

20/1/66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**SELECCION DE CEPAS DE Rhizobium phaseoli
y Rhizobium meliloti, AISLADAS DE ALGUNOS
SUELOS DEL MUNICIPIO DE LAGOS DE
MORENO, ESTADO DE JALISCO.**

TESIS **MANCOMUNADA**
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N
MARIA PATRICIA HUERTA RUIZ
JOSE ANTONIO DE ALBA MURGUIA



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.

Contenido.

CAPITULO

1. RESUMEN.
2. INTRODUCCION.
3. ANTECEDENTES.
 - 3.1 Importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno.
 - 3.2 Importancia de las leguminosas en México.
 - A). El frijol en México.
 - B). La alfalfa en México.
 - 3.3 Aspectos generales e importancia de la inoculación.
 - A). Ecología del Rhizobium spp.
 - B). Determinación de la infectividad o habilidad competitiva.
 - C). Determinación de la efectividad.
 - 3.4 Factores que afectan la Fijación Biológica de Nitrógeno.
 - 3.5 Descripción y zonificación del área de estudio.
4. MATERIAL Y METODOS.
 - 4.1 Muestreo
 - 4.2 Fotointerpretación.
 - 4.3 Propiedades Físicas y Químicas de los suelos.
 - 4.4 Determinación del N.M.P. de rizobios.
 - 4.5 Aislamiento de rizobios.
 - 4.6 Curvas de crecimiento.
 - 4.7 Evaluación de la efectividad e infectividad de las cepas nativas aisladas.

- 5. **RESULTADOS Y DISCUSION.**
- 5.1 **Fotointerpretación.**
 - A). Suelos de la localidad "La Cieneguilla".
 - B). Suelos de la localidad "La Calavera".
- 5.2 **Análisis Físicos y Químicos de los suelos.**
- 5.3 **Conteo del Número Más Probable de rizobios.**
- 5.4 **Cepas aisladas.**
- 5.5 **Curvas de crecimiento.**
- 5.6 **Análisis de los resultados relacionados con la efectividad e infectividad de las cepas.**
- 6. **CONCLUSIONES.**
- GLOSARIO.**
- APENDICE.**
- 7. **BIBLIOGRAFIA.**

1. Resumen.

De las dos localidades que constituyen el área de estudio, en la localidad de "La Cieneguilla" se reconocieron cuatro unidades edáficas; la primera constituida principalmente por Planosoles y Regosoles eútricos y algunos Feozems háplicos; la segunda y tercera unidades están formadas por suelos de origen aluvial no recientes (Cambisoles y Feozems); y la cuarta por suelos aluviales recientes en la cual dominan los Fluvisoles.

En estos suelos las texturas se clasifican entre media y moderadamente gruesa, lo que indica porosidad y drenaje adecuados, sin embargo, existen algunos riesgos de encostramiento y compactación debido a la cantidad de limos presentes y, además, por la baja actividad biológica que se ha reflejado en la pobreza de materia orgánica. Por su pH estos suelos varían de medianamente ácidos a muy ligeramente alcalinos. La capacidad de intercambio catiónico es moderada (11.73-17.95) lo cual se relaciona con arcillas del grupo del caolín y de las ilitas. Los cationes intercambiables están representados en un 80% por la suma de Ca^{++} y Mg^{++} y la relación $Ca^{++} + Mg^{++} / K^{+}$ muestra deficiencias importantes de Ca^{++} en la mayoría de los suelos. En algunos de estos suelos los niveles de Na^{+} intercambiable indican riesgo potencial de sodificación. Los valores de materia orgánica y nitrógeno total van de bajos a medios y, finalmente, por su contenido de fósforo los suelos de esta localidad son muy pobres.

Sobre los riesgos naturales e inducidos de estos suelos se encuentran: la erosión hídrica laminar y, ocasionalmente, en cárcavas, la compactación y la degradación física, como conse--

cuencia del sobrepastoreo, sobre todo en los suelos de lomeríos y en menor grado las inundaciones en épocas de lluvias.

La localidad de "La Calavera" presenta una asociación de Planosoles eútricos, Feozems háplicos y Litosoles, someros y muy degradados.

Las texturas de estos suelos se clasifican entre media y moderadamente gruesa. La relación limo-arcilla nos indica valores medios de intemperismo y alteración geoquímica de los minerales primarios. El pH varía de ligeramente ácido a muy ligeramente alcalino. La capacidad de intercambio varía de moderada a moderadamente baja, lo que corresponde a suelos que contienen minerales arcillosos haloisíticos. En los cationes intercambiables predominan el Ca^{++} y el Mg^{++} (80%) y la relación $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}/\text{K}^{+}$ muestra deficiencias importantes de Ca^{++} en la mayoría de los suelos. En estos suelos existen ligeros riesgos de sodificación, aunque aún no hay indicios detectables. Los contenidos de materia orgánica varían de mediano a medianamente ricos y los de nitrógeno total de medianamente pobre a mediano y, finalmente, por su contenido en fósforo los suelos de esta localidad son también muy pobres.

Los riesgos más importantes de estos suelos lo constituye la pérdida total o parcial del material edáfico, a causa de una erosión hídrica muy severa. Consecuentemente por las limitantes de los suelos de esta localidad no es recomendable su uso agrícola constituyéndose, además, en un riesgo la pendiente y el pastoreo.

En cada una de las localidades se determinó el número más probable de rizobios presentes/g. de suelo seco encontrándose que en la localidad de "La Cieneguilla" el número promedio de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti fué de 752,115 y de --

24,031, respectivamente. Mientras que en la localidad de "La Calavera" los conteos de estos mismos rizobios fueron de 5,052 y 20 respectivamente. Estos resultados son congruentes con la naturaleza y uso actual de los suelos de esas localidades.

Del aislamiento y selección de cepas nativas se encontró, con Rhizobium meliloti, que los niveles de infectividad o nodulación fluctuaron entre 6 y 19 nódulos/planta, no encontrándose diferencias importantes entre las cepas aisladas en ambas localidades. Con respecto a la efectividad, estimada con base a la capacidad de la reducción del acetileno, sí se encontraron diferencias significativas entre las cepas de estas dos localidades. Los niveles alcanzados se encuentran en una escala de 0.021 -- 2.205 μ moles de acetileno reducido/hora/planta; de estos valores los niveles más altos corresponden a las cepas aisladas en la localidad de "La Cieneguilla".

En lo referente a las cepas de Rhizobium phaseoli la infectividad, estimada como capacidad de nodulación varía de 47 a 235 nódulos/planta, no encontrándose, en general, diferencias significativas entre las cepas aisladas de estas dos localidades. En relación a la efectividad de Rhizobium phaseoli; los niveles detectados se encuentran en una escala que va de 0.007-1.459; haciéndose notar que, como en el caso de la infectividad no se aprecian diferencias muy claras entre las cepas de las dos localidades. Sin embargo, se hace notar que la cepa más efectiva seleccionada correspondió a una cepa de la localidad de "La Calavera".

2. Introducción.

La fijación biológica del nitrógeno constituye el proceso natural de fertilización nitrogenada más importante. Este fenómeno es característico de ciertas bacterias que poseen la enzima llamada nitrogenasa y que, por este hecho, son capaces de tomar el nitrógeno inerte de la atmósfera y transformarlo en una forma combinada, la cual es aprovechada para la síntesis de sus proteínas y ácidos nucleicos. Las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran en la mayoría de los suelos, algunas son de vida libre, sin embargo, las más importantes, desde el punto de vista agrícola, son aquellas que pertenecen al género Rhizobium, y que se caracterizan por establecer una asociación simbiótica con las leguminosas constituyéndose en la principal fuente natural de nitrógeno para estas plantas. De este modo, las leguminosas asociadas a estas bacterias pueden obtener incorporaciones de nitrógeno muy significativas, que les permiten crecer en suelos muy pobres en este elemento.

El desarrollo de los inoculantes en la agricultura, se ha convertido en un recurso natural, que se traduce en una disminución importante en el consumo de los fertilizantes químicos nitrogenados y, por tanto, en una reducción de los costos de las cosechas. Entre otros datos sobre la fijación de nitrógeno en esta asociación, se tienen cifras que oscilan de 270 kg. de nitrógeno/Ha/año, como resultado de la inoculación de alfalfa, y de 45 kg. de nitrógeno/Ha/año resultantes de la inoculación del frijol (Bat-sheva, 1982).

Una vez que la planta muere, el nitrógeno fijado en forma de compuestos nitrogenados, es liberado y mineralizado, aumen--

tando con ello la fertilidad de los suelos.

Cuando las cepas de rizobios presentes en los suelos son - muy escasas o muy abundantes pero poco efectivas, es decir, con poca capacidad para fijar el nitrógeno, el agricultor puede recurrir a la inoculación de las leguminosas, utilizando cepas de rizobios efectivas, con el fin de poder obtener el máximo beneficio de la asociación rizobio-leguminosa.

Para este propósito, es importante considerar que, para introducir un programa de inoculación en una área agrícola, es necesario determinar cuáles son las necesidades de inoculación, - las cuales están dadas, principalmente, por el número de rizobios nativos presentes en el suelo, y su nivel general de efectividad e infectividad, sin pasar por alto las características edáficas y otros factores ecológicos relacionados con los rizobios (Roughley, 1976).

En la presente tesis, el área de estudio se localiza en el municipio de Lagos de Moreno, Jalisco, en donde, al igual que - en otras zonas del Bajío se cultivan, a mediana y gran escala, - el frijol y la alfalfa siendo esta última de gran importancia - por localizarse el área en una cuenca lechera. Se escogieron - las localidades de "La Cieneguilla" y "La Calavera", por tener suelos que exhiben procesos de degradación física y química, -- tanto por causas naturales, como inducidas por el hombre, principalmente, por el mal manejo de los suelos en donde, además, - nunca se ha practicado la inoculación.

El propósito del siguiente trabajo es sentar las bases para aumentar el rendimiento en la producción de frijol y alfalfa, en dichas localidades, a través del uso de inoculantes de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti, específicos para frijol y - alfalfa, respectivamente, para lo cual se plantearon los si-- -

güentes objetivos:

- 1.- En vista de que las características físicas, químicas y biológicas de los suelos influyen directamente en el desarrollo de las leguminosas y, por lo tanto, en su asociación con los rizobios, el primer objetivo de este trabajo es la caracterización edafológica semidetallada del área de estudio.
- 2.- Conocer la población de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti presente en los suelos objeto de estudio, y
- 3.- Tomando en consideración que, para obtener el máximo beneficio de la fijación biológica del nitrógeno en las leguminosas, es necesario utilizar cepas de alto rendimiento, el tercero de los objetivos es llevar a cabo una selección de las cepas nativas en función tanto de su infectividad como de su efectividad.

3. Antecedentes.

3.1 IMPORTANCIA DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO.

Se estima que las dos terceras partes de la población mundial sufre problemas de alimentación. En México, al igual que en el resto de los países subdesarrollados, estos problemas se acentúan más debido principalmente al aumento de la tasa poblacional, a la crisis económica y energética, por la que se atraviesa, y a la falta de sistemas adecuados para el uso y manejo de los recursos agropecuarios, que permitan obtener el máximo de productividad en el campo con el mínimo de degradación ecológica (FAO-PNUMA, 1980). Esto hace suponer que de no encontrarse una solución rápida al problema, la situación alcanzará niveles catastróficos.

Según los informes de la FAO en 1974 (citados por Olivares et al, 1979), la única alternativa que por el momento puede contribuir a solucionar el problema alimentario, es lograr un incremento tanto del rendimiento agrícola por unidad de área, como en la calidad de los productos agrícolas. Indiscutiblemente, uno de los mejores recursos con el que cuentan los países subdesarrollados para lograr este objetivo, es la fijación biológica del nitrógeno, principalmente la que se da a nivel de la asociación Rhizobium-leguminosa. Este tipo de fijación tiene la ventaja de aumentar la producción a bajo costo, pudiéndose eliminar (en un futuro próximo) total o parcialmente la fertilización nitrogenada. Además, las leguminosas que se pueden utilizar, tanto en la alimentación humana como en la animal, presentan un elevado valor nutricional debido a su riqueza en proteínas de alta calidad y a sus contenidos de fósforo, potasio, cal

cio, hierro y vitaminas, principalmente A y D (valdés y Hubbell, 1973).

Para que las plantas puedan crecer satisfactoriamente necesitan consumir principalmente tres elementos: nitrógeno, fósforo y potasio, de los cuales el primero es el que se requiere en mayor proporción, ya que constituye el principal elemento para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En condiciones naturales, las plantas tienen como fuente de nitrógeno a los nitratos y sales de amonio, los cuales son obtenidos del suelo en donde se encuentran como un producto de la mineralización de la materia orgánica. Sin embargo, durante el ciclo del nitrógeno existen pérdidas de este elemento, las cuales se incrementan más en aquellas áreas dedicadas a la agricultura ya que, bajo estas condiciones, el reciclaje de la materia orgánica se interrumpe casi por completo, a causa de la cosecha integral de las plantas de cultivo, lo que se traduce en una disminución de la fertilidad natural del suelo por pérdida de materia orgánica y de nutrimentos (Brill W., 1981; Postgate J., 1981).

Contrariamente a lo que sucede en el suelo, en la atmósfera el nitrógeno es muy abundante, constituyendo casi el 80% de ella. Sin embargo, la estructura molecular diatómica de este elemento lo hace inerte y, por consiguiente, no aprovechable para los organismos superiores. Para que el nitrógeno atmosférico pueda ser asimilado por las plantas necesita ser fijado, es decir, transformado a una forma combinada ya sea con hidrógeno o con oxígeno, lo cual se puede lograr por medio de dos mecanismos diferentes: el químico y el biológico (Olivares et al, 1979; Brill W., 1981; Postgate J., 1981).

Al proceso químico de fijación de nitrógeno se le conoce con el nombre de Haber Bosh, y consiste en convertir al nitróge

no atmosférico en amoníaco bajo condiciones de alta temperatura y presión. Con este método se obtienen los fertilizantes químicos nitrogenados, gracias a los cuales se han alcanzado cuantiosos incrementos en la producción agrícola mundial, sobre todo en lo que respecta a plantas no leguminosas. Desgraciadamente, este proceso consume gran cantidad de energía proveniente de los combustibles fósiles lo que lo hace muy costoso e inaccesible para muchos países subdesarrollados (Olivares et al. 1979; Brill W., 1981; Postgate J., 1981).

