifliin A - binding capsule of *Rhizobium trifolii* 0403 by enzymes released from clover roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 478-490.
31. DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L. AND KIJNE, J.W. 1982b. Lectin involvement in root-hair tip adhesion as related to the *Rhizobium*-Clover symbiosis. *Physiol. Plant.* 56: 143-147.

32. DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.; ABE, M. AND PANKRATZ, S.M. 1984. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (6): 1140-1150.
33. DAZZO, F.B.; URBANO, M.R. AND BRILL, W.S. 1979. Transient appearance of Lectin receptors of *Rhizobium trifolii*. *Current Microbiology*. Vol. 2: 15-20.
34. DAZZO, F.B.; YANKE, W.E. AND BRILL, W.J. 1978. Trifoliin: a *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Biochem. Biophys. Acta* 539: 276-286.
35. DEMORANVILLE, C.J.; KAMINSKI, A.R.; BARNETT, N.M.; BOTTINO, P.J. AND BLEVINS, D.G. 1981. Substances from cultured soybean cells which stimulate or inhibit acetylene reduction by free-living *Rhizobium japonicum*. *Physiol. Plant.* 52: 53-58.
36. DIATLOFF, A. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments-6. Antigenic and symbiotic stability in *Lotononis* over 12-year period. *Soil Biol. Biochem.* 9: 55-58.

37. DILWORTH, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta 127: 285-294.
38. ENGIN, M. AND SPRENT, J.I. 1973. Effects of water stress on growth and nitrogen-fixing activity of *Trifolium repens*. New Phytol. 72:117-126.
39. EHRLER, W.L. AND VAN BAVEL, C.H.M. 1968. Leaf diffusion resistance, illuminance and transpiration. Plant Physiol. 43:208.
40. FAHRAEUS, G. AND SAHLMAN, K. 1977. The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. Ann. Acad. Reg. Sci. Upsaliensis. 20:103-131.
41. FAO, 1983. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
42. FAO, 1984. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Legume inoculantes and their use. FAO, Rome, 63 p.
43. FERRERA-CERRATO, R. Y LOPEZ-ALCOCER, E. 1985. Manual del Curso de Fijación Simbiótica de Nitrogeno *Rhizobium*-Leguminosa. CEDAF-Microbiología de Suelos, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.



44. FRANCO, A.A. AND VINCENT, J.M. 1976. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant and Soil* 45: 27-48.
45. GARCIA, E. 1968. *Los Climas del Valle de México*. CP., ENA. Chapingo, México. Serie de Sobretiros No. 6.
46. GARCIA, E. 1980. Apuntes de Climatología según el programa vigente de Biólogos, UNAM; de la ENEP de Cuauhtitlán, UNAM y de la UAM, México, D.F. 153 pp.
47. GIBSON, A.H.; DATE, R.A.; IRELAND, J.A. AND BROCKWELL, J. 1976. A comparison of competitiveness and persistence amongst five strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol Biochem.* 8:395-401.
48. GOLLOBIN, G.S. AND LEVIN, R.A. 1974. Streptomycin resistance in *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 101:83-99.
49. GONZALEZ, C.A. 1981. Tasas evapotranspirativas y efecto de varios niveles de humedad del suelo en el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 109 pp.
50. GRAHAM, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A Review. *Field Crop Research.* 4:93-112.

51. GUZMAN-PLAZOLA, R.; FERRERA-CERRATO, R. Y LEPIZ, I.R. 1983. Proposición de un sistema alternativo al uso de las bolsas de crecimiento (Growthpouch) en la determinación del número más probable de *Rhizobium phaseoli* en suelo. Resúmenes. Inst. Tec. Agropecuario de Oaxaca No. 23. Soc. Mex. de la Ciencia del Suelo: 123-124.
52. HALE, C.N. 1978. Antibiotic resistance markers in ecological studies on *Rhizobium*. *Rhizobium Newsletter*, September 23(2): 14-16.
53. HARRISON, M.A. AND WALTON, D.C. 1975. Absciscic Acid Metabolism in water-stress bean leaves. *Plant Physiol.* 56: 250-254.
54. HERNANDEZ, X.E.; RAMOS, R.A. Y MARTINEZ, A.M.A. 1979. Contribucion al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Ed. Engleman, E.M. Botánica, CP. Chapingo, México.
55. ISMAILI, M.; BRISKE, D.D. AND WEAVER, R.W. 1983. Nitrogen Fixing Activity of water stressed Siratro. *Agronomy Journal.* 75:649-653.
56. ITAI, C. AND MEIDNER, H. 1978. Effect of Absciscic acid on solute transport in epidermal tissue. *Nature* 172:652-653.

57. ITAI, C.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R.; MEIDNER, H. AND WILLMER, C. 1978. Abscisic acid and guard cells of *Commelina communis* L. Nature 271:652-653.
58. JIN-MIN SUNG, 1982. The effect of water stress on the nitrogen fixation efficiency of field-grown soybean. J. Agric. Assoc. of China, New Series No. 117:15-24.
59. JONES, H.G. 1978. How plants respond to stress. Nature 271:610
60. JORDAN, D.C. 1962. The bacteroids of genus *Rhizobium*. Bact. Rev. 26: 119-141.
61. KEILIN, D. AND SMITH, J.D. 1947. Haemoglobin and nitrogen fixation in root nodules of leguminous plants. Nature, London 159: 692-694.
62. KEISTER, D.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. J. Bacteriol. 123: 1265-1268.
63. KILBERTUS, G.; PROTH, J. AND VERVIER, B. 1979. Effects de la desiccation sur les bacteries Gram-Negatives d'un soil. Soil Biol. Biochem. 11:109-114.
64. KLEEZKOWSKA, J. 1971. Genetical changes in *Rhizobium* bacteria and their bacteriophage during coexistence. Plant and Soil. Special Vol., 47-56.
65. KRAMER, J.P. 1974. Relaciones hídricas de suelos y plantas. 1a. Ed. Edutex, S.A. México, D.F. 364-368.