Para explicar mejor esto, Olivares et al en 1979 dieron los siguientes ejemplos:

a). En 1972 la energía consumida en la industria de los fertilizantes equivalía, aproximadamente, a dos millones de barriles de petróleo por día.

b). Alrededor de 1.5 kg. de petróleo son necesarios para producir 1.0 kg. de fertilizante nitrogenado.

c). En el año agrícola 1978-1979, el costo energético de los fertilizantes en la producción de alimentos representó el 48% de los diferentes gastos que inciden en la producción agrícola.

A todo esto hay que sumar el hecho de que el uso desmedido de los fertilizantes químicos es peligroso (Olivares et al, 1979; Postgate J., 1981). En este sentido, la aplicación exhaustiva de fertilizantes químicos nitrogenados ocasiona graves problemas ecológicos derivados de la eutrofización de las aguas y el aumento de nitratos en el agua potable.

La fijación biológica del nitrógeno se encuentra limitada a unos cuantos géneros de bacterias, los cuales se caracterizan por presentar la enzima conocida con el nombre de nitrógenasa, por medio de la cual transforman al nitrógeno atmosférico en

amoníaco. Las bacterias fijadoras de nitrógeno más importantes, son aquéllas que pertenecen al género Rhizobium, y se encuentran en casi todos los suelos. Se caracterizan porque infectan las raíces de las plantas leguminosas, originando la formación de una especie de tumoración que se conoce con el nombre de nódulo de la raíz y que es donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno.

Lo realmente importante de esto, es que se establece una simbiosis entre la leguminosa y la bacteria fijadora de nitrógeno, ya que la bacteria recibe los carbohidratos formados durante la fotosíntesis de la planta y los utiliza para realizar sus funciones (entre las que está la fijación de nitrógeno), mientras que la planta toma para su propio uso los productos de la fijación, a partir de los cuales puede sintetizar sus componentes nitrogenados. (Brill W., 1981; Postgate J., 1981).

Por esta razón, las plantas noduladas son capaces de crecer saludablemente en suelos deficientes en sales nitrogenadas. Además una vez que la planta muere, son liberados los compuestos nitrogenados presentes en los nódulos, enriqueciendo de esta manera al suelo (Brill W., 1981; Valdés y Hubbell, 1973).

La fijación biológica del nitrógeno tiene una importancia mayor de lo que normalmente se cree, ya que de los 256 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico que se fijan por año, -- aproximadamente 175 millones corresponden al fijado biológicamente, unos 60 millones corresponden al proceso Haber-Bosh y -- otros 30 millones a procesos naturales no biológicos como descargas eléctricas, combustión, ozonización, etc. (Olivares et al, 1979).

Dicho de otra forma, según la FAO, la cantidad de nitrógeno extraído del suelo a través de todos los productos agrícolas,

oscila entre 100 y 110 toneladas por año, mientras que la producción mundial de fertilizantes es alrededor de solo 15 millones de toneladas por año, siendo el faltante cubierto por la fijación biológica (Valdés y Hubbell, 1973).

3.2 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN MEXICO.

La familia de las leguminosas es un grupo de plantas fanerógamas que se encuentran tanto en las regiones templadas, como en las tropicales. Se tienen desde plantas pequeñas pero muy difundidas, tales como el trébol, pasando por plantas como los altramucés, las retamas, hasta arbustos y árboles, como por ejemplo, las acacias y el tamarindo (Allen y Allen, 1981).

La característica principal de las leguminosas es que su fruto y semilla se presenta en vaina, que es conocida como legumbre (Allen y Allen, 1981).

La familia se ha dividido en tres subfamilias principales, las Papilionáceas, las Mimosáceas y las Cesalpínáceas, de las cuales las primeras son las más importantes desde el punto de vista agrícola, ya que dentro de esa subfamilia, se encuentran comprendidos: el frijol, el trébol, la alfalfa, el meliloto común, la soya, el cacahuete, el garbanzo, el chícharo, etc. Dichas plantas pueden utilizarse de tres modos principales:

a). El uso directo como alimento es el más conocido; en el que los frijoles, garbanzos, chícharos, etc., son incluidos en la dieta de la mayoría de la gente.

b). La transformación en productos cárnicos a través del pienso del ganado, constituye el segundo uso; en este caso, las leguminosas forrajeras como la alfalfa se utilizan de modo creciente como suplementos del alimento del ganado, tanto en forma

de planta como después de la conversión en forraje; y

c). Su uso como abono verde; en esta práctica, los tréboles, el meliloto, e incluso, la alfalfa, una vez desarrolladas, se cubren o incorporan al suelo para mejorar los terrenos agrícolas estériles o agotados (Duke, 1981).

Las leguminosas, como ya se dijo anteriormente, se caracterizan porque establecen una asociación simbiótica con las bacterias del género Rhizobium, esta asociación es específica en la mayoría de los casos, es decir, que una especie de Rhizobium - solo puede infectar a una determinada especie de leguminosa y no a las demás. Esto ha servido para clasificar a los rizobios, de este modo tenemos que Rhizobium meliloti es el que infecta a la alfalfa, de igual forma que Rhizobium phaseoli infecta únicamente al frijol.

A). El Frijol en México.

El frijol (Phaseolus spp.), es de gran importancia en México puesto que junto con el maíz, ha constituido la base de la dieta alimenticia del pueblo mexicano. El frijol se ha sembrado en México desde hace 4,000 años, e incluso, se cree que es nativo de la zona ubicada entre México y Guatemala (Infante y Pinchina, 1978). De las 126 especies del género Phaseolus que proceden del Continente Americano, 70 son originarias de México, de las cuales, sólo 4 se cultivan con el propósito de usarse en la alimentación humana, como son: P. vulgaris L., P. coccineus L., P. luratus L. y P. acutifolius Gray; de éstos el más conocido es el P. vulgaris L. o frijol común, el cual presenta una infinidad de variedades como lo son: la "Mantequilla", "Flor de Mayo", "Garbancillo", "Negro 150", "Canario 101 y 107" y "Jamaica", entre otras.

México es uno de los principales productores de frijol en

el mundo, sembrándose desde el nivel del mar hasta alturas de 2,500 m.s.n.m., cubriendo una superficie aproximada de dos millones de hectáreas con características ecológicas, económicas y sociales muy diferentes (David y Parsons, 1981). La importancia verdadera del frijol radica en que constituye una fuente alimenticia que contribuye a resolver los problemas nutricionales de la población de escasos recursos, debido a que esta leguminosa tiene un contenido de 340 calorías/100 g. y de 17.9 a 37.6% de proteínas en base seca (David y Parsons, 1981). La población mexicana, al igual que la mayoría de las poblaciones de otros países de ingresos bajos, presenta problemas nutricionales, los cuales se deben al consumo bajo de proteínas de origen animal, puesto que el precio de dicha proteína es muy elevado, lo que la hace inaccesible para mucha gente (Infante y Pinchina, 1978). Por el contrario, la proteína de origen vegetal es muy barata, razón por la cual el frijol se ha convertido en la fuente principal de consumo de proteínas para la gente de escasos recursos. Desgraciadamente, el frijol tiene, relativamente, una baja concentración de los aminoácidos triptofano y metionina, lo cual disminuye la calidad de sus proteínas. Sin embargo, esto puede ser superado ya sea, por medio de la selección de especies de frijol que contengan una mayor cantidad de dichos aminoácidos, por un aumento en el consumo de proteínas de frijol o, en el mejor de los casos, por medio de una dieta balanceada intercalando el consumo de frijol con el de otros alimentos que sean ricos en ellos (Infante y Pinchina, 1978).

El frijol se cultiva principalmente con el fin de cosechar semilla seca y, en menor proporción, para la producción de vaina fresca a partir de variedades de frijol ejotero. Además, sus hojas, tallo o planta completa, constituye un alimento exce

lente para el ganado como forraje verde o seco. Estas plantas pueden servir también para el mejoramiento del suelo como abono verde (David y Parsons, 1981).

El frijol se siembra en suelos que tengan un buen drenaje, ya que la mayoría de las enfermedades que atacan al frijol, se ven favorecidas por el exceso de humedad.

TABLA 3.1 PROYECCION DE SUPERFICIE, RENDIMIENTO Y PRODUCCION DE FRIJOL. 1973-1980.

Año	Superficie Miles/Ha	Rendimiento Kg/Ha	Producción Miles Toneladas
1973	1,610	559	900
1974	2,020	572	1,155
1975	1,794	610	1,095
1976	1,868	624	1,165
1977	1,943	636	1,236
1978	2,018	648	1,308
1979	2,093	659	1,379
1980	2,167	669	1,450

B). La Alfalfa en México.

La alfalfa (Medicago sativa), es el mejor de todos los forrajes cultivados en México, debido a su alto contenido de proteínas y minerales y por ser una buena fuente de vitamina A. - El heno de alfalfa contiene un promedio de 10.5% de proteína digerible comparado con el 2.1% del maíz. La alfalfa en floración contiene un promedio de 3.4% de proteína digerible, comparado con el 0.8% del zacate Guinea y el 1.0% del zacate Pará - (Buller, 1977).

Una tonelada de alfalfa contiene alrededor de 304 libras - de proteínas, mientras que una tonelada de pastos contiene solo 156 libras. Por lo tanto, la calidad y cantidad del ganado obtenidas a partir de una dieta en la que se incluyen leguminosas, es mucho mayor que cuando se alimenta el ganado solo con pastos (Valdés y Hubbell, 1973).

La concentración más grande de siembra de alfalfa se halla en las partes templadas y frías del centro del país, las cuales comprenden el Valle de México, el Valle de Toluca y el Bajío. - En las regiones cálidas del Norte y del Noreste de la República, se siembra una superficie considerable, con alfalfa, bajo sistemas de riego.

En la parte Sur de la zona del Pacífico, la región principal productora de alfalfa es el famoso Valle de Oaxaca. Prácticamente toda la producción se utiliza para la alimentación del ganado lechero, además, el creciente desarrollo de las explotaciones avícolas y porcinas han incrementado la demanda de alfalfa de buena calidad (Ramírez, 1974).

La alfalfa se puede utilizar en forma verde, o como heno o harina de alfalfa. En México, es muy común el alimentar el ganado con alfalfa verde, este es uno de los métodos más eficaces de utilizarla; además de contener un alto porcentaje de hojas, - la alfalfa verde presenta un máximo contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Ramírez, 1974; Juscafresa, 1980; Berlijn y Bernardon, 1982).

El almacenamiento de la alfalfa en forma de heno, es un -- buen método para guardar el forraje para el invierno que es --- cuando escasea.

La harina de alfalfa es muy solicitada para alimentar al - ganado y a las aves, ya que su contenido en proteína digerible

es muy alto (Juscáfresa, 1980; Berlijn y Bernardon, 1982).

La alfalfa es también, una de las principales plantas mejoradoras y protectoras del suelo, radicando su importancia en -- que:

a). Mejora grandemente la fertilidad del suelo, ya que es una de las leguminosas que fijan mayor cantidad de nitrógeno atmosférico (270 Kg. de nitrógeno/Ha/año).

b). Mejora la estructura del suelo, especialmente cuando se incorpora al suelo como materia verde. El abono verde aumenta la cantidad de materia orgánica, y por lo tanto, favorece -- una estructura mejor del suelo.

c). Sus raíces, las cuales son muy extensas y profundas, -- crean una estructura porosa en el suelo, que permite una mejor aireación e infiltración de agua.

d). Conserva y protege al suelo, puesto que da una cubierta vegetal muy densa que cubre perfectamente el suelo y lo protege de la erosión (Torres, 1981; Buller, 1979).

TABLA 3.2 VARIEDAD, EPOCA Y DENSIDAD DE SIEMBRA DE LA ALFALFA EN LAS ZONAS CENTRO, SUR, ALTOS Y NORTE DEL ESTADO DE JALISCO.

Variedad	Ciclo Vegetativo	Epoca de Siembra	Densidad de Siembra Kg/Ha
Moapa velluda	Perenne	1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Peruana	(3-7 años)	1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Tanhuato		1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Tanverde		1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Atoyac	Perenne	1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Caliverde	(3-7 años)	1º Nov. - 30 Dic.	25-30
Camino y San Joaquín	Perenne	1º Nov. - 30 Dic.	25-30

3.3 ASPECTOS GENERALES E IMPORTANCIA DE LA INOCULACION.

Las dos propiedades más importantes de las bacterias del género Rhizobium son: la "efectividad" o capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, y la "infectividad" o capacidad de combatir por los sitios de formación de nódulos en la raíz. Una buena cepa de Rhizobium debe ser tanto efectiva como infectiva.

Como ya se dijo anteriormente, los rizobios están presentes en muchos suelos con uso agrícola, sin embargo, en muchas ocasiones sucede que la población de las cepas nativas es escasa, o es muy abundante pero sus componentes son poco efectivos, por lo tanto, aunque infecten a las raíces de las plantas y se formen nódulos, éstos van a fijar muy poca cantidad de nitrógeno. En situaciones como estas, el agricultor puede recurrir a la inoculación de las leguminosas con el fin de poder obtener el máximo beneficio de la simbiosis Rhizobium- leguminosa (Date, 1976).

La inoculación de una semilla leguminosa, consiste en recubrir a ésta con una cepa de Rhizobium sp. de la cual se sabe que es muy efectiva e infectiva, con el fin de que dicha cepa sea la que infecte o nodule sus raíces. Para ello, es necesario la utilización de un acarreador o soporte de los microorganismos, como puede ser la turba, cuya función es mantener viva a la cepa hasta que germine la semilla. También se necesita de un adherente, por lo general la goma arábiga, para aglutinar al acarreador con el microorganismo sobre la semilla. Las bacterias utilizadas generalmente son cepas de colección provenientes de una institución científica o inoculantes adquiridos comercialmente (Date, 1977; Roughley, 1976; Valdés y Hubbell, 1973).

Según Valdés y Hubbell (1973), por medio de la inoculación

con una cepa de Rhizobium altamente efectiva se pueden lograr aumentos en la producción o el contenido de proteínas de las cosechas en un 20% más, sobre lo obtenido con la misma leguminosa asociada con cepas de Rhizobium nativas inefectivas.