66. KURZ, W.G. AND LA RUE, T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature* 256:407-409.
67. LARQUE-SAAVEDRA, A. 1980. Fisiología Vegetal Experimental. El agua en las plantas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
68. LARQUE-SAAVEDRA, A.; TREJO, L.C. Y GUTIERREZ, D.F. 1982. Perfil de respuestas estomatales de frijol en invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia* 50: 7-15.
69. LARQUE-SAAVEDRA, A.; TREJO-LOPEZ, C. AND VASCO. 1984. A physiological drought parameter for agronomic yield. Supplement to *Plant Physiol.* August 12-17, 1984, page 23.
70. LAW, I.J. AND STRIJDOM, B.M. 1977. Some observations on plant lectines and *Rhizobium* specificity. *Soil Biol. Biochem.* 9:79-84.
71. LIE, T.A. 1981. Environmental physiology of the legumes *Rhizobium* symbiosis. In: *Nitrogen Fixation Vol. 1.* Ecology. Ed. by W.J. Broughton. Oxford University Press.
72. MAHLER, R.L. AND WOLLUM II, A.G. 1980. Influence of water potential on the survival of *Rhizobium* in a Goldsboro Loamy Sand. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:988-992.

73. MAHLER, R.L. AND WOLLUM II, A.G. 1981. The influence of soil water potential and soil texture on the survival of *Rhizobium japonicum* and *R. leguminosarum* isolates in the soil. Soil soc. Am. J. 45: 761-766.
74. MARSHALL, K.C. 1964. Survival of root-nodule bacteria in dry soil exposed to high temperatures. Aust. J. Agric. Res. 15: 273-281.
75. MARTINEZ, G.R.; OLALDE, P.V. Y PENA-CABRIALES, J.J. 1985. Efecto de la cepa *Rhizobium meliloti* sobre la longevidad del nódulo. Tercera Reunión sobre la Fijación Biológica del Nitrogeno . Resúmenes Soc. Nal. de la Fijación del Nitrógeno. Fac. Química, UNAM.
76. MARX, J. 1982. ¿Es posible fertilizar sin fertilizante? Información Científica y Tecnológica. CONACYT, México. 1(70): 20-31.
77. MATHIEU, B.M.L. 1982. Estudio rizosférico del frijol *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a estreptomycin. Tesis Profesional. Instituto Politécnico Nacional, México.
78. MC COMB, J.A.; ELLIOT, J. AND DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. Nature 256: 409-410.

79. MORENO DAHME, R. 1970. Clasificaciones tentativas para usarse en el Laboratorio de suelos del INIA-SAG, Chapingo, México. (Mimeografiado).
80. NAPOLI, C.; DAZZO, F. AND HUBBELL, D. 1975. Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. Appl. Microbiol. 30: 123-131.
81. NAVA, S.T. 1984. Resistencia a la sequía XIV. Resistencia a la sequía de cuatro cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. Tesis Profesional UNAM. 104pp.
82. OCHOA, M.R. 1977. Estudio de algunas características del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como indicadores de tolerancia a sequía. Trabajos de campo e invernadero. Tesis M.C. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" 55 pp.
83. OSA-AFIANA, L.O. AND ALEXANDER, M. 1979. Effects of moisture on the survival of *Rhizobium* in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 43: 925-930.
84. OSA-AFIANA, L.O. AND ALEXANDER, M. 1982. Differences among Cowpea Rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in Soil. Appl. Environm. Microbiol. 43(2): 435-439.
85. PAGAN, J.D.; CHILD, J.J.; SCOWCROFT, W.R. AND GIBSON, A. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. Nature 256:406-407.

86. PALEC, L.G. AND ASPINALL, D. 1981. The physiology and Biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press Australia.
87. PANKHURST, C.E. AND SPRENT, J.I. 1975. Effects of water stress on respiratory and nitrogen fixation activity of soybean root nodules. J. Exp. Bot., 26: 287-304.
88. PATE, J.S. 1976. Physiology of the reaction of nodulate legumes to environmental. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. IBP Vol. 7., Ed. by Nutman P.S., Cambridge University, London, 335-360.
89. PEMADASA, M.A. 1979. Movements of abaxial and adaxial stomata. New Phytol. 82:69-80.
90. PENA-CABRIALES, J.J. AND ALEXANDER, M. 1979. Survival of *Rhizobium* in soil undergoing. Soil Sci. Am. J. 43: 962-966.
91. PENA-CABRIALES, J.J. AND ALEXANDER, M. 1983. Growth of *Rhizobium* in unamended soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 47: 81-84.
92. POSTGATE, J.R. 1979. Antibiotic resistance markers in ecological studies on *Rhizobium*: a comment. *Rhizobium* Newsletter, April 24(1):23-24.

93. QUISPÉL, A. 1974. The biology of nitrogen fixation. *Frontiers of Biology*. Vol 33 North Holland Publishing Company. Amsterdam, Oxford.
94. RATHORE, T.R.; CHHONKAR, P.K.; SACHAN, R.S. AND GHILDYAL, B.P. 1981. Effect of soil moisture stress on legume-*Rhizobium* symbiosis in soybeans. *Plant and Soil*. 60:445-450.
95. RAY, P.M. 1980. La Planta viviente. Serie Biología Moderna. Compañía Editorial Continental, México.
96. ROBERT, F.M. AND SCHMIDT, E.L. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and Rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(2): 550-556.
97. RODRIGUEZ, M.M.N. Y FERRERA-CERRATÓ, R. 1980. Sobrevivencia de *Rhizobium phaseoli* sobre la semilla de frijol durante el proceso de germinación hasta plántula. Avances en la enseñanza y la investigación. CEDAF-Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
98. RODRIGUEZ, M.M.N. Y FERRERA-CERRATÓ, R. 1984. Estudio y Caracterización de la relación simbiótica de *Rhizobium phaseoli* en frijol *Phaseolus vulgaris* L. de distintos hábitos de crecimiento. XII Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*, 21-26 de Octubre.