Sucede muy frecuentemente que el agricultor, al inocular regularmente sus leguminosas, nunca se entere de cuál es el beneficio real que está obteniendo de ello; por ejemplo, no se entera de qué proporción de nódulos efectivos fueron formados por la cepa inóculo y qué proporción por las cepas nativas, o si escogió bien a la cepa inóculo, etc. Por esta razón, es importante que, en aquellas áreas agrícolas en las cuales se quiere introducir un programa de inoculación, antes que nada, se establezcan cuáles son las "necesidades de inoculación", en donde este término abarca, desde si realmente se requiere de la inoculación hasta qué aspectos merecen especial consideración al escoger la cepa inóculo y qué beneficio puede ser obtenido de ella (Obaton, 1975; Date, 1976, 1977; Roughley, 1976).

Según Obaton (1977), Date (1975 y 1976) y Roughley (1976), esta necesidad de inoculación está dada, principalmente, por la cantidad de cepas nativas presentes en el suelo y su nivel general de efectividad e infectividad, así como de los demás factores ecológicos relacionados con el rizobio.

Dicho de otra manera, es necesario tener un buen entendimiento de la ecología del rizobio para conocer los beneficios que pueden ser obtenidos de él (Obaton, 1977; Date, 1976). Con base a esto, Obaton (1977) propuso el siguiente plan general para la determinación de las necesidades de inoculación:

- 1.- Conteo del número de rizobios específicos que se encuentran en el suelo. Este conteo se puede realizar en diferentes estaciones del año para ver si se presentan cambios en la población según la estación.

2.- Aislamiento de cepas nativas.

3.- Pruebas a nivel de invernadero para ver la infectividad y efectividad de las cepas nativas, en comparación con cepas de colección.

4.- Pruebas de campo con las cepas más efectivas, incluyendo un control sin inocular, y el uso de cepas marcadas para determinar el porcentaje de nódulos formados por la cepa inóculo.

Aunque Obaton no lo menciona, también la determinación de la infectividad de las cepas nativas es muy importante, y debe ser una característica para seleccionar a la cepa inóculo.

Se han realizado varios estudios de inoculación en aquellos lugares en los cuales la población de rizobios nativos es inefectiva; como ejemplo, están los de Ireland y Vincent (1968) cuyos resultados sugieren que, en presencia de una población abundante de cepas infectivas en el suelo, el número de rizobios inoculados por gramo de semilla, debería exceder al número de rizobios inefectivos por gramo de suelo, para obtener una nodulación efectiva del 90 al 100% de las plantas. El incremento en el número de rizobios efectivos sobre la semilla, tiene casi el doble de influencia que un incremento en el número de cepas inefectivas en el suelo.

De igual manera, Roughley (1976), estableció que donde existe un gran número de rizobios inefectivos y las condiciones son adversas para la supervivencia de los rizobios del inoculante, se requiere de un exceso de 10^6 rizobios por semilla. De esta manera, para que un inóculo de alfalfa domine a las cepas nativas, se tienen que introducir de 10^7 a 10^9 rizobios por semilla (Obaton, 1977).

Existen ocasiones en las cuales las cepas nativas son muy efectivas y no hay necesidad de inoculación (Ayanaba, 1977; Datta, 1977). Este es el caso de algunas áreas de la India, en --

donde muchas leguminosas, tales como la cowpea (Vigna unguicula ta), garbanzo verde y negro (V. radiata y V. mungo), y garbanzo rojo (Cajanus cajan) han sido cultivadas por muchos años y, aun que la inoculación de la semilla no se practique, son bien noduladas por cepas nativas con una gran efectividad para fijar nitrógeno (Date, 1977).

Se ha observado que, en algunas ocasiones, cuando una leguminosa es sembrada regularmente en un área en la cual existe -- una población de rizobios nativos, formada tanto por cepas ineffectivas como efectivas, se presenta con el tiempo un incremento en la proporción de cepas nativas efectivas para la fijación del nitrógeno, las cuales ante la presencia de la planta hospedera se multiplican hasta niveles altos y son capaces de competir fuertemente por la formación de nódulos con la cepa inóculo. En estas circunstancias, el crecimiento y la nodulación efectiva de los controles no inoculados, mejora con el tiempo hasta que las plantas tienen tan alto rendimiento como las del tratamiento inoculado (Date, 1977).

Se han dado varios casos en los cuales la inoculación no -- ha tenido éxito por ejemplo, según Obaton (1977), con las cepas que son usadas comunmente en las regiones templadas no ha sido posible dominar a las cepas nativas del suelo, cuando estas son moderadamente efectivas, y para las leguminosas de zonas templadas, con una alta especificidad con el rizobio, muchas de las -- cepas aisladas del suelo son muy efectivas. Por ejemplo, en -- Francia, las cepas de Rhizobium meliloti aisladas del suelo son siempre moderada o altamente efectivas.

Sagardoy y Laborde (1977), en estudios de inoculación de -- alfalfa en suelos argentinos en los cuales nunca se había sem-- brado esta leguminosa, con una población baja de rizobios ine--

fectivos y efectivos, utilizando dosis de inoculantes diez veces mayores a las aconsejadas, encontraron que la cantidad y la calidad del forraje obtenido por la inoculación en kilogramo de materia seca por hectárea y en porcentaje de proteína bruta, no presentó diferencias significativas cuando se le comparó con el testigo sin inocular.

Barnes et al (1979), no lograron aumentar la producción de alfalfa por medio de la inoculación, al trabajar tanto con suelos de Minnesota, en los cuales se sembraba normalmente la alfalfa como en los que nunca se había sembrado. Ambos suelos -- presentaron cepas nativas moderadamente efectivas o efectivas, considerando que las cepas efectivas llegaron a los suelos donde nunca se había sembrado la leguminosa, arrastradas por el -- viento de sitios adyacentes donde sí se siembra esta planta. -- Estos autores sugieren que quizás solo se logre una inoculación exitosa, si la cepa inóculo es superior en infectividad y efectividad a las cepas nativas. Resultados similares fueron obtenidos por Mc Clellan (1975).

Pueden ser varias las causas por las cuales no se obtenga éxito en la inoculación, como son: que el inóculo no esté viable, o bien, que no se use la cepa adecuada, etc.

Muchos agricultores confían en el éxito de la inoculación por considerar que la cepa inóculo, presumiblemente, tiene la ventaja de estar más unida a la semilla y a la raíz de la planta germinada, que los rizobios nativos, los cuales están más lejanamente distribuidos, y que el número de rizobios del inóculo por gramo de suelo puede ser mayor que el de los rizobios nativos (Danso, 1977). Sin embargo, no consideran que es necesario que la cepa introducida se adapte al tipo de suelo, temperatura y pH del suelo, y que sobreviva hasta que las plantas crezcan y

sus raíces establezcan un microambiente favorable para que la bacteria infecte a la raíz (Obaton, 1975; Ayanaba, 1975).

Sucede que muchas veces el inóculo que se utiliza es preparado en otra ciudad, país o incluso hasta continente distinto al lugar donde se va a aplicar la inoculación; por esta razón, en la selección de la cepa inóculo, no se toman en cuenta las condiciones locales, lo que se traduce en que muchas veces la cepa no se adapta, o bien, tarda mucho tiempo en adaptarse al tipo de suelo donde es inoculada (Roughley, 1976). Si a esto sumamos que las cepas nativas generalmente son muy infectivas, no podemos explicar porqué muchas veces falla la inoculación.

Para evitar esto, muchos investigadores prefieren seleccionar las cepas nativas más efectivas del suelo o área donde se va a sembrar la leguminosa, para utilizarlas como inóculo. En vista de que, en muchas ocasiones, estas cepas son más efectivas que las de colección (Raban, 1973; citado por Sagardoy y La borde, 1977).

A). Ecología del Rhizobium spp.

La ecología del Rhizobium spp en su habitat suelo, ha sido pobremente caracterizada, debido principalmente a la escasez de métodos para lograrlo. Si uno quiere realmente ahondar dentro de las relaciones de estos organismos en el suelo, las técnicas deben ser accesibles para evaluar directamente qué son estas relaciones (Alexander, 1977).

Existen métodos diversos usados para medir la población de rizobios en el suelo; sin embargo, es importante hacer notar -- que a pesar de la metodología existente, la población bacteriana no puede determinarse con precisión en el suelo, por lo que solamente se efectúan estimaciones, no mediciones (Burges y Raw, 1971).

Entre estos métodos se encuentra, en primer lugar, la técnica de diluciones seriadas de suelo (Wilson, 1926; citado por Vincent, 1975), en la cual se realizan diluciones seriadas de una suspensión de suelo con las cuales, posteriormente, se inoculara la leguminosa hospedera (la cual crece en macetas o jarras que contienen suelo esterilizado o algún soporte artificial y la solución de nutrimentos). Después de ésto se observa la presencia o ausencia de nódulos en las plantas. Las tablas estadísticas apropiadas, dan una estimación del N.M.P. (Número Más Probable) de los rizobios presentes. Este método es tedioso, consume tiempo, y a la vez no es totalmente digno de confianza, puesto que las altas diluciones quizá den un desarrollo de nódulos mientras que las bajas diluciones no.

La técnica de inmunofluorescencia, desarrollada por Schmidt (1974), ayuda a contar en un filtrado de suelo las cepas de cada serogrupo. Esta técnica es más rápida y más precisa que la técnica de las diluciones seriadas. Es la única técnica que permite un estudio del equilibrio entre cepas de diferentes serogrupos. Desafortunadamente este método es incapaz de distinguir entre células de rizobios vivas y células recientemente muertas; otra limitación es el costo, debido a los instrumentos que se requieren y al adiestramiento especial necesario (Danso, 1977).

Una variedad de medios selectivos han sido propuestos para el conteo de los rizobios nativos del suelo. Estos medios contienen tinturas u otros agentes bacteriostáticos que, presumiblemente, solo permiten que los microorganismos formadores de nódulos proliferen. Sin embargo, hasta la fecha, no ha sido formulado un medio totalmente selectivo, al menos, para bajas densidades de rizobios (Alexander, 1977).

Una técnica que muestra ser particularmente útil para el estudio de poblaciones individuales de rizobios adicionados a suelos fué introducida por Obaton (1971) y, posteriormente, extendida por Danso et al (1973). En esta técnica la cepa del rizobio que nos interesa, es resistente a altas concentraciones del antibiótico estreptomycin. La bacteria, resistente al antibiótico, es introducida en el suelo y, posteriormente, se realizan los conteos de la población en placa a intervalos regulares y sobre un medio que contiene el antibiótico antibacterial al cual la cepa del rizobio es resistente y un antibiótico antifúngico (actidione). Tal medio previene el crecimiento de los hongos y de la mayoría de las otras bacterias, de tal manera -- que los cambios en la densidad de población del organismo introducido pueden ser facilmente determinados.

Este método depende de la utilización de mutantes; a este respecto, Danso y Alexander (1974), encontraron que se necesita que la mutación no afecte la habilidad de supervivencia de la célula madre. Es difícil detectar poblaciones bajas de rizobios por este método, puesto que el medio no inhibe completamente a todos los organismos no deseables.

Se han hecho muchas determinaciones de la población de rizobios en el suelo (sobre todo del que ha sido deliberadamente inoculado), casi todos estos estudios fueron realizados por el método de diluciones seriadas del suelo. Resumir estos estudios es muy difícil ya que, hasta el momento, no se ha podido hacer una generalización de los resultados obtenidos de ellos. Por ejemplo, conteos de Rhizobium leguminosarum han sido observados en una escala de menos de 10^1 a más de 10^5 por gramo de suelo en Nueva York, mientras que el número de Rhizobium trifolii varió de 2,500 a 10^6 por gramo de suelo. Algunas veces unas

especies parecen ser más abundantes que otras en estos estudios. Por otro lado, se ha observado que la densidad de población de rizobios es comunmente baja en suelos ácidos (Wilson, 1926; citado por Alexander, 1977). También se han observado fluctuaciones en la población de acuerdo a la estación o temporada del año (Wilson, 1930; citado por Alexander, 1977).

Frecuentemente la población de rizobios es más grande en suelos que soportan una rotación conteniendo la leguminosa para la cual el rizobio es su simbiote, que en aquellos en los cuales no está presente la leguminosa; de este modo se ha observado un mayor número de células de Rhizobium meliloti en un suelo en el que creció recientemente alfalfa, que en un terreno en el cual la alfalfa estuvo ausente en los años previos (Barber, -- 1982). Tuzimura y Watanabe (1959) observaron que Rhizobium japonicum fué abundante en suelos en los que se había sembrado soya el año anterior, sin embargo, la población declinó al siguiente año, aunque ésta fué todavía significativamente más alta que en sitios adyacentes donde no se había sembrado soya desde hacía 20 años. De este modo se ha observado que algunas leguminosas al sembrarse incrementan el número de sus rizobios específicos y que la bacteria no persiste en el suelo en la ausencia de la planta hospedera pues su número declina razonablemente en forma rápida. Inversamente, estudios realizados con cepas de Rhizobium phaseoli, demostraron que éstas eran muy resistentes, por lo cual, su población se mantiene alta durante mucho tiempo después de haber sido inoculadas (Robert y Schmidt, -- 1983). Por otra parte otros estudios indican que no es necesario que alguna vez se hayan sembrado las leguminosas para que el suelo contenga cepas de rizobios. Sagardoy y Laborde (1977) contaron la población de rizobios nativos presentes en los sue-

los del Valle Bonaerense del río Colorado (Argentina), los cuales nunca se habían cultivado, encontrando que ésta fué de 500 a 18.000 microorganismos por gramo de suelo seco, en el caso de Rhizobium leguminosarum, y de 417 a 15.000 microorganismos por gramo de suelo seco para Rhizobium meliloti.

Los numerosos estudios poblacionales no han provisto explicaciones de por qué algunas especies son abundantes en el suelo, mientras otras son raras o están ausentes. Del mismo modo, ellos nos ayudan a explicar por qué algunas poblaciones de rizobios persisten, mientras que los miembros de otras especies no mantienen poblaciones altas en el suelo. Además, se ve claramente que existe un efecto del tipo de suelo sobre el número de organismos, pero los datos disponibles no explican esto, de ahí que, a pesar de la existencia de una amplia información sobre la densidad de rizobios en las zonas templadas, hasta ahora no se han podido hacer generalizaciones.