99. SALISBURY, F.B. AND PARKE, R.V. 1968. Vascular plants: Form and function. Wadsworth Publishing Company. Inc. Belmont, California, U.S.A.
100. SANDERS, R.E.; CARLSEN, R.W. AND ALBERSHEIM, P. 1978. A *Rhizobium* mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature. Lond. 271: 240-242.
101. SCHÖLHORN, R. AND BURRIS, R.H. 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of  $N_2$  fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 58: 213-216.
102. SCHULZE, E.D.; LONGE, O.L.; BUCHBOM, U.; KAPPEN, L. AND EVENARI, M. 1972. Stomatal responses to changes in humidity in plants growing in desert. Plant (Berl.) 108: 259-270.
103. SCHWINGHAMER, E.A. 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonio V. Leeuwenhock 33: 121-136.
104. SCHWINGHAMER, E.A. AND DUDMAN, W.F. 1973. J. Appl. Bacteriol. 36: 263.
105. SCOWCROFT, W.R. AND GIBSON, A.H. 1975. Nitrogen-fixation by *Rhizobium* associated with tobacco and cowpea cell cultures. Nature: 253: 351-352.
106. SERRANO, J.L. 1964. Algunas diferencias fisiológicas y morfológicas de especies y variedades de frijol

tolerantes a la sequía. Agricultura Técnica en México II (1):161-164.

107. SINGLETON, P. Y CUAUTLE-FABIAN, E. 1982. El efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium*. XI. Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*-RELAR. Memorias. 24-29 de octubre de 1982. Lima, Perú: 175-181.
108. SOMASEGARAN, P. AND HOBEN, H.J. 1985. Methods in Legume-Rhizobium Technology. NIFTAL-University of Hawaii-MIRCEN. 367p.
109. SPRENT, J.I. 1971. The effect of water stress on nitrogen-fixing root nodules. I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. New. Phytol. 70:9.
110. SPRENT, J.I. 1972 a. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. II. Effects on the fine structure of detached soybean nodules. New. Phytol. 71:443-450.
111. SPRENT, J.I. 1972 b. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. III. Effects of osmotically applied stress. New Phytol. 71: 451-460.

112. SPRENT, J.I. 1972 c. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max* (L.) Merr. New Phytol. 71:603-611.
113. SPRENT, J.I. 1976. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Vol. 7 IBP. Ed. Nutman, P.S. Cambridge University Press, London: 405-420.
114. SPRENT, J.I. 1979. The biology of nitrogen-fixing organisms. Mc. Graw-Hill Book Co. 185 pp.
115. SPRENT, J.I. AND GALLACHER, A.E. 1976. Anaerobiosis in soybean root nodules under water stress. Soil. Biol. Biochem. 8:317-320.
116. SUMMERFIELD, R.J.; HURLEY, P.A. AND MICHEN, F.E. 1976. Plant and management techniques for growing grain legumes under simulated tropical conditions in controlled environments. Expl. Agric. 13:81-92.
117. SUTCLIFFE, J. 1968. Plant and water. New York: St. Martin's Press.
118. TURNER, N.C. 1969. Stomatal resistance to transpiration in three contrasting canopies. Crop. Sci. 9: 303-307.

119. VAN ENGERAAT, A.W.S.M. 1975a. The growth of *Rhizobium leguminosarum* on the root surface and in the rhizosphere on pea seedlings in relation to root exudates. *Plant and Soil*. 42:367-379.
120. VAN ENGERAAT, A.W.S.M. 1975b. The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant and Soil* 42: 381-386.
121. VAN STRATEN, J. AND SCHWIDT, E.L. 1974. Diminution of acetylene reduction during assay of detached soybean nodules. *Soil. Biol. Biochem.* 6:231-234.
122. VILLAREAL, M.A. y LARQUE-SAAVEDRA, A. 1981. Efecto de la sequía en plántulas de frijol y su reflejo en la producción. Simposium; El trasplante de maíz y frijol. Editor: Larqué-Saavedra, A. CEICADAR, Puebla, México: 29-35.
123. VINCENT, J.M. 1975. *Manual Práctico de Rhizobiología*. Buenos Aires, Argentina. Ed. Hemisferio Sur. 200 p.
124. VINCENT, J.M.; *et. al.* 1976. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. NIFTAL Proceedings a workshop University of Hawaii U.S.A

125. WINTER, 1981. El agua, el suelo y la Planta. Ed. Diana, México: 222p.
126. WORRAL, V.S. AND ROUGHLEY, R.J. 1976. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. b. *Rhizobium trifolii* Dang. J. Exp. Bot. 27(101): 1233-1241.
127. YAO, P.V. AND VINCENT, J.M. 1969. Host specificity in the root hair "curling factor" of *Rhizobium* spp. Aust. J. Biol. Sci. 22:413-423.
128. YAO, P.V. AND VINCENT, J.M. 1976. Factor responsible for the curling and branching of clover root hairs by *Rhizobium*. Plant and Soil. 45:1-16.
129. ZELAZNA-KOWALSKA, I. 1971. Corralation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. Plant and Soil, special Vol., 67-71.

## IX. APÉNDICE

### APÉNDICE I. MEDIO CALDO DE EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL, CELM (VINCENT, 1975).

---

$K_2HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	1.5 g
Manitol	10.0 g
Agua	1000.0 ml

---

EL pH SE AJUSTA A 7

SE ESTERILIZA A 18 LIBRAS DURANTE 18 MIN.

### APÉNDICE II. MEDIO EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL, AGAR ROJO CONGO, ELMARC (VINCENT, 1975)

---

$K_2HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	1.5 g
Manitol	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 ml
Solución de Rojo Congo*	10.0 ml

---

\*SOLUCION DE ROJO CONGO: 1G EN 400 ML. DE AGUA

EL pH SE AJUSTA A 7

SE ESTERILIZA A 18 LIBRAS DURANTE 18 MIN.

APENDICE III. SOLUCION NUTRITIVA SADMAN USADA EN EL SISTEMA HIDROPONICO DEL EXPERIMENTO - PRELIMINAR EN INVERNADERO (SUMMERFIELD, ET. AL., 1977).

---

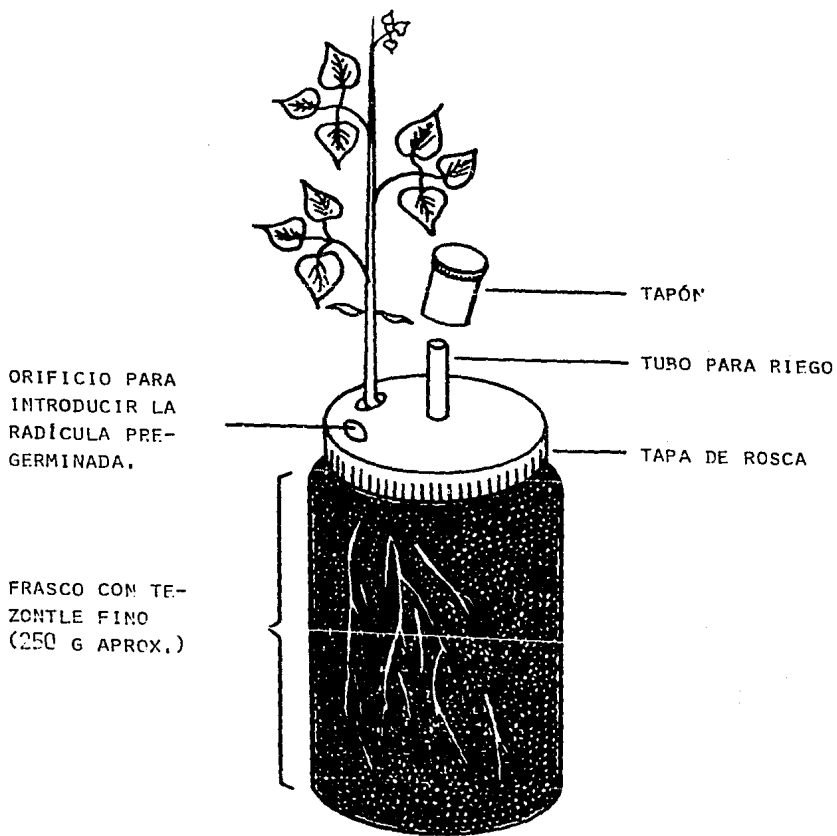
M E D I O - B A S I C O

Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.06 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.33 g
CaSO <sub>4</sub>	0.29 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.36 g
NaFe EDTA	0.01 g
Ca (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0.062g
Microelementos	0.05 ml
Agua	1000.00 ml

M I C R O E L E M E N T O S

KCl	27.0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	17.0 g
ZnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2.7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2.7 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.4 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.8 ml
Agua	1990.0 ml

---



APÉNDICE IV. UNIDAD DE CRECIMIENTO C.P.



APENDICE V. ESCALADA DE MC. FARLAND (CAMPBELL, ET. AL.,  
1970).

NO TUBO	1 % BaCl <sub>2</sub> (ml)	1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	NO. APROX. DE BACTERIAS ( x 10 <sup>8</sup> )
1	0.1	9.9	300 = 3 x 10 <sup>8</sup>
2	0.2	9.8	600 = 6 x 10 <sup>8</sup>
3	0.3	9.7	900 = 9 x 10 <sup>8</sup>
4	0.4	9.6	1200 = 12 x 10 <sup>8</sup>
5	0.5	9.5	1500 = 15 x 10 <sup>8</sup>
6	0.6	9.4	1800 = 18 x 10 <sup>8</sup>
7	0.7	9.3	2100 = 21 x 10 <sup>8</sup>
8	0.8	9.2	2400 = 24 x 10 <sup>8</sup>
9	0.9	9.1	2700 = 27 x 10 <sup>8</sup>
10	1.0	9.0	3000 = 30 x 10 <sup>8</sup>

APENDICE VI. RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) Y TRANSPIRACION MEDIDAS SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, A LAS 12:00 HRS., EN LOS TRES GENOTIPOS DE PHASEOLUS VULGARIS L. DURANTE EL ESTADO VEGETATIVO.

G E N O T I P O	NIVEL DE HUMEDAD	PARAMETRO	D I A D E L E C T U R A *					
			1o.	5o.	7o.	9o.	11o.	12o.
NEGRO 150G3	RIEGO	$r_s$	1.863	1.203	0.930	0.930	1.306	
	SEQUIA	$r_s$	1.325	1.189	1.053	5.440	97.731	
	RIEGO	TRANSPIRACION						
	SEQUIA	TRANSPIRACION						
BAYO DURANGO	RIEGO	$r_s$	1.465	1.831	1.655	2.107	1.022	1.065
	SEQUIA	$r_s$	1.645	0.949	0.954	1.905	14.933	36.081
	RIEGO	TRANSPIRACION	4.689	12.000	15.782	19.323	15.400	15.011
	SEQUIA	TRANSPIRACION	4.254	13.012	15.016	20.211	2.372	0.681
MICHOCAN 12A3	RIEGO	$r_s$	1.471	0.844	1.041	0.973	0.877	1.100
	SEQUIA	$r_s$	1.415	1.003	1.299	0.918	10.898	22.631
	RIEGO	TRANSPIRACION	5.409	13.535	12.832	15.263	18.280	13.564
	SEQUIA	TRANSPIRACION	5.319	15.450	11.619	16.594	5.262	0.812

$r_s$  DADA EN  $\text{cm} \cdot \text{seg}^{-1}$ ; TRANSPIRACION DADA EN  $\mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ .

CADA CIFRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

\*A PARTIR DEL ULTIMO RIEGO (EN EL CASO DE LOS TRATAMIENTOS BAJO SEQUIA).

- GNT -

APENDICE VII. RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) Y TRANSPIRACION MEDIDAS SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, A LAS 12:00 HRS., EN LOS TRES GENOTIPOS DE PHASEOLUS VULGARIS L. DURANTE LA FLORACION.