Se ha visto que existen ciertos factores ambientales y biológicos que tienen efecto sobre la supervivencia de rizobios en el suelo (Alexander, 1977; Danso, 1977). Entre los factores ambientales se encuentran la acidez, altas temperaturas del suelo y, en menor grado, la resecaedad. La acidez del suelo afecta tanto el crecimiento de la planta como el número, multiplicación y supervivencia de los rizobios (Bryan, 1923; Danso, 1975). El aplicar cal a los suelos ácidos, mejora fuertemente la supervivencia de los rizobios (Jones, 1966). El desarrollo bajo de nódulos en plantas inoculadas en suelos ácidos, no tratados con cal, ha sido atribuido al efecto nocivo de la acidez sobre la supervivencia de los rizobios (Danso, 1977).

Por lo que a temperatura se refiere, Danso y Alexander (1974), encontraron que los rizobios sobreviven mejor a las ba-

jas temperaturas, que a las altas. Descubrimientos similares - fueron hechos por Bowen y Kennedy (1959) y Van Schreven (1970). Marshall et al (1963) atribuyeron el fracaso de la nodulación - de tréboles en el Occidente Australiano, a las altas temperatu- ras del suelo, sin embargo, se ha observado que con ciertas arc- illas se protege a los rizobios de la influencia nociva del ca- lor. Danso (1972; citado por Danso, 1977) demostró que el in- cremento en la escala de mortandad para Rhizobium meliloti M₃V₂ -5, debido a la elevación de la temperatura, fué más grande en los suelos arenosos que en los arcillosos; esto apoya las ideas de que los coloides protegen a los rizobios de los efectos de - las altas temperaturas del suelo.

La aridez o sequedad es otro factor que afecta la supervi- vencia del rizobio, aunque de las determinaciones hechas por -- Foulds (1971) acerca de los cambios en la densidad de población de los rizobios nativos resulta evidente que ciertas especies o al menos ciertas cepas, persisten por períodos razonables bajo condiciones de sequedad e incluso, hay datos de que algunas ce- pas permanecen viables por muchos años en suelos áridos. Danso et al (1973) han demostrado que números altos de rizobios per- sistieron en suelos sujetos a desecación.

No hay evidencias que demuestren que la supervivencia de - los rizobios se vea afectada por la carencia de nutrimentos. - En este sentido, cuando Danso y Alexander (1974) incorporaron - al suelo varias fuentes de carbono orgánico y nitrógeno, la su- pervivencia de los rizobios no fué afectada, lo cual sugirió -- que la población de estos organismos no es restringida por la - escasez o competencia por los nutrimentos. Bajo condiciones ex- perimentales se ha podido observar que muchas bacterias formad^o ras de nódulos sobrevivieron en una solución nutritiva libre de

carbono (Chen y Alexander, 1971; Danso y Alexander, 1974); lo cual sugiere que la carencia de nutrimentos no causa una rápida muerte de las bacterias formadoras de nódulos en el suelo.

No obstante, las bacterias formadoras de nódulos persisten mejor en suelos estériles (Danso y Alexander, 1974; Danso, 1977). Esto sugiere que en el descenso del número de rizobios en el suelo, están implicados agentes biológicos tales como la presencia de toxinas producidas por microorganismos, agentes inhibidores, bacteriófagos y Protozoas (Alexander, 1977). Por ejemplo, los rizobios son inhibidos en cultivos por otras especies bacterianas, actinomicetos u hongos (Alexander, 1977). Un microorganismo productor de toxinas va a reducir la nodulación cuando los rizobios y el productor de toxinas son introducidos juntamente dentro de un suelo estéril, sembrado con una leguminosa (Damirgi y Johnson, 1966). Además, se han aislado extractos tóxicos del suelo, los cuales inhiben el crecimiento de los rizobios (Chatel y Parker, 1972).

Demolon y Dunez (1935; citados por Danso, 1977) fueron los primeros en enfatizar que el parasitismo por bacteriófagos quizá sea un factor importante que afecte a los rizobios. Esto es apoyado por el aislamiento de bacteriófagos del suelo, capaces de parasitar a los rizobios en cultivos. Sin embargo, todavía es cuestionable el hecho de que los bacteriófagos tienen un gran impacto ecológico. La mayoría de los estudios han sido hechos en cultivos y no en suelos. De cualquier modo, los resultados de Marshall y Vincent (1954), Bruch y Allen (1957) y Parker y Allen (1957), demuestran que los bacteriófagos capaces de lisar a los rizobios tienen un número limitado de bacterias hospedadoras. A este respecto, tanto las observaciones de Hitchner (1930) como las de Marshall (1956) acerca de que las cepas de -

Rhizobium sp. llegan a ser lisogénicas cuando crecen simultáneamente con los bacteriófagos parásitos sugieren que el nivel de la población de las bacterias formadoras de nódulos en el suelo, quizá no sea afectada adversamente por los bacteriófagos.

Se ha observado que cuando una cepa de rizobios es inoculada en un suelo no estéril se produce una caída en el número de la población de rizobios paralela al ascenso en el número de -- protozoarios; es probable, por lo tanto, la existencia de un -- cierto grado de depredación (Danso et al, 1975).

A pesar de que cada protozoario parece tener habilidad para consumir miles de bacterias, éstos tampoco acaban con el número de rizobios en el suelo; esto se debe a que el grado de depredación decrece continuamente a medida de que las bacterias -- empiezan a ser más raras y el protozoario tiene que recorrer re -- lativamente grandes distancias para encontrar a los pocos sobre -- vivientes. Por lo tanto, es incapaz de mantener el mismo valor de depredación que exhibía cuando la distancia entre células co -- mestibles era pequeña. Además, esto da la oportunidad a que -- las cepas se reproduzcan a un grado suficientemente rápido para reemplazar a las células que fueron consumidas por el protozoario (Danso et al, 1975).

Es importante subrayar que cuando una cepa de rizobios es introducida en el suelo, su población disminuye inicialmente, -- sin embargo, ésta no desaparece totalmente a pesar de que los -- suelos fértiles están llenos de protozoarios depredadores y micobacterias, bacterias líticas, actinomicetos y virus (Danso, -- 1977).

B). Determinación de la Infectividad o Habilidad Competitiva.

Uno de los aspectos que más influyen en la obtención de --

una inoculación exitosa es, además de la efectividad de las cepas, su habilidad para competir con las cepas nativas por los sitios de formación de nódulos. Esta habilidad competitiva está determinada principalmente por interacciones genotípicas que existen entre la bacteria y la planta y, en menor grado, por algunos factores del medio ambiente (Obaton, 1977).

A pesar de la gran importancia que tiene la habilidad competitiva de los rizobios, ésta rara vez es determinada, quizá - debido a la escasez de métodos sencillos, prácticos y económicos para lograrlo. La mayoría de los métodos utilizados se basan en poner en competencia a la cepa problema ya sea con cepas nativas o con una cepa testigo de la cual se conoce su infectividad para, posteriormente, determinar la proporción de nódulos formados por cada una de ellas. La diferencia entre estos métodos radica en la técnica utilizada para medir la proporción de nódulos formados, por cada una de las cepas, y que puede ser - por aglutinación (Johnson et al, 1965), inmunodifusión (Dudman y Brockwell, 1968), inmunofluorescencia (Trinick, 1969), tipificación de fagos (Staniewski, 1968), por el uso de mutantes resistentes a antibióticos (Obaton, 1971), ELISA (Rise et al, 1984), etc. En este sentido uno de los métodos más utilizados es aquel en el cual se emplean mutantes resistentes a antibióticos. Entre los trabajos más importantes, basados en este método se encuentran los realizados por Van Rensburg y Strijdom en 1982, quienes evaluaron la habilidad de 24 cepas de Rhizobium meliloti las cuales se consideraban potencialmente útiles como inoculantes. Su trabajo consistió en agrupar a las cepas en pares y compararlas. Realizaron dos comparaciones por cada par de cepas; en la primera de ellas utilizaron una mutante de la primera cepa y en la segunda una mutante de la segunda cepa, obser--

vando que esto no producía discrepancia en los resultados.

Algunos autores como Bromfield y Jones (1980), están en --
contra del uso de este método, ya que sostienen que la mutación
altera las habilidades competitivas de las cepas. Esto ha de--
sencadenado la búsqueda de nuevos métodos; tal es el caso del -
método descrito por Peterson et al (1983), basado en la identi-
ficación de las cepas formadoras de los nódulos, con base a su
resistencia a antibióticos, utilizando un disco comercial para
la determinación de la sensibilidad a antibióticos y midiendo -
los halos de inhibición.

Otro método muy utilizado es el desarrollado por Amarger --
(1975) el cual consiste en que la cepa efectiva, a la cual se -
le va a medir su competitividad, es mezclada con una cepa ine--
fectiva pero muy competitiva, en una proporción de 99% de la ce
pa inefectiva a 1% de la cepa efectiva. Posteriormente se rea-
lizan determinaciones del tamaño y color de los nódulos así co-
mo del peso de la planta. Si consideramos que existe una corre-
lación positiva significativa, entre el número de nódulos efec-
tivos y el peso seco de la planta, podemos estimar la infectivi-
dad de la cepa. Al comparar varias cepas problema con la misma
cepa testigo, se pueden clasificar éstas con base a su competi-
tividad. Amarger (1981) utilizó este método para cepas de Rhi-
zobium meliloti, encontrando que existía una buena correlación
entre los resultados obtenidos a nivel de invernadero y los ob-
tenidos a nivel de campo.

Otro método que promete ser de gran utilidad es el desarro-
llado por Olivares et al (1980) quienes trabajaron con cepas de
Rhizobium meliloti. Este método se basa en la adición de una -
determinada cantidad de tetraciclina a la raíz de la planta hos-
pedera, lo que origina que se detenga la infección. La adición

del antibiótico se realizó después de un determinado tiempo de haber inoculado a la alfalfa. Para cada cepa se pudo calcular un coeficiente de infectividad con base al número de nódulos -- que se formaron con y sin la adición del antibiótico.

Se han realizado varios estudios para tratar de demostrar si existe o no una relación entre la habilidad competitiva de -- las cepas y su efectividad. Algunos de ellos demuestran que la planta hospedera puede seleccionar a las cepas que la van a infectar (Vincent J. y Waters, 1953; Russel y Jones, 1975). A -- este respecto, Robinson en 1969 en experimentos realizados a ni -- vel de campo e invernadero, encontró que para Rhizobium trifoli las cepas efectivas fueron más hábiles para formar nódulos -- que las cepas inefectivas, y sugirió que la planta hospedera tiene cierta preferencia para seleccionar la cepa efectiva. Esto fué -- apoyado por los resultados obtenidos por Márques Pinto et al -- (1974) y Labandera y Vincent (1975). Sin embargo, se han seña -- lado otros resultados en los cuales la cepa inefectiva fué más competitiva que la cepa efectiva (Nicol y Thornton, 1942; Vin -- cent y Waters, 1953; Franco y Vincent, 1976; Johnston y Berin -- ger, 1976).

Amarger en 1981, midió la habilidad competitiva entre ce -- pas efectivas y mutantes inefectivas de la misma cepa, y encontró que no existían diferencias significativas entre ellas. -- Además, observó que en realidad sí existe la capacidad de la -- planta para seleccionar a la cepa que la va a infectar, pero -- que esta selección se daba aún entre cepas con igual grado de -- efectividad, de lo que se concluye que la selección no depende de la efectividad de la cepa.

C). Determinación de la Efectividad.

La evaluación de la capacidad de los nódulos para fijar nitrógeno atmosférico, puede determinarse directamente por los -- productos de la fijación, como el amonio y otros; o bien, por -- métodos indirectos basados en la habilidad que tiene la nitrogenasa para reducir un diverso número de sustratos distintos al -- nitrógeno atmosférico.

La determinación de nitrógeno como tal permite evaluar, in directamente, la actividad nitrogenásica de una cepa de Rhizo--bium sp. ya que al evaluarse el contenido proteico total de la planta, se está midiendo la cantidad de nitrógeno atmosférico -- fijado por la bacteria y transformado durante la síntesis de -- aminoácidos y proteínas de la planta (A.O.A.C., 1970).

Para tratar de medir pequeñas cantidades de nitrógeno fijado, se han hecho varias modificaciones de la técnica de Kjeldah, sin embargo no han sido suficientes, ya que no se ha logrado aumentar la precisión y sensibilidad requeridas.

El uso de isótopos incrementó la sensibilidad de la deter-- minación. El uso de la incorporación del ^{15}N en el método para la medición de la fijación de nitrógeno fué desarrollado por Burris (1943). Este autor demostró que el ácido glutámico cont-- nía la mayor cantidad de ^{15}N , después de exponer un cultivo de azotobacter con el isótopo durante 90 min.; de lo que se concluye que este aminoácido es un importante producto de la fijación (Burris et al, 1943).

En el mismo año, Burris et al demostraron que los cultivos de Rhizobium leguminosarum no incorporaban el isótopo del N_2 -- marcado con ^{15}N , pero las plantas noduladas de diversas legumi-- nosas incorporaron el isótopo ^{15}N del N_2 , cuando se expusieron sus raíces al sustrato.

El análisis del isótopo se realiza con un espectrómetro de masa. El desarrollo de esta técnica es limitado, dado la restricción de obtener y disponer de un espectrómetro de masa, y la preparación y manejo del material radiactivo. Por lo anterior, es completamente impráctico realizar esta técnica como un ensayo rutinario de la medida de la fijación de nitrógeno (Fried y Broeshart, 1975).

La nitrogenasa tiene la habilidad de reducir los protones de hidrógeno molecular de una serie de sustratos distintos al nitrógeno. Dentro de estos sustratos se encuentran el óxido nítrico, la azida, el cianuro, etc. (Burris, 1967; Hoch, 1960; Kelly, 1967; citado por Turner y Gibson, 1980).

Hay un solo producto que es distinto a algunos de los sustratos reducidos por la nitrogenasa, el etileno, que proviene de la reducción del acetileno por la enzima del sistema.

Simultáneamente, Dilworth (1966), Schöllhorn y Burris (1966), observaron el efecto inhibitorio del etileno sobre la fijación de nitrógeno en extractos de Clostridium pasteurianum. Mas tarde descubrieron que la enzima reducía el acetileno a etileno. Ambos gases pueden medirse rápidamente a bajas concentraciones usando la cromatografía de gases. Como consecuencia de la alta sensibilidad, costo accesible y rapidez, el uso de la técnica de la reducción de acetileno actualmente es usada y recomendada para medir la fijación de nitrógeno.