G E N O T I P O	NIVEL DE HUMEDAD	PARAMETRO	D I A D E L E C T U R A *			
			1o.	4o.	6o.	8o.
NEGRO 150G3	RIEGO	$r_s$	0.671	2.426	4.768	1.901
	SEQUIA	$r_s$	0.611	11.621	99.352	-
	RIEGO	TRANSPIRACION	8.50	15.53	7.80	14.45
	SEQUIA	TRANSPIRACION	17.05	14.20	8.10	0.22
BAYO DURANGO	RIEGO	$r_s$	0.671	0.902	0.954	1.324
	SEQUIA	$r_s$	0.610	1.205	0.805	338.250
	RIEGO	TRANSPIRACION	17.04	15.23	17.02	11.94
	SEQUIA	TRANSPIRACION	20.24	14.27	16.78	0.27
MICHUACAN 12A3	RIEGO	$r_s$	0.672	0.865	1.020	0.835
	SEQUIA	$r_s$	0.614	0.861	3.272	40.854
	RIEGO	TRANSPIRACION	17.25	14.76	11.33	13.72
	SEQUIA	TARNSPIRACION	19.03	12.58	6.78	0.34

$r_s$  DADA EN  $\text{cm} \cdot \text{seg}^{-1}$ ; TRANSPIRACION DADA EN  $\mu\text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ .

CADA CIFRA CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES

\*A PARTIR DEL ULTIMO RIEGO (EN EL CASO DE LOS TRATAMIENTOS BAJO SEQUIA).

APENDICE VIII. RESISTENCIA ESTOMATAL ( $r_s$ ) Y TRANSPIRACION MEDIDAS SOBRE EL TRIFOLIO CENTRAL DE LA ULTIMA HOJA, A LAS 12:00 HRS., EN LOS TRES GENOTIPOS DE PHASEOLUS VULGARIS L. DURANTE EL LLENADO DE VAINA.

G E N O T I P O	NIVEL DE HUMEDAD	PARAMETRO	D I A D E L E C T U R A *					
			1o.	4o.	5o.	6o.	7o.	8o.
NEGRO 150G3	RIEGO	$r_s$	1.836	2.302	1.574	-	2.451	-
	SEQUIA	$r_s$	2.051	2.852	1.783	-	76.900	-
	RIEGO	TRANSPIRACION	8.53	5.79	7.13	-	5.73	-
	SEQUIA	TRANSPIRACION	8.29	4.86	2.43	-	0.36	-
BAYO DURANGO	RIEGO	$r_s$	2.306	3.104	-	-	3.405	2.651
	SEQUIA	$r_s$	2.306	1.802	-	-	11.735	83.103
	RIEGO	TRANSPIRACION	3.05	2.76	-	-	2.89	2.30
	SEQUIA	TRANSPIRACION	2.56	3.19	-	-	2.10	0.25
MICHOCAN 12A3	RIEGO	$r_s$	1.255	2.358	-	1.762	-	-
	SEQUIA	$r_s$	1.481	8.106	-	60.536	-	-
	RIEGO	TRANSPIRACION	7.23	8.73	-	6.61	-	-
	SEQUIA	TRANSPIRACION	8.95	1.87	-	0.96	-	-

$r_s$  DADA EN  $cm \cdot seg^{-1}$ ; TRANSPIRACION DADA EN  $\mu g H_2O cm^{-2} \cdot seg^{-1}$ ,

CADA CIFRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE 12 UNIDADES EXPERIMENTALES.

\*A PARTIR DEL ÚLTIMO RIEGO (EN EL CASO DE LOS TRATAMIENTOS BAJO SEQUIA).

APENDICE IX. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCION DE PESO SECO DE FOLLAJE (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA - SOBRE LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM PHASEOLI - PHASEOLUS VULGARIS L.

F U E N T E	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F.C.	Ft	SIGNIF.
N	3	1103.673	367.891	126.02		* *
H	1	461.418	461.418	158.06		* *
V	2	4640.853	2320.426	794.88		* *
EF	2	8885.633	4442.816	1521.92		* *
N*H	3	4.439	4.813	1.65		n.s.
N*V	6	94.614	15.769	5.40		* *
N*EF	6	413.188	68.864	23.59		* *
V*H	2	1.711	0.855	0.29		n.s.
H*EF	2	97.854	48.927	16.76		* *
V*EF	4	1359.871	453.290	155.28		* *
N*H*EF	6	32.665	5.444	1.86		n.s.
N*V*EF	9	41.583	4.620	1.58		n.s.
N*H*EF	3	5.083	1.694	0.58		n.s.
N*V*H*EF	14	36.813	2.629	0.90		n.s.
ERROR	129	376.577	2.919208			
TOTAL	191	17 565.982				

\* \* SIGNIFICATIVO AL 1%

n.s. NO SIGNIFICATIVO

C.V. 13.5363

APENDICE X. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCION DE PESO SECO DE  
RAIZ (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE  
LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM PHASEOLI* - *PHASFOIUS VULGARIS* L.

F U E N T E	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F.C.	Ft	SIGNIF.
N	3	9.81391	3.27130	117.47		**
H	1	6.52877	6.52877	234.44		**
V	2	3.01162	1.50581	54.07		**
EF	2	141.89987	70.94993	2547.72		**
N*H	3	0.16709	0.05569	2.00		n.s.
N*V	6	0.37233	0.06205	2.23		n.s.
N*EF	6	2.32738	0.38789	13.93		**
V*H	2	0.09319	0.04659	1.67		n.s.
H*EF	2	1.33747	0.66873	24.01		**
V*EF	4	4.39406	1.09851	39.45		**
N*H*V	6	0.21075	0.03512	1.26		n.s.
N*V*EF	12	0.57047	0.04753	1.71		n.s.
V*H*EF	4	0.18343	0.04585	1.65		n.s.
N*V*H*EF	17	0.70016	0.04118	1.48		n.s.
ERROR	145	4.038016	0.02784			
TOTAL	215	175.64857				

\*\* SIGNIFICATIVO AL 1%

n.s. NO SIGNIFICATIVO

C.V. 11.4080

APENDICE XI. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCION DEL NUMERO TOTAL DE NODULOS EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM PHASEOLI - PHASEOLUS VULGARIS L.

F U E N T E	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F.C.	Ft	SIGNIF.
N	3	1025643.42	341881.14	584.20		**
H	1	487264.93	487264.93	832.63		**
V	2	1774715.77	887357.88	1516.30		**
EF	2	5137029.47	2568514.73	4389.02		**
N*H	3	110805.05	36935.01	63.11		**
N*V	6	212693.98	35448.99	60.57		**
N*EF	6	506643.86	84440.64	144.29		**
V*H	2	107280.98	53640.49	91.66		**
H*EF	2	258554.06	129277.03	220.91		**
V*EF	4	357999.69	89499.92	152.94		**
N*H*V	6	49738.43	8289.73	14.17		**
N*H*EF	12	76968.59	6414.04	10.96		**
V*H*EF	4	10141.13	2535.28	4.33		n.s.
N*V*H*EF	17	65426.24	3848.60	6.58		**
ERROR	145	84856.00	585.2137			
TOTAL	215	10265761.66				

\*\* SIGNIFICATIVO AL 1%

n.s. NO SIGNIFICATIVO

C.V. 13.1239

APENDICE XII. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA PRODUCCION DE PESO SECO DE NODULOS (g) EN EL EXPERIMENTO DEL EFECTO DE LA SEQUIA SOBRE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM PHASEOLI* - *PHASEOLUS VULGARIS* L.

F U E N T E	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F.C.	Ft	SIGNIF.
N	3	0.83895	0.27965	98.25		* *
H	1	0.72995	0.72995	256.47		* *
V	2	0.37918	0.18959	66.61		* *
EF	2	5.66511	2.83255	995.20		* *
N*H	3	0.21658	0.07219	25.36		* *
N*V	6	0.34850	0.05808	20.41		* *
N*EF	6	0.88949	0.14824	52.09		* *
V*H	2	0.00333	0.00166	0.59		n.s.
H*EF	2	1.01707	0.50857	178.67		* *
V*EF	4	0.48790	0.12197	42.86		* *
N*H*V	6	0.27660	0.0461	16.20		* *
N*V*EF	12	0.92246	0.07687	27.01		* *
V*H*EF	4	0.14671	0.03667	12.89		* *
N*V*H*EF	17	0.96489	0.05675	19.94		* *
ERROR	145	0.41270	0.00284			
TOTAL	215	13.29947				

\* \* SIGNIFICATIVO AL 1%

n.s. NO SIGNIFICATIVO

C.V. 33.9526



APENDICE XIII. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE FOLLAJE ( SIGNIFICANCIA = 0.01) .

INTERACCION

FUENTE DE N - VARIEDAD		
FUENTE DE N	VARIEDAD	X
CPMEX1	NEGRO 150G3	19.8461
CPMEX1 Str150	BAYO DURANGO	10.4166
CPMEX1 Str150	MICHOACAN 12A3	6.6933
CPMEX22	NEGRO 150G3	18.2050
CPMEX22 Spe200	BAYO DURANGO	9.6027
CPMEX22 Spe200	MICHOACAN 12A3	5.7258
N 0 kg/ha	NEGRO 150G3	15.6683
N 0 kg/ha	BAYO DURANGO	7.3623
N 0 kg/ha	MICHOACAN 12A3	4.7325
N 60 kg/ha	NEGRO 150G3	20.9294
N 60 kg/ha	BAYO DURANGO	16.9633
N 60 kg/ha	MICHOACAN 12A3	8.7116

INTERACCION

NIVEL DE HUMEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
NIVEL DE HUM.	EDO. FENOLOGICO	X
RIEGO	ESTADO VEGETATIVO	3.715
RIEGO	FLORACION	19.213
RIEGO	LLENADO DE VAINA	21.874
SEQUIA	ESTADO VEGETATIVO	2.528
SEQUIA	FLORACION	14.623
SEQUIA	LLENADO DE VAINA	18.982

INTERACCION

FUENTE DE N - ESTADO FENOLOGICO		
FUENTE DE N	EDO. FENOLOGICO	X
CPMEX1	ESTADO VEGETATIVO	3.302
CPMEX1 Str150	FLORACION	16.877
CPMEX1 Str150	LLENADO DE VAINA	21.817
CPMEX22	ESTADO VEGETATIVO	2.718
CPMEX22 Spe200	FLORACION	16.683
CPMEX22 Spe200	LLENADO DE VAINA	18.334
N 0 kg/ha	ESTADO VEGETATIVO	2.767
N 0 kg/ha	FLORACION	14.193
N 0 kg/ha	LLENADO DE VAINA	14.986
N 60 kg/ha	ESTADO VEGETATIVO	3.884
N 60 kg/ha	FLORACION	19.918
N 60 kg/ha	LLENADO DE VAINA	26.575

INTERACCION

VARIEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
VARIEDAD	EDO. FENOLOGICO	X
NEGRO 150G3	ESTADO VEGETATIVO	4.179
NEGRO 150G3	FLORACION	26.184
NEGRO 150G3	LLENADO DE VAINA	25.623
BAYO DURANGO	ESTADO VEGETATIVO	3.176
BAYO DURANGO	FLORACION	13.648
BAYO DURANGO	LLENADO DE VAINA	15.233
MICHOACAN 12A3	ESTADO VEGETATIVO	2.009
MICHOACAN 12A3	FLORACION	10.922
MICHOACAN 12A3	LLENADO DE VAINA	*

\* NO SE DETERMINO.

APENDICE XIV. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE RAIZ (SIGNIFICANCIA = 0.01).

INTERACCION

FUENTE DE N - ESTADO FENOLOGICO		
FUENTE DE N	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
CPMEX1	ESTADO VEGETATIVO	0.4466
Str150	FLORACION	1.7461
CPMEX1	LLENADO DE VAINA	2.4205
Str150	ESTADO VEGETATIVO	0.3938
CPMEX22	FLORACION	1.6800
Spe200	LLENADO DE VAINA	2.4555
CPMEX22	ESTADO VEGETATIVO	0.3542
Spe200	FLORACION	1.1127
N 0 kg/ha	LLENADO DE VAINA	2.0488
N 0 kg/ha	ESTADO VEGETATIVO	0.4446
N 60 kg/ha	FLORACION	1.7700
N 60 kg/ha	LLENADO DE VAINA	2.6955

INTERACCION

NIVEL DE HUMEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
NIVEL DE HUM.	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
RIEGO	ESTADO VEGETATIVO	0.4552
RIEGO	FLORACION	1.8144
RIEGO	LLENADO DE VAINA	2.6158
SEQUIA	ESTADO VEGETATIVO	0.3569
SEQUIA	FLORACION	1.3400
SEQUIA	LLENADO DE VAINA	2.1944