La integridad de la reducción del acetileno como un indicador de la actividad de la nitrogenasa y de la fijación de nitrógeno, ha sido establecida para una escala bastante amplia de sistemas biológicos y garantiza la sustitución de otros criterios que complementan la medida de la fijación, tales como el peso de la planta, contenido de nitrógeno en follaje, tamaño de

nódulos y número, tamaño de la planta (Hardy et al, 1973). Esta técnica se ha usado para diversos sistemas: suelos, plantas, nódulos, cultivos, etc.

El acetileno es reducido a etileno, el cual no es reducido por nada más, es decir, es sumamente específico (Dilworth, -- Schöllhorn y Burris, 1966). La reducción del acetileno a etileno ha sido demostrada para leguminosas (Koch y Evans, 1966). -- Este método es rápido y sensible; además se requiere un equipo y material simple y barato, el tiempo de incubación es corto, -- el análisis es sensible y el aire no interfiere como contaminante (Stewart, 1967; citado por Turner y Gibson, 1980).

3.4 FACTORES QUE AFECTAN LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.

Los diversos factores que afectan la simbiosis Rhizobium-leguminosa son de tipo físico, químico y biológico. Entre los factores físicos se tienen la luz, la temperatura, la humedad y porosidad del suelo, principalmente.

Dentro de los factores químicos están todos aquellos elementos del suelo que sirven como nutrimentos, es decir: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, clasificados como elementos mayores; molibdeno, hierro, boro, zinc, cobalto, -- cobre, manganeso, considerados como micronutrimentos o elementos menores, siendo importante también la salinidad y el pH de los suelos, así como la contaminación química de los mismos producida por el exceso de pesticidas y fertilizantes.

Entre los factores biológicos son muy importantes las características genéticas que se manifiestan no solo a nivel de -- las especies de rizobios, sino aún entre cepas de la misma especie, lo que conduce a la necesidad de una selección de cepas -- con base a su capacidad de infección, efectividad, resistencia

a virus, y mejor adaptación a las variedades del macrosimbionte y propiedades edáficas.

Es importante subrayar que el efecto de estos factores sobre la fijación de nitrógeno puede ser en forma directa, es decir, alterando el mecanismo de la fijación en sí, o en forma indirecta al inhibir el crecimiento de las plantas o de las bacterias.

Un equilibrio adecuado de todos ellos permite en gran parte un rendimiento más alto en la fijación del nitrógeno en esta simbiosis.

Macronutrientes o elementos mayores:

Nitrógeno. Se ha discutido ampliamente el hecho de que el nitrógeno inorgánico combinado disminuye la nodulación de las leguminosas y reduce la fijación de nitrógeno (Sagardoy, 1976). Cuando existe nitrógeno combinado en el suelo, la planta leguminosa lo utiliza preferentemente, aún cuando esté nodulada. En su presencia, los nódulos permanecen poco más o menos inactivos, pero pronto para funcionar cuando esta fuente de nitrógeno se agota. Cuando el suelo contiene una gran reserva de nitrógeno disponible, los nódulos pueden permanecer pequeños e inactivos durante todo el período de crecimiento. Debido al efecto perjudicial del nitrógeno combinado sobre la nodulación y fijación del nitrógeno, usualmente no se recomienda el agregado de fertilizantes nitrogenados a los cultivos de leguminosas (FAO, 1985). No obstante, existen excepciones donde el uso oportuno y prudente de los fertilizantes nitrogenados ha incrementado los rendimientos y estimulado la fijación de nitrógeno. Cuando la aplicación de pequeñas cantidades de fertilizantes nitrogenados estimula el crecimiento de la planta y mejora su potencial fotosintético, sin retardar excesivamente el desarrollo de los nódulos

los, el efecto general puede ser benéfico (Dart y Wilson, 1970; FAO, 1985).

Los estudios en relación al efecto que tiene el nitrógeno inorgánico sobre la nodulación, demuestran que dicha relación es directa (Van Schreven, 1958).

Munns (1968) en experimentos realizados con plantas de alfalfa encontró que al exponer, en forma constante, estas plantas a pequeñas concentraciones de nitratos (0.2-0.5 M), se lograba inhibir la fase inicial rápida de la nodulación. Posteriormente, observó que una concentración de nitratos, mantenida a 0.02 M, originaba una reducción del número total de pelos radiculares, el número de pelos radiculares enroscados, la formación de tubos de infección y el número de nódulos producidos.

Existe un número muy amplio de trabajos acerca de los efectos inhibitorios del nitrógeno inorgánico combinado sobre la fijación de nitrógeno. Entre otros autores, Sagardoy (1976), demostró que la adición de nitrato de amonio redujo la cantidad de nitrógeno fijado por las plantas de alfalfa inoculadas con cepas de Rhizobium meliloti. Sin embargo, Oghoghorie y Pate (1971), demostraron que la actividad nitrogenásica, por unidad de peso de nódulos, en Pisum arvense solo fué reducida marcadamente por la concentración más alta de nitrógeno que usaron (300 ppm), lo que indicó que los nitratos inhiben en mayor grado la nodulación que la fijación de nitrógeno en sí.

Fósforo. El fósforo es de gran importancia por formar parte del adenosín trifosfato (ATP), que es la molécula más importante por medio de la cual, la energía química es movilizad -- para los procesos biológicos. Sin el ATP la nitrogenasa no puede funcionar.

A pesar de que normalmente se establece que una deficien--

cia de fósforo reduce la cantidad de nitrógeno fijado debido a que restringe el crecimiento de la planta hospedera, hay evidencias que sugieren que los requerimientos de fósforo para la nodulación y la máxima actividad del nódulo son mayores que los necesarios para el crecimiento de la planta (DeMooy et al, 1973). De igual forma se ha observado que se requiere de una más alta concentración de fósforo para lograr la máxima actividad del nódulo que el requerido para alcanzar la máxima nodulación (DeMooy y Pesek, 1966).

Luse et al (1975), en experimentos realizados con plantas cowpea, en el norte de Nigeria, observaron que la aplicación de concentraciones crecientes de fósforo producía un incremento en el número y actividad de los nódulos y en la producción de semilla.

En experimentos similares, Betherfalvay y Yader (1981) observaron el efecto de diferentes concentraciones de fósforo (4, 20, 100 ó 500 M de fósforo) sobre plantas de soya inoculadas, desarrolladas sobre un soporte estéril, encontrando que no se presentó nodulación cuando la concentración de fósforo fue de 4 M, y que el peso seco de los nódulos se incrementó hasta 200 veces entre las plantas tratadas con 20 y 500 M de fósforo.

Inversamente, los niveles tóxicos de fósforo reducen el número de nódulos y su capacidad de fijar nitrógeno (Fletcher y Kurtz, 1964). En estudios realizados con suelos de Apomu, bajo condiciones de invernadero, se observó que la aplicación de una alta concentración de fósforo (1,000 kg. de fósforo/Ha) se tradujo en una disminución de la nodulación.

Potasio. Una baja concentración de potasio disponible restringe severamente el crecimiento de la leguminosa hospedera - lo cual, a su vez limita la cantidad de nitrógeno fijado, y pue

de también afectar la formación de nódulos (FAO, 1985).

Duke et al (1980) realizaron estudios de fertilización de alfalfa con potasio, utilizando diferentes concentraciones de K_2SO_4 (448 y 673 kg/Ha), encontrando que la más alta concentración de K_2SO_4 permitió un incremento en el número de nódulos y la cantidad de acetileno reducido, en comparación a las plantas control no fertilizadas. En este caso, la mayor capacidad de reducción del acetileno se atribuye al incremento en cuanto a la cantidad de masa nodular y no a un aumento en la actividad nitrogenásica por unidad de peso de tejido.

Estudios en campo con soya en Virginia, Estados Unidos (FAC, 1985), mostraron que la aplicación de fósforo o de potasio incrementó el número de nódulos por planta y por unidad de volumen de suelo. La aplicación de potasio incrementó aún más el número de nódulos, el peso total de nódulos y las vainas por planta que la aplicación aislada de fósforo, corroborándose que los incrementos fueron mayores cuando se aplicaron ambos nutrientes. Estos resultados indican la importancia del balance de estos nutrientes. Abarentemente, el suministro de potasio en ese suelo fué más significativo que el de fósforo. No obstante, lo contrario podría ocurrir en suelos tropicales ácidos, con alto contenido de aluminio, donde el elemento probablemente deficiente es el fósforo.

Calcio. Los rizobios de vida libre, aparentemente, tienen muy bajos requerimientos de calcio (Vincent, 1962), sin embargo, estos requerimientos son considerablemente mayores para el crecimiento de la planta hospedera y son todavía más grandes los requerimientos necesarios para obtener la infección de la raíz o la iniciación de la nodulación (Lowther y Lonergan, 1968). Algunos autores demostraron que un incremento en la concentración

de calcio, de 246 a 720 M, no tuvo efecto sobre el crecimiento del trébol subterráneo, pero incrementó la nodulación. Inversamente, una disminución en la concentración de calcio, de 246 a 4 M, disminuye progresivamente tanto el crecimiento de la planta hospedera como el número de nódulos (Edwards, 1977).

Por medio de experimentos realizados con base a la transferencia de las plantas leguminosas desde un medio con una determinada concentración de calcio hasta otro con una concentración de calcio diferente, Lowther y Loneragan (1968), obtuvieron evidencias que demuestran que los requerimientos de calcio, necesarios para obtener la infección o iniciación de la nodulación, son más grandes que los necesarios para obtener la evolución o desarrollo del nódulo. Una vez que los nódulos son formados, continúan su desarrollo aún a concentraciones de calcio bajo -- las cuales las plantas tienen muy poco crecimiento.

El calcio también juega un papel muy importante en la capacidad de los nódulos para fijar nitrógeno (Banath et al, 1966). Bajo condiciones de una severa deficiencia de calcio, la cantidad de nitrógeno fijado es limitada a causa del crecimiento restringido de la planta hospedera mientras que, bajo condiciones de una moderada deficiencia de calcio, la cantidad de nitrógeno fijado puede disminuir debido a una alteración en el funcionamiento de los nódulos (Loneragan, 1959). Además, entre otras funciones del calcio, es importante su acción moderadora del efecto tóxico del aluminio y manganeso sobre el crecimiento de la planta y la fijación de nitrógeno (FAO, 1985).

Magnesio. Un ingrediente imprescindible para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa es el metal magnesio, en su forma de ión, Mg^{2+} , si este se halla ausente por completo la enzima no funcionará. Lo que hace el Mg^{2+} todavía no se comprende

del todo, pero un hecho queda ya claro: el ATP no reacciona solo con la nitrogenasa; tiene que transformarse en sal monomagnésica para realizar su función con la nitrogenasa (Postgate J., 1981).

Azufre. La deficiencia de azufre puede limitar tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno, pero es más probable que el efecto se manifiesta en una reducción del crecimiento de la planta hospedera (FAO, 1985). Es decir, que a pesar de que existen evidencias de que el azufre tiene un efecto específico sobre la fijación de nitrógeno, y que por el hecho de formar parte de las dos proteínas que integran a la enzima nitrogenasa, una deficiencia severa de este elemento, quizás restringe la síntesis de dicha enzima (Anderson y Spencer, 1950); hay resultados que demuestran que los efectos de la deficiencia de azufre en la reducción de la fijación de nitrógeno, son paralelos a los efectos sobre el crecimiento de la planta hospedera (Wooding et al, 1970).

En experimentos de campo con plantas de soya realizados en el norte de Nigeria, Goldsworthy y Heathcote (1964) observaron que la adición de azufre estimuló la nodulación y la captación de nitrógeno. De igual forma, Lluch et al (1982), obtuvieron incrementos altos en el rendimiento de leguminosas, así como en el número de nódulos formados/planta debido a la fertilización foliar con azufre.

Micronutrientos o elementos menores:

En la composición de la nitrogenasa, enzima binaria responsable de la fijación del nitrógeno, juegan un papel muy importante el molibdeno y hierro. Sin cantidades adecuadas de estos elementos, la fijación del nitrógeno no puede ocurrir (FAO, 1985). Los requerimientos de molibdeno para la fijación de nitró-

geno son mayores a los requerimientos para la nodulación (Mulder et al, 1959). Cuando existe una baja concentración de molibdeno en el suelo se produce una alteración del sistema simbiótico, lo que se manifiesta en la aparición de síntomas de deficiencia de nitrógeno en la planta. El que se mitiguen dichos síntomas por medio de la aplicación de nitrógeno, apoya las ideas de que son más grandes las necesidades de molibdeno para la fijación del nitrógeno que para el crecimiento de la planta (Edwards, -- 1977).

La deficiencia de hierro se manifiesta como una limitante indirecta de la fijación del nitrógeno, al entorpecer el crecimiento de la planta, no obstante, hay que tomar en cuenta que su efecto es también directo al considerar su importancia como constituyentes de la nitrogenasa y de la leghemoglobina del nódulo, la cual protege a la primera contra el efecto inactivador del oxígeno (FAO, 1985).

El boro es un elemento esencial para la formación de los nódulos (Mulder, 1949). Participa, además, en la actividad metabólica tanto del nódulo como de la planta hospedera. La presencia del boro es indispensable para el funcionamiento de los nódulos (FAO, 1985).

Al igual que el magnesio, el zinc participa como factor esencial para la respiración y metabolismo de nitrógeno de las plantas, además es activador de diversas enzimas y actúa en la biosíntesis de las auxinas. Aunque no se conoce su efecto directo en la nodulación o en la efectividad del microsimbionte, la carencia de este micronutriente afecta la fijación del nitrógeno indirectamente al entorpecer el metabolismo de la planta hospedera. Demeterio et al (1972), demostraron con dos variedades de soya, que la deficiencia de zinc disminuye el peso

seco de los vástagos, el peso de los nódulos y la cantidad de nitrógeno fijado.

La adición de cobalto a suelos deficientes en este elemento aumenta substancialmente el crecimiento de la planta hospede~~r~~a y mitiga los síntomas de deficiencia de nitrógeno lo que sugiere que los requerimientos de cobalto para la fijación de nitrógeno, son mayores a los que se necesita para el crecimiento de la planta hospedera (Ahmed y Evans, 1960).

La aparición de síntomas de deficiencia de nitrógeno en plantas noduladas de trébol subterraneum, que crecieron en un medio con baja concentración de cobre, sugiere que la deficiencia de cobre inhibe específicamente la fijación de nitrógeno (Greenwood y Hallsworth, 1960). Lo dicho anteriormente se confirma por el hecho de que al aumentar los niveles de cobre se produce un incremento en la producción de materia seca, así como de la concentración de nitrógeno en las plantas (Edwards, 1977).

Hallsworth et al (1964) observaron que el aumento en el suministro de cobre ocasionaba un incremento en el peso de los nódulos en relación al incremento obtenido para el peso de las plantas, lo cual sugiere que quizá, sean más grandes los requerimientos de cobre para la nodulación que los necesarios para el crecimiento de la planta hospedera. La deficiencia de cobre se relaciona con el desarrollo de numerosos nódulos pequeños típicos, similares a los producidos por cepas completamente inefectivas (FAO, 1985).

Quizás el crecimiento de las leguminosas en suelos ácidos es inhibido por los efectos tóxicos del manganeso soluble (Edwards, 1977). Aunque Döbereiner (1966) obtuvo evidencias que demostraron que la nodulación y la fijación de nitrógeno, son -

más sensibles a la toxicidad del manganeso que la planta hospedera en su crecimiento. Kang y Fox (1975) observaron una relación inversa entre la cantidad de manganeso tomado por la planta de soya y la nodulación.

En relación al efecto tóxico del manganeso, Edwards (1977) encontró que, al abonar con cal los suelos que tienen concentraciones tóxicas de este elemento, se produjo un gran incremento en la nodulación y en el porcentaje de nitrógeno total en Phaseolus vulgaris (frijol). Con respecto al efecto del manganeso sobre la supervivencia del Rhizobium se ha encontrado que las cepas de Rhizobium meliloti resisten las concentraciones altas de manganeso en un medio de cultivo (Holding y Lowe, 1971). Por otra parte, estudios con cepas de Rhizobium phaseoli han mostrado variaciones en su habilidad para crecer en altas concentraciones de manganeso (Döbereiner, 1966).

Otros factores:

Aluminio: Se sabe que el exceso de aluminio limita tanto el crecimiento como la elongación de la raíz. Sin embargo, no se presentan altas concentraciones de aluminio al menos de que el suelo tenga un pH de 5.0 o menor a este valor. Además, la mayoría de las leguminosas, con excepción del caupí, no nodulan en suelos con pH bajo, independientemente de la concentración de aluminio (FAO, 1985).

Estudios sobre el efecto de diferentes concentraciones de aluminio (0, 25 y 100 μM) sobre la nodulación en plantas de Stylosanthes inoculadas, permitieron apreciar un efecto fuerte del aluminio sobre la nodulación, ya sea retardando su aparición o reduciendo el número y peso seco de los nódulos. Esto se debe a que el aluminio interfiere con la infección de la raíz y/o con la iniciación del nódulo así como en la elongación

de la raíz lo cual disminuye el número potencial de sitios para el establecimiento de la infección y la formación de nódulos - (De Carvalho et al, 1982).

pH. La concentración de iones hidrógeno afecta tanto el crecimiento de las leguminosas como el crecimiento de los rizobios, sin embargo, la mayoría de las leguminosas son capaces de crecer bajo condiciones de acidez en las cuales se inhibe el crecimiento de los rizobios (Loneragan y Dowling, 1958). Munns (1968) demostró que el proceso de infección es sensible a la acidez, notando que a un pH de 4.4 se inhibió la capacidad de los pelos radiculares para enroscarse e infectarse. Sin embargo, el aumento del pH hasta 5.4 trajo como consecuencia, el enroscamiento de los pelos radiculares y la infección.

El efecto de la acidez está relacionado, en muchos casos, con el efecto de las altas concentraciones de aluminio y manganeso presentes en los suelos ácidos. Munns et al (1981) atribuyeron la inhibición del crecimiento de la soya, en suelos ácidos, al efecto tóxico del aluminio y no al fracaso en la nodulación por efectos del pH ácido.

Salinidad. Se han realizado muchos estudios acerca de los efectos de la salinidad sobre la nodulación. Subba-Rao et al (1972) encontraron, en experimentos realizados con plantas de alfalfa, que es mayor el efecto de la salinidad sobre la nodulación de la planta que sobre la supervivencia de los rizobios.

Wilson (1970) demostró que una salinidad elevada inhibía la formación de nódulos así como la fijación de nitrógeno por parte de los nódulos que ya existían desde antes que se impusieran las condiciones de salinidad. El hecho de que se haya acumulado muy poca concentración de sal en los nódulos, sugiere que la reducción en la fijación de nitrógeno estuvo ampliamente

relacionado con los efectos de la sal sobre la planta hospedera. Singleton et al (1982) estudiaron el efecto de la salinidad sobre la supervivencia del Rhizobium spp. encontrando que muchas de las cepas estudiadas fueron capaces de sobrevivir bajo concentraciones altas de sal, las cuales son capaces de inhibir el crecimiento de la mayoría de las leguminosas de uso agrícola. - Geogle et al (1981) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de sal (0-1.8%) sobre la nodulación en plantas de soya, encontrando que a concentraciones de 1.2% de sal la nodulación fué totalmente inhibida; este hecho se atribuyó a una disminución en la población rizobial y, principalmente, a que la salinidad elevada disminuyó la formación de pelos radiculares, disminuyéndose, por lo tanto, los sitios disponibles para la infección.

Humedad del suelo. Las condiciones de tensión excesiva de agua producen daños reversibles e irreversibles sobre los nódulos. Inversamente, la desecación afecta tanto el crecimiento de la planta hospedera como la fijación de nitrógeno (Edvans, - 1977).

Luz. Debido a que las plantas requieren luz para sintetizar sus carbohidratos, a partir de bióxido de carbono, no es sorprendente que diferentes investigaciones estudien la correlación entre el grado de luminosidad y el proceso de formación de nódulos. La mayoría de los investigadores sostienen que el fotoperíodo tiene un importante efecto en la formación de nódulos. Por ejemplo, en los experimentos de Sironvali (1958) se observó una formación de nódulos doce veces mayor sobre la raíz de la soya con 15 horas de iluminación al día, que en aquéllas que recibieron sólo 8 horas de iluminación. Por otra parte, si las leguminosas son inoculadas en la obscuridad no se forman los nód

dulos, además, a muy baja intensidad de luz, la leghemoglobina de los nódulos se rierde (Virttanen, 1945).

3.5 DESCRIPCION Y ZONIFICACION DEL AREA DE ESTUDIO.

En la presente tesis se estudiaron los suelos de las localidades conocidas con el nombre de "La Cieneguilla" y "La Calavera", los cuales se encuentran ubicados en el municipio de Lagos de Moreno, Estado de Jalisco.

Lagos de Moreno forma parte de la zona conocida con el nombre de los Altos de Jalisco. Geográficamente se encuentra situado a $21^{\circ}22'$ de latitud, $101^{\circ}55'$ de longitud y 1,880 m. de altitud. La topografía está definida por la Sierra de Comanja, que es donde se asienta prácticamente la cuenca del Río Lagos, además de una serie de lomeríos y ondulaciones combinadas con algunas superficies planas entre las que está el Valle de Lagos. Hidrográficamente se caracteriza por la presencia del Río Lagos. La principal fuente de riego de la zona es "La Presa del Cuarenta", siendo ésta una de las principales presas del Estado de Jalisco.

El clima de Lagos de Moreno, con base a la clasificación de Köppen, modificada por García (1973), corresponde a un BS_1 hw(w)(e)g que significa:

BS_1 = Clima seco con lluvias de Verano. El cociente de precipitación anual media/temperatura anual media es mayor de 22.9; lo que nos indica que dentro de la clasificación de climas secos corresponde a los menos secos.

h = Semicálido; debido a que su temperatura media anual corresponde a una escala entre los 18 y $22^{\circ}C$ ($18.9^{\circ}C$).

y a que su temperatura del mes más frío fué de menos de 18°C (13.6°C).

w(w)= Con un régimen de lluvias de Verano de por lo menos diez veces mayor cantidad de lluvia en el mes más húmedo de la mitad caliente del año que en el mes más seco, con un porcentaje anual de lluvia invernal menor de 5.

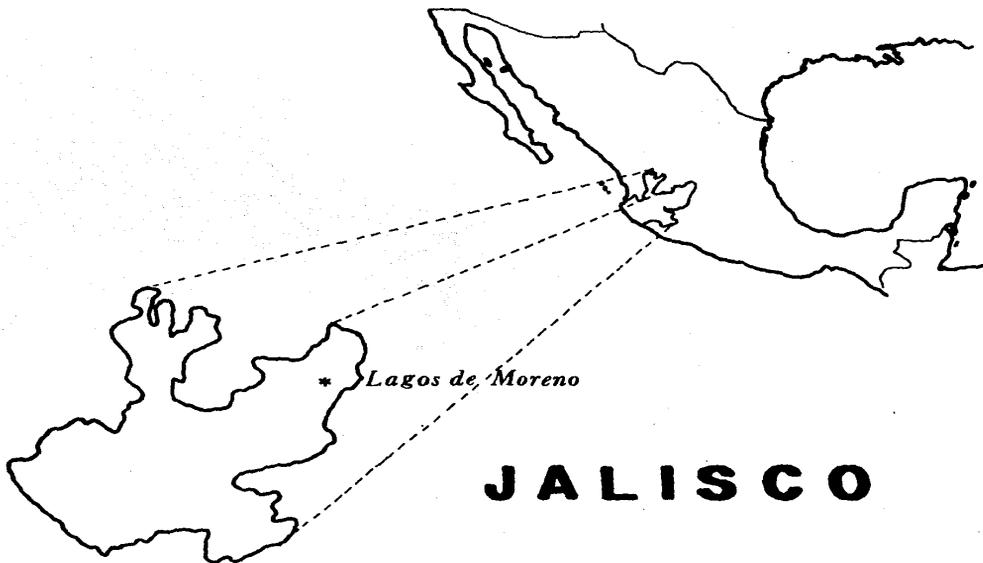
g = Marcha anual del mes más cálido antes del Solsticio de Verano.

e = Presenta oscilación extremosa anual de las temperaturas medias mensuales.

A). Suelos de las Localidades en Estudio.

De acuerdo a la carta Edafológica elaborada por CETENAL (1973), los suelos de la Localidad "La Cieneguilla", localizados en la zona de lomeríos, fueron cartografiados como una asociación de Planosoles y Feozems háplicos en fase dúrica, mientras que los suelos de las zonas aluviales, fueron en general, clasificados como Feozems háplicos sin limitantes físicas o químicas. En el caso de la localidad "La Calavera", se presenta una asociación de Litosol más Feozem háplico en fase dúrica.

Estos criterios sobre la clasificación y distribución de suelos en la zona, resultan correctos para la escala cartográfica utilizada por CETENAL, sin embargo, en la presente tesis se utilizó una escala más detallada (1:10,000) donde fué posible distinguir otras unidades edafológicas y cartográficas y que se discuten en el capítulo de resultados.



* *Lagos de Moreno*

JALISCO

4. Material y Métodos.

4.1 MUESTREO.

Como ya se dijo anteriormente, en la presente tesis se estudió el Municipio de Lagos de Moreno, específicamente, las localidades conocidas con el nombre de "La Cieneguilla" y "La Calavera". La primera de estas localidades es utilizada para la agricultura, en donde se siembra principalmente: maíz, frijol, y alfalfa. La segunda es utilizada para pastoreo.

Con base a las fotografías aéreas se determinó la geomorfología, el relieve y el uso actual del suelo, lo cual sirvió como base para determinar los puntos de muestreo. Se colectaron seis muestras de suelo a una profundidad de 0-30 cm. y se ubicó un perfil de suelo representativo en cada una de las localidades.

Las muestras tomadas de la localidad "La Cieneguilla" se clasificaron del 1 al 6 y el perfil como el número 1; mientras que las muestras de la localidad "La Calavera" se clasificaron del 7 al 12 y el perfil como el número 2.

4.2 FOTOINTERPRETACION.

Se utilizaron, para este propósito, fotografías aéreas de la zona de estudio (CETENAL, 1973) de escala 1:25,000, de las cuales se obtuvo una amplificación que permitió alcanzar una escala de 1:10,000, con el propósito de realizar una fotointerpretación de mayor detalle, con base a la metodología señalada por el Soil Survey Staff (1975) para levantamiento cartográfico de suelos. La clasificación de los suelos se hizo según FAO-UNESCO (1970) y Papadakis (1980).

4.3 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LOS SUELOS.

En cada una de las muestras se determinaron las siguientes propiedades físicas y químicas:

- a). Color: Determinado con las Tablas Munsell, en muestra de suelo seco y húmedo (Munsell Soil Chart, 19-75).
- b). Textura: Según el método de Bouyoucos (1963).
- c). Reacción del suelo (pH): Se determinó mediante el uso de un potenciómetro, en una relación suelo-agua 1:2.5 (Jackson, 1964).
- d). Conductividad eléctrica (milimhos/cm³ a 25°C): Se determinó en el extracto de saturación de la pasta del suelo por el puente de Wheatstone (Campbell, 1949; citado por Chapman y Parker, 1981).
- e). Densidad aparente: Se utilizó una probeta de 10 ml. -- para relacionar el peso y volumen del suelo -- (Am. Soc. for Test and Mat., 1958).
- f). Capacidad de intercambio catiónico total: Se realizó percolando el suelo con amonio y, posteriormente, se destiló en Kjeldahl, recibiendo el destilado en ácido bórico para formar borato de amonio y poder así cuantificar el ácido sulfúrico (Peech, 1947).
- g). Calcio y magnesio intercambiables: Extrayéndolos del suelo con una solución de acetato de amonio, -- 1.0 N. a un pH = 7.0 por percolación y titulando con E.D.T.A. (Jackson, 1964).
- h). Sodio y potasio intercambiables: Extrayéndolos del suelo con una solución de acetato de amonio, --

1.0 N. a pH = 7.0 por percolación y, posteriormente, determinados por medio de Flamometría (Jackson, 1964).

- i). Materia orgánica: Se hizo por digestión húmeda con dicromato de potasio y con calefacción espontánea por dilución con ácido sulfúrico para de terminar colorimetricamente con sulfato ferroso, utilizando la técnica de Walkley y -- Black modificada por Walkley (1947).
- j). Nitrógeno total: Por digestión de Kjeldahl (AOAC, -- 1970).
- k). Fósforo asimilable: Se cuantificó colorimetricamente utilizando una solución extractora de fluoruro de amonio (Bray y Kurtz, 1945).

4.4 DETERMINACION DEL N.M.P. DE RIZOBIOS.

Se determinó en frijol y en alfalfa, para cada una de las muestras tomadas, es decir, se hizo un recuento indirecto del número de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti respectivamente. Para este objetivo, se utilizó el método de las diluciones seriadas de suelo en jarras de Leonard (Vincent, 1975), usando arena esterilizada como soporte, y el medio nutritivo de Jensen (Vincent, 1975).

Se utilizaron semillas de frijol variedad "Flor de Mayo" y de alfalfa variedad "Peruana", certificadas por PRONASE, las -- cuales corresponden a las variedades más comunmente utilizadas en la zona de estudio. Las semillas fueron desinfectadas con -- una solución de hipoclorito de calcio al 7.5% durante 10 min. y se enjuagaron abundantemente con agua de la llave esterilizada para eliminar el cloro. Posteriormente se incubaron a 28°C ba-

jo condiciones estériles, hasta el brote de la radícula y se colocaron asepticamente en las jarras de Leonard, a continuación se prepararon las diluciones de suelo con solución Ringer en una escala entre 10^{-1} a 10^{-8} . Las semillas semigerminadas se inocularon con 1.0 ml. de cada dilución. Finalmente se dejaron 2 plántulas de frijol y 3 de alfalfa por jarra y 3 repeticiones por dilución.

Se corrieron a la vez, los respectivos testigos: un testigo sin inocular, Rh(-); un testigo inoculado con una cepa conocida, Rh(+) y un testigo con fuente de nitrógeno, N(+).

Las jarras se colocaron en el invernadero, a una temperatura promedio de 24°C con un fotoperíodo de 8 a 9 horas diarias (con luz natural más luz fluorescente).

El período de crecimiento fué de 6 semanas para el frijol y de 8 semanas para la alfalfa, al término del cual se cosecharon, procediéndose a la observación y cuantificación de la nodulación. El N.M.P. (Número Más Probable) de rizobios se calculó con base a las Tablas de Mc Crady (1946).

4.5 AISLAMIENTO DE RIZOBIOS.

La selección de las cepas de Rhizobium sp. se llevó a cabo através de la estimación de la calidad de los nódulos presentes en las mismas plantas utilizadas para el conteo. Se seleccionaron los nódulos con base a su tamaño, color (leghemoglobina) y posición en la raíz.

Los nódulos fueron cuidadosamente separados de la raíz, dejando un pequeño pedazo de la raíz unida al nódulo con el propósito de no matar a los microorganismos en el momento de desinfectar el nódulo y de evitar contaminaciones.

Una vez colectados los nódulos de las raíces, se llevó a -

cabo la desinfección de los mismos, con una solución de hipoclorito de calcio al 7.5% por espacio de 5 minutos enjuagándose, - posteriormente, con agua de la llave esterilizada. Los nódulos se maceraron asepticamente, y se procedió a la siembra por estría cruzada en el medio Agar Manitol-extracto de levadura-rojo congo, incubando a 28°C el tiempo necesario para obtener el desarrollo de las colonias de Rhizobium sp. La identificación -- morfológica se hizo según Vincent (1975). El resembrado se realizó según fué necesario para obtener cepas puras. Finalmente, las cepas puras se sembraron en frascos con tapón de rosca con medio inclinado de agar manitol- extracto de levadura, y se refrigeraron a 4°C hasta su utilización.

Las cepas obtenidas se clasificaron con base a la muestra - de suelo de donde proceden, al número de cepas obtenidas de dicha muestra, y a su planta hospedera. Por ejemplo: la clave -- 1₂fr significa una cepa obtenida de la muestra 1 de suelo, que se clasificó como 2 dentro de las cepas de esa muestra, y que - es infectiva para frijol.

4.6 CURVAS DE CRECIMIENTO.

Se corrieron bajo siembra en caldo manitol en matraces de 100 ml., incubados a 28°C con agitación constante (100 r.p.m.). La turbidez producida por el crecimiento de las cepas se midió diariamente en un espectrofotómetro Coleman; los datos de absorbanza fueron tomados a una longitud de onda de 700 nm. Se realizaron 2 curvas por cada cepa, la primera tomando el inóculo - directamente del cultivo en medio sólido. El desarrollo de estas primeras curvas fué seguido hasta que las lecturas de absorbanza permanecieron constantes (fase de crecimiento estacionario). La segunda curva fué bajo control ya que se partió de --

una cantidad aproximadamente constante de microorganismos; para lograr ésto fué necesario igualar, por dilución, la turbidez final obtenida de las primeras curvas a una absorbancia de 0.187, después de lo cual se tomó 1.0 ml. de la suspensión bacteriana, el cual constituyó el inóculo para la segunda curva. Una vez - que estas curvas alcanzaron el punto máximo de su fase logarítmica, la suspensión cultural se igualó nuevamente, a una absorbancia de 0.187, de aquí se tomó el inóculo utilizado para determinar la efectividad e infectividad de las cepas estudiadas.

4.7 EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD E INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS NATIVAS AISLADAS.

Para determinar la efectividad e infectividad de las cepas aisladas, fué necesario utilizar nuevamente, el sistema de las jarras de Leonard.

Los cultivos, en fase logarítmica, obtenidos durante la de terminación de las curvas de crecimiento, constituyeron el inoculante. La semilla sin germinar se recubrió con la cepa, utilizando para ello, turba molida y neutra como soporte y goma - arábica al 20% como adherente. El número de semillas por jarra, repeticiones, las condiciones de invernadero y el período de - crecimiento de las plantas, fueron los mismos que para el caso del conteo de los rizobios.

Se corrieron testigos positivos inoculados, utilizando las siguientes cepas de colección:

Para Rhizobium phaseoli las cepas clasificadas como: - CIAT-905, RCR-3618, RCR-3622, RCR-3644 y un inoculante comercial.

Para Rhizobium meliloti la cepa clasificada como 2001 y un inoculante comercial.

Los cuales con excepción de la primera y de los inoculan--

tes comerciales, proceden de la colección Rothamsted U.K. y fueron proporcionadas por el Instituto de Geología de la U.N.A.M.

De estas cepas testigo se escogió la más efectiva, tanto de Rhizobium phaseoli como de Rhizobium meliloti, para comparar estadísticamente contra ellas la efectividad e infectividad de las cepas nativas aisladas. Para este propósito, se aplicó un análisis de varianza, el cual permite estimar si las diferencias obtenidas entre los resultados son significativas.

Otros testigos que se corrieron fueron los negativos, sin inocular con y sin fuente de nitrógeno, N(+) y N(-), respectivamente. La fuente de nitrógeno la constituyó una solución de nitrato de potasio a una concentración al 0.05% adicionada a la solución de Jensen original.

Una vez terminado el período de crecimiento, las plantas fueron cosechadas, evaluándose cualitativa y cuantitativamente la nodulación.

La efectividad de las cepas aisladas se estimó, por medio de la técnica de reducción de acetileno (Turner y Gibson, 1980). Para esta evaluación las raíces se cortaron a nivel de la base del tallo o cuello y se colocaron en frascos de 125 ml. sellados con tapones de goma (silicón y teflón). A cada uno de los frascos se les inyectó una cantidad constante de acetileno, producido al momento de la determinación, a partir de carburo de calcio, manteniendo una relación aire-acetileno aproximada al 10%. Estos frascos se mantuvieron a una temperatura aproximada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, hasta su determinación en el cromatógrafo.

Las mediciones se hicieron en un cromatógrafo de gases marca Varian Aerograph 1,400, equipado con una columna de 3 m. de longitud, empacada con Porapak T y con un detector de ionización de flama. La temperatura de la columna fué de 90°C y de -

120°C para el inyector y el detector. Se utilizó, como patrón, una mezcla de 100 p.p.m. de etileno y en todos los casos, alícuotas de 1.0 ml.

La cantidad de aire contenido en los frascos con la raíz se midió por desplazamiento con agua. Se contó el número de nódulos presentes en las raíces y se determinó su peso seco en una balanza analítica, además, se determinó el peso seco de cada una de las plantas y se hicieron los cálculos correspondientes (Dart et al. 1972).

La infectividad de las cepas se consideró en base al número de nódulos formados.

5. Resultados y Discusión.

5.1 FOTOINTERPRETACION.

A). Suelos de la localidad "La Cieneguilla".

Con base a las fotografías aéreas (foto No. 1) y al trabajo de campo, tomando como parámetros la topografía, geología, -suelos, vegetación, uso actual del suelo y riesgo de degradación, se reconocieron las siguientes unidades cartográficas:

Unidad 1: Zona de lomeríos suaves, con pendientes que varían del 5 al 12% (fig. No. 1). Esta unidad presenta suelos desarrollados sobre areniscas y conglomerados donde predominan los Planosoles eútricos (We), Regosoles eútricos y algunos Feozem háplicos, todos ellos en fases dúricas o líticas someras. Se observa erosión hídrica laminar moderada y, en algunos casos, erosión hídrica en cárcavas. Su principal uso es práticola limitada; se consideran de clase VI y VII.

Unidad 2: Está constituida por suelos de origen aluvial - no recientes, limitados en profundidad a menos de 50 cm por un duripán (perfil No. 1, fig. No. 1). Se caracterizan por presentar un horizonte A ócrico y, en ocasiones un A mólico (tabla 5.1 a), con menor frecuencia presentan horizonte B cámbico. Se observa erosión hídrica laminar, -- compactación, degradación física y, ocasionalmente, mal drenaje interno por efecto de la misma compactación originado por el sobrepastoreo. Se clasifican como suelos agrícolas aunque de clase IV.

Unidad 3: Son suelos de origen aluvial, profundos, (fig. No. 1) bien drenados, que presentan horizontes A y B moderadamente desarrollados. Se caracterizan por presentar generalmente horizontes A ócricos y B cámbicos, un porcentaje de saturación de bases mayor a 50%, capacidad de intercambio catiónica moderada, y de buenos a altos contenidos de materia orgánica (muestras 1, 2, 3, 5 y 6; tabla 5.1 a). Estos suelos presentan evidencias de erosión hídrica, degradación física en su estructura y porosidad (compactación) y, posiblemente, degradación biológica dado el bajo índice de formación de horizontes húmicos. Su producción agrícola es moderada; ésto puede deberse al mal manejo que se le ha dado a estos suelos y a los problemas de degradación que existen en la zona. Se consideran de clase II por suelo y por erosión.

Unidad 4: Suelos aluviales recientes. Son suelos profundos y bien drenados (fig. No. 1), aunque con inundaciones eventuales en época de lluvias, en donde el encharcamiento dura poco tiempo. En esta unidad se encontraron suelos denominados Fluvisoles, Cambisoles y algunos Feozems. Se considera como un suelo de clase II por suelo y por el factor de inundación (muestra 4).

Clasificación de Horizontes según Papadakis, 1980.

Todos los Feozem (FAO, 1970) presentan horizonte húmico y, según su capacidad de intercambio, se consideran como suelos -- Ilíticos presentando, de acuerdo a su saturación de bases, hori

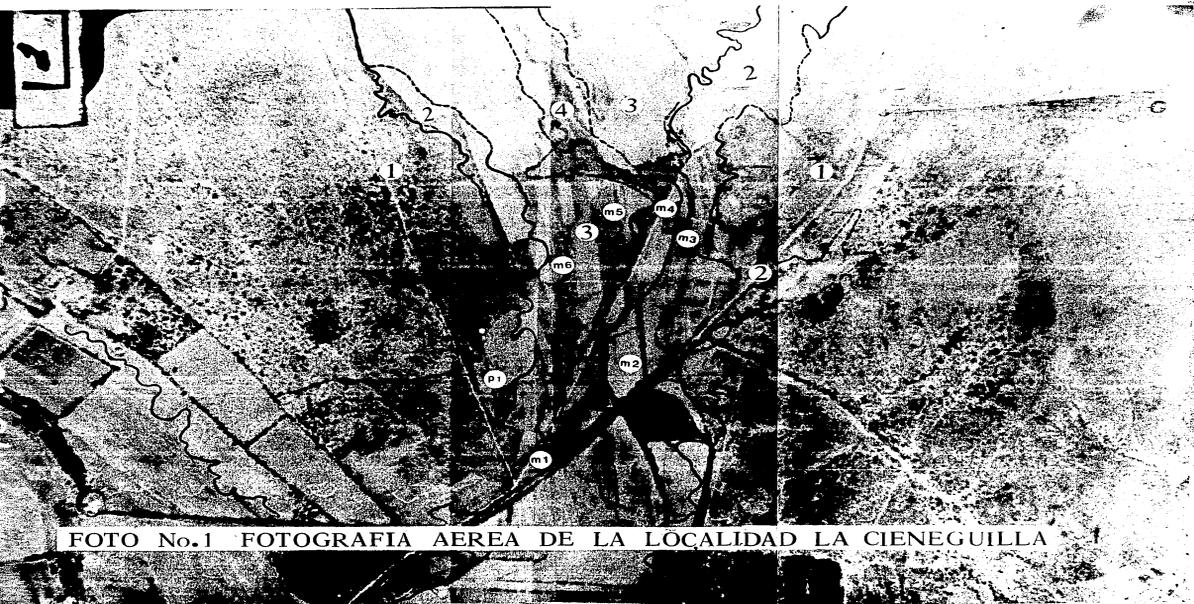


FOTO No.1 FOTOGRAFIA AEREA DE LA LOCALIDAD LA CIENEGUILLA

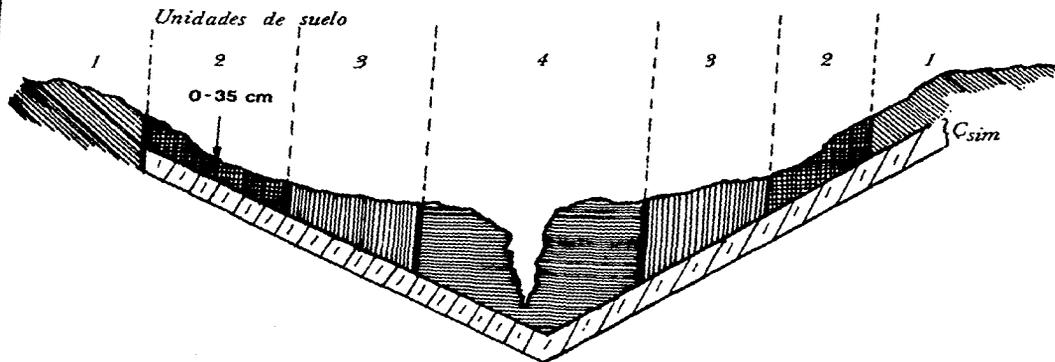


FIGURA No. 1 CATENA DE LOS SUELOS DE LA LOCALIDAD "LA CIENEGUILLA". .

zontes mólicos y, de acuerdo a su clasificación textural un tipo franco.

Los Planosoles eútricos (FAO, 1970), en su gran mayoría, no presentan horizonte húmico; aunque de acuerdo a su capacidad de intercambio catiónico, son suelos Ilíticos con horizontes úmbricos y ocasionalmente mólicos. Predomina el tipo textural franco.

Cambisol eútrico (FAO, 1970). Suelos sin horizonte húmico, Ilíticos, los cuales, de acuerdo a la suma de sus bases presentan horizontes mólicos y úmbricos de texturas de migajón arenosa a franca.

Litosol (FAO, 1970). Suelos sin horizonte húmico, Iliti--

TABLA 5.1 a. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SUELOS DE LA LOCALIDAD "LA CIENEGUILLA".

Lugar	Localidad "La Cieneguilla"				
Unidades Edafológicas	Feozem háplico	Planosol eútrico	Cambisol eútrico	Litosol	Fluvisol eútrico
Perfil o Muestra	verificación	perfil 1	muestras 1,2,3,5,6	—	muestra 4
Geología	Aluvi6n	Areniscas	Aluvi6n	areniscas conglomerados	Aluvi6n
Clima	BS, hw(w) (e) (g); clima semicálido seco con				lluvias de verano
Vegetaci6n y/o uso	AtpA-ArA	Ms-No-AtpA	Ms-No-AtpA	Me-No	AtpA
Relieve	plano	plano a ligeramente ond.	plano a ligeramente ond.	ondulado	plano
Horizontes superficiales	A mólico	A ócrico ó A mólico	A ócrico	A ócrico	A ócrico
Horizonte B	B cámbico	B cámbico	B cámbico	—	—
Fases físicas	ninguna	duripán	ninguna	duripán y roca	ninguna
Fases químicas	ocasionalmente sódica	ocasionalmente sódica	ocasionalmente sódica	ninguna	ninguna
Materia orgánica	rica	moderada	moderada	pobre	moderada
C.I.C.T.	moderada	moderada a baja	moderada a baja	baja	moderada
Textura	media	media	media a gruesa	gruesa	media a gruesa
Promedio de saturaci6n de bases	>75%	>60%	>50%	>50%	>75%
Suma de cationes	>14 meq/100g	>10 meq/100g	>10 meq/100g	>7 meq/100g	>10 meq/100g
Carb6n	>1%	ocasionalmente >1%	<1%	<1%	<1%

cos, Mólicos, de textura migajón arenosa.

Fluvisol eútrico (FAO, 1970). Suelos sin horizonte húmico, de tipo Ilítico, Mólicos, de textura franca a migajón arenosa.

Los suelos Ilíticos se consideran típicos de regiones templadas y semisecas y, generalmente, presentan uso agrícola.

Clasificación de Uso.

De acuerdo a Papadakis (1980), los tipos en los que se dividen las tierras en relación con su uso, pueden llamarse "tipos de campo". Un tipo de campo, es un conjunto de campos ("tipo Cieneguilla" y "tipo Calavera") que tienen las mismas aptitudes de producción y los mismos requerimientos de manejo, en los cuales se pueden sembrar los mismos cultivos a las mismas fechas y se consiguen resultados comparables. Esta definición es excelente desde el punto de vista práctico, pero solo es posible llevarla a cabo por las personas que trabajan regularmente estos campos, por lo que, en esta tesis se expone únicamente la clasificación de uso (números romanos), propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1975) la cual, aunque es útil para este propósito, resulta esencialmente artificial y arbitraria en varios casos.

B). Suelos de la localidad "La Calavera".

Se presenta una asociación edáfica constituida por Planosoles eútricos, Feozems háplicos y Litosoles (tabla 5.1 b, fig. - No. 2). En general, son suelos someros, muy degradados principalmente por erosión hidrica. Los Planosoles presentan una vegetación muy típica compuesta por gramíneas, mezquites y nopales; un drenaje lateral muy evidente; un horizonte E álbico que sobreyace a un duripán, el cual a su vez, sobreyace a una roca de naturaleza riolítica muy rica en cuarzo.

Estos suelos están asociados principalmente con Litosoles

y, en algunas ocasiones, preferentemente en sitios con estabilidad y menor grado de erosión, con Feozem háplico.

Se estima que al menos el 60% del área presenta erosión hídrica muy severa, y que de este 60% al menos la mitad ya no presenta suelo, sino que afloran los duripanes y las riolitas.

Estos suelos se consideran como una clase VI y, en algunos lugares, clase VII de uso silvícola, siendo sus principales limitantes el espesor del suelo, la erosión y la pendiente (fig. No. 2). Su uso más recomendable es el silvícola o forestal no maderable haciéndose notar que se requiere establecer un control inmediato de la erosión así como evitar el pastoreo.

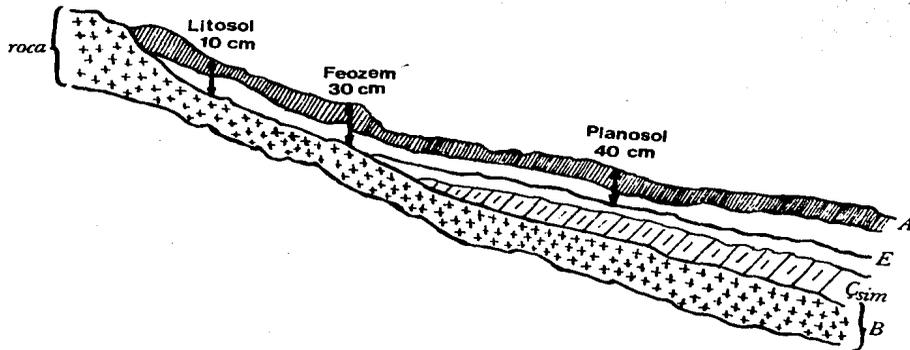


FIGURA NO. 2 CATENA DE LOS SUELOS DE LA LOCALIDAD "LA CALAVERA".

TABLA 5.1 b. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SUELOS DE LA LOCALIDAD "LA CALAVERA".

Lugar	Localidad "La Calavera"		
	Planosol eútrico	Feozem háplico	Litosol
Unidades edafológicas	Planosol eútrico	Feozem háplico	Litosol
Perfil o Muestra	perfil 2, muestras	muestras 10, 11	_____
Geología	rocas ígneas: riolita		
Clima	BS ₁ hw(w) (e) (g); clima seco semicálido con lluvias de verano.		
Vegetación y/o uso	en general presentan: mezquital, nopalera, pastizal natural		
Relieve	de lomerío a terreno montuoso; pendiente entre 8° y 20°		
Horizontes superficiales	A ócrico	A mólico	A ócrico
Horizonte B	_____	_____	_____
Fases físicas	duripán	duripán	duripán y roca
Fases químicas	_____	_____	_____
Materia orgánica	moderada a pobre	moderada a rica	pobre
C.I.C.T.	bajas	moderadas	bajas
Textura	gruesa a media	media	gruesa a media
Promedio de saturación bases	>80%	>80%	>70%
Suma de cationes (meq/100g)	>8	>8	>5
Carbón	≥1%	>1%	<1%

Símbolos: AtpA = Agricultura de temporal permanente anual
 Ara = Agricultura de riego anual
 Ms = Matorral subinerme
 No = nopalera
 Me = Matorral espinoso

Clasificación de Suelos según Papadakis (1980).

La gran mayoría de los Planosoles de esta localidad (FAO, 1970) carecen de horizontes húmicos, con excepción de aquellos que están localizados en sitios estables y poco erosionados. De acuerdo a su capacidad de intercambio catiónico se consideran como suelos Ilíticos, y como Mólicos en función de su saturación de bases; su tipo textural es de franco a migajón arenoso. En general, presentan horizontes E álbicos delgados, los cuales siempre sobreyacen a un duripán.

Feozem háplicos: (FAO, 1970) por lo regular presentan horizontes húmicos, son Ilíticos y Mólicos, de tipo textural de medio a fino.

Litosoles (FAO, 1970). Son suelos sin horizontes húmicos, Ilíticos, Mólicos y de textura arenosa.

Clasificación de Uso.

Todos los suelos de la localidad "La Calavera", presentan severos procesos de degradación física, química y biológica, -- así como erosión hídrica laminar y en cárcavas.

Estos suelos están limitados principalmente por disponibilidad de agua, profundidad efectiva, erosión y pendiente, por lo que se consideran incluidos en las clases VI y VII. Es fundamental controlar la degradación y la erosión de estos suelos de manera inmediata, sin embargo, previo a ello, se debe hacer un estudio para evaluar su potencial forestal o silvícola, descartando desde luego cualquier uso prático o agrícola.

Entre algunas de las limitaciones observadas en estos suelos, producidas por el sobrepastoreo están: compactación del piso (Factor n), pérdida de la porosidad del suelo, destrucción de la estructura del suelo y erosión acelerada; independientemente de los efectos biológicos, en este caso negativos, produ-

cidos contra la biota de estos suelos.

En el caso de reforestación se deben procurar especies arbóreas adecuadas, con un índice de campo que, además de resultar benéfico para controlar la erosión, sea interesante desde el punto de vista ecológico (paisaje).

Ejemplos de suelos de este tipo y de su forestación se encuentran en la parte Sur de los Estados Unidos, donde además de hacer los levantamientos convencionales de suelo, se han hecho estudios detallados multifactoriales de suelo-vegetación.

(Estos datos se obtuvieron gracias a la colaboración del Biólogo Jorge Gama Castro).

5.2 ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS DE SUELOS.

En la tabla 5.2 se presentan los resultados de los análisis físicos y químicos realizados a los suelos de las localidades en experimentación.

Los suelos de la localidad "La Cieneguilla", con excepción de los Feozems, presentan colores en seco y en húmedo característicos de horizontes A ócricos. Su coloración es típica del proceso de pardificación en climas templados, considerándose que los elementos cromógenos deben ser complejos de hierro-arcilla-humus.

Textura: De acuerdo al sistema U.S.D.A. (1974), estos suelos presentan texturas que varían de franca a migajón arenosa, las cuales corresponden a texturas media y moderadamente gruesa, respectivamente, por lo que se infiere que, entre otras de sus características físicas, la porosidad, aireación, drenaje y permeabilidad son adecuadas; sin embargo, existen algunos riesgos de encostramiento y compactación debido a la cantidad de limos

presentes y además a la baja actividad biológica que se refleja en una pobreza de materia orgánica. La relación limo-arcilla nos muestra valores medios de intemperismo edáfico y de alteración geoquímica de los minerales primarios; lo que nos conduce a pensar que se trata de suelos con desarrollo moderado.

Las densidades aparentes son normales para suelos con esta textura, es decir, los valores corresponden a densidades medias y altas.

Por su pH estos suelos varían de medianamente ácidos a muy ligeramente alcalinos; esta variación es una consecuencia directa de los porcentajes de cationes intercambiables presentes. Los cationes intercambiables están representados en un 80% por la suma de calcio y magnesio, con una relación de Ca^{++}/Mg^{++} que varía entre 2.77 y 5.91 la cual se considera normal. La relación de $Ca^{++} + Mg^{++}/K^{+}$, en todos los casos, y de acuerdo a Fassbender (1975), indica deficiencias de Ca^{++} en estos suelos.

La capacidad de intercambio catiónico, según el manual N. Z. Soil Survey, es moderada lo que nos hace suponer la presencia de arcillas bilaminares del grupo del caolín y algunas trilaminares del grupo de las ilitas.

La saturación de bases varía de 74 a 99% lo que, relativamente, le confiere a estos suelos características de eútricos. Por el porcentaje de sodio intercambiable (9.35 y 14.55) en algunos de estos suelos, existen algunos riesgos potenciales de sodificación y, actualmente, ninguno de salinización.

Los valores de conductividad eléctrica (de 0.38 a 1.25 mmhos/cm) ratifican que, como anteriormente se indicó, en estos suelos no hay problemas de salinización.

Los porcentajes de materia orgánica en estos suelos fluctuaron entre 1.30 y 2.03, los cuales se estiman como valores me

dianos a medianamente ricos, respectivamente.

El nitrógeno total varía de pobre a mediano. La relación C/N fluctuó de 5.53 a 9.82, en todos los casos, esta relación resultó baja debido a un balance adecuado entre el nitrógeno y el carbono, lo que permite un buen índice de mineralización. Finalmente el contenido de fósforo fué muy bajo.

Los suelos de la localidad "La Calavera" se caracterizan por presentar colores claros en todo el perfil. Estos colores están muy relacionados con el material parental pobre en minerales fácilmente intemperizables, con los procesos formadores como son principalmente hidrólisis ácida, lixiviación y lavado y con una fertilidad natural baja. El color es heredado del material parental através de un mecanismo de difusión de los elementos minerales de las rocas madres en el suelo.

Por sus texturas según U.S.D.A. (1974) estos suelos varían de francos a migajones arenosos correspondiendo a texturas media y moderadamente gruesa, respectivamente, caracterizándose en su fracción media y gruesa por la presencia de una gran cantidad de minerales primarios parcialmente alterados. La relación limo-arcilla varía de 1.0 a 2.4, lo que nos indica valores medios de intemperismo y de alteración de los minerales primarios siendo en este caso, menores que los de la localidad "La Cieneguilla"; probablemente debido a las siguientes causas:

- a). Mayor lavado y lixiviación de bases intercambiables.
- b). Mayor degradación química del suelo.
- c). Mayor edad por intemperismo.
- d). Un mayor intemperismo de los minerales fácilmente alterables que constituyen parte de la fracción limosa (feldespatos cálcicos y piroxenos