INTERACCION

VARIEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
VARIEDAD	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
NEGRO 150G3	ESTADO VEGETATIVO	0.3933
NEGRO 150G3	FLORACION	1.6859
NEGRO 150G3	LLENADO DE VAINA	2.8037
BAYO DURANGO	ESTADO VEGETATIVO	0.4404
BAYO DURANGO	FLORACION	1.4616
BAYO DURANGO	LLENADO DE VAINA	2.3544
MICHOACAN 12A3	ESTADO VEGETATIVO	0.3845
MICHOACAN 12A3	FLORACION	1.5845
MICHOACAN 12A3	LLENADO DE VAINA	2.0575

APENDICE XV. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DEL NUMERO TOTAL DE NODULOS (SIGNIFICANCIA = 0.01).

INTERACCION

FUENTE DE N - NIVEL DE HUMEDAD		
FUENTE DE N	NIVEL DE HUMEDAD	$\bar{x}$
CPMEX1 <sub>Str150</sub>	RIEGO	323.851
CPMEX1 <sub>Str150</sub>	SEQUIA	175.407
CPMEX22 <sub>Spe200</sub>	RIEGO	317.259
CPMEX22 <sub>Spe200</sub>	SEQUIA	190.333
N 0 kg/ha	RIEGO	159.666
N 0 kg/ha	SEQUIA	109.962
N 60 kg/ha	RIEGO	124.750
N 60 kg/ha	SEQUIA	69.518

INTERACCION

FUENTE DE N - ESTADO FENOLOGICO		
FUENTE DE N	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
CPMEX1 <sub>Str150</sub>	EDO. VEGETATIVO	119.61
CPMEX1 <sub>Str150</sub>	FLORACION	527.16
CPMEX1 <sub>Str150</sub>	LLENADO DE VAINA	102.11
CPMEX22 <sub>Spe200</sub>	EDO. VEGETATIVO	101.66
CPMEX22 <sub>Spe200</sub>	FLORACION	540.66
CPMEX22 <sub>Spe200</sub>	LLENADO DE VAINA	119.05
N 0 kg/ha	EDO. VEGETATIVO	45.33
N 0 kg/ha	FLORACION	325.38
N 0 kg/ha	LLENADO DE VAINA	52.77
N 60 kg/ha	EDO. VEGETATIVO	21.93
N 60 kg/ha	FLORACION	213.66
N 60 kg/ha	LLENADO DE VAINA	38.66

INTERACCION

NIVEL DE HUMEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
NIVEL DE HUM.	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
RIEGO	EDO. VEGETATIVO	98.305
RIEGO	FLORACION	498.388
RIEGO	LLENADO DE VAINA	100.361
SEQUIA	EDO. VEGETATIVO	47.916
SEQUIA	FLORACION	305.055
SEQUIA	LLENADO DE VAINA	55.949

APENDICE XV. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DEL NUMERO TOTAL DE NODULOS (SIGNIFICANCIA = 0.01).

(CONTINUACION)

INTERACCION

FUENTE DE N - VARIEDAD			
FUENTE DE N	VARIEDAD	$\bar{x}$	
CPMEX1	Str150	NEGRO 150G3	408.50
CPMEX1	Str150	BAYO DURANGO	177.88
CPMEX1	Str150	MICHOACAN 12A3	162.50
CPMEX22	Spe200	NEGRO 150	431.00
CPMEX22	Spe200	BAYO DURANGO	173.44
CPMEX22	Spe200	MICHOACAN 12A3	156.94
N	0 kg/ha	NEGRO 150G3	256.44
N	0 kg/ha	BAYO DURANGO	85.14
N	0 kg/ha	MICHOACAN 12A3	75.27
N	60 kg/ha	NEGRO 150G3	150.22
N	60 kg/ha	BAYO DURANGO	86.80
N	60 kg/ha	MICHOACAN 12A3	48.05

INTERACCION

VARIEDAD - NIVEL DE HUMEDAD		
VARIEDAD	NIVEL DE HUM.	$\bar{x}$
NEGRO 150G3	RIEGO	390.916
NEGRO 150G3	SEQUIA	232.166
BAYO DURANGO	RIEGO	165.305
BAYO DURANGO	SEQUIA	96.194
MICHOACAN 12A3	RIEGO	140.833
MICHOACAN 12A3	SEQUIA	80.555

INTERACCION

VARIEDAD - ESTADO FENOLOGICO		
VARIEDAD	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
NEGRO 150G3	EDO. VEGETATIVO	121.50
NEGRO 150G3	FLORACION	578.66
NEGRO 150G3	LLENADO DE VAINA	234.45
BAYO DURANGO	EDO. VEGETATIVO	53.41
BAYO DURANGO	FLORACION	338.83
BAYO DURANGO	LLENADO DE VAINA	0.0
MICHOACAN 12A3	EDO. VEGETATIVO	44.31
MICHOACAN 12A3	FLORACION	287.66
MICHOACAN 12A3	LLENADO DE VAINA	0.0

APENDICE XVI. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE NODULOS (SIGNIFICANCIA = 0.01).

INTERACCION

FUENTE DE N - NIVEL DE HUMEDAD		
FUENTE DE N	NIVEL DE HUMEDAD	$\bar{x}$
CPMEX1	Str150 RIEGO	0.2267
CPMEX1	Str150 SEQUIA	0.1225
CPMEX22	Spe200 RIEGO	0.3559
CPMEX22	Spe200 SEQUIA	0.1405
N 0	kg/ha RIEGO	0.1659
N 0	kg/ha SEQUIA	0.0778
N 60	kg/ha RIEGO	0.1083
N 60	kg/ha SEQUIA	0.3526

INTERACCION

FUENTE DE N - ESTADO FENOLOGICO		
FUENTE DE N	ESTADO FENOLOGICO	$\bar{x}$
CPMEX1	Str150 EDO. VEGETATIVO	0.0307
CPMEX1	Str150 FLORACION	0.4178
CPMEX1	Str150 LLENADO DE VAINA	0.0754
CPMEX22	Spe200 EDO. VEGETATIVO	0.0232
CPMEX22	Spe200 FLORACION	0.6085
CPMEX22	Spe200 LLENADO DE VAINA	0.1130
N 0	kg/ha EDO. VEGETATIVO	0.0174
N 0	kg/ha FLORACION	0.3194
N 0	kg/ha LLENADO DE VAINA	0.0535
N 60	kg/ha EDO. VEGETATIVO	0.0043
N 60	kg/ha FLORACION	0.1886
N 60	kg/ha LLENADO DE VAINA	0.0311

INTERACCION

VARIEDAD - ESTADO FENOLOGICO		
VARIEDAD	EDO. FENOLOGICO	$\bar{x}$
NEGRO 150G3	EDO. VEGETATIVO	0.0235
NEGRO 150G3	FLORACION	0.4051
NEGRO 150G3	LLENADO DE VAINA	0.2048
BAYO DURANGO	EDO. VEGETATIVO	0.0190
BAYO DURANGO	FLORACION	0.4337
BAYO DURANGO	LLENADO DE VAINA	0.0
MICHOACAN 12A3	EDO. VEGETATIVO	0.0159
MICHOACAN 12A3	FLORACION	0.3919
MICHOACAN 12A3	LLENADO DE VAINA	0.0

APENDICE XVI. MEDIAS DE LAS INTERACCIONES EN LA PRODUCCION DE PESO SECO DE NODULOS (SIGNIFICANCIA = 0.01)

(CONTINUACION)

INTERACCION

FUENTE DE N - VARIEDAD		
FUENTE DE N	NIVEL DE HUMEDAD	X
CPMEX1 <sub>Str</sub> 150	NEGRO 150G3	0.3110
CPMEX1 <sub>Str</sub> 150	BAYO DURANGO	0.1378
CPMEX1 <sub>Str</sub> 150	MICHOACAN 12A3	0.0750
CPMEX22 <sub>Spe</sub> 200	NEGRO 150G3	0.2714
CPMEX22 <sub>Spe</sub> 200	BAYO DURANGO	0.2097
CPMEX22 <sub>Spe</sub> 200	MICHOACAN 12A3	0.2635
N 0 kg/ha	NEGRO 150G3	0.1675
N 0 kg/ha	BAYO DURANGO	0.1383
N 0 kg/ha	MICHOACAN 12A3	0.0644
N 60 kg/ha	NEGRO 150G3	0.0946
N 60 kg/ha	BAYO DURANGO	0.1336
N 60 kg/ha	MICHOACAN 12A3	0.0342

INTERACCION

NIVEL DE HUMEDAD-ESTADO FENOLOGICO		
NIVEL DE HUM.	EDO. FENOLOGICO	X
RIEGO	EDO. VEGETATIVO	0.0228
RIEGO	FLORACION	0.5385
RIEGO	LLENADO DE VAINA	0.0861
SEQUIA	EDO. VEGETATIVO	0.0161
SEQUIA	FLORACION	0.2286
SEQUIA	LLENADO DE VAINA	0.6504

APENDICE XVII. MEDIAS DE LA INTERACCION: VARIEDAD X FUENTE DE NITROGENO X ESTADO FENOLOGICO X NIVEL DE HUMEDAD, EN LA SOBREVIVENCIA DE RIZOBIAS POR GRAMO DE SUELO DEL RIZOPLANO (SIGNIFICANCIA = 0.01).

VARIEDAD	FUENTE DE N (CEPA)	ESTADO FENOLOGICO	LOG DEL NUMERO BACTS/G DE SUELO X	
NEGRO 150G3	CPMEX1	ESTADO VEGETATIVO	5.08	
	CPMEX1 Str150	FLORACION	6.14	
	CPMEX1 Str150	LLENADO DE VAINA	6.27	
	CPMEX1 Str150	ESTADO VEGETATIVO	4.36	
	CPMEX1 Str150	FLORACION	3.93	
	CPMEX1 Str150	LLENADO DE VAINA	3.34	
	CPMEX22 Spe200	ESTADO VEGETATIVO	5.30	
	CPMEX22 Spe200	FLORACION	6.12	
	CPMEX22 Spe200	LLENADO DE VAINA	6.27	
	CPMEX22 Spe200	ESTADO VEGETATIVO	5.13	
	CPMEX22 Spe200	FLORACION	4.04	
	CPMEX22 Spe200	LLENADO DE VAINA	3.01	
	BAYO DURANGO	CPMEX1	ESTADO VEGETATIVO	4.20
		CPMEX1 Str150	FLORACION	6.04
CPMEX1 Str150		LLENADO DE VAINA	6.29	
CPMEX1 Str150		ESTADO VEGETATIVO	3.70	
CPMEX1 Str150		FLORACION	3.61	
CPMEX1 Str150		LLENADO DE VAINA	3.46	
CPMEX22 Spe200		ESTADO VEGETATIVO	5.00	
CPMEX22 Spe200		FLORACION	6.27	
CPMEX22 Spe200		LLENADO DE VAINA	6.32	
CPMEX22 Spe200		ESTADO VEGETATIVO	4.50	
CPMEX22 Spe200		FLORACION	4.34	
CPMEX22 Spe200		LLENADO DE VAINA	3.06	
MICHUACAN 12A3		CPMEX1	ESTADO VEGETATIVO	5.75
		CPMEX1 Str150	FLORACION	6.02
	CPMEX1 Str150	LLENADO DE VAINA	6.28	
	CPMEX1 Str150	ESTADO VEGETATIVO	3.41	
	CPMEX1 Str150	FLORACION	3.85	
	CPMEX1 Str150	LLENADO DE VAINA	2.81	
	CPMEX22 Spe200	ESTADO VEGETATIVO	5.26	
	CPMEX22 Spe200	FLORACION	6.06	
	CPMEX22 Spe200	LLENADO DE VAINA	6.14	
	CPMEX22 Spe200	ESTADO VEGETATIVO	3.78	
	CPMEX22 Spe200	FLORACION	3.94	
	CPMEX22 Spe200	LLENADO DE VAINA	3.07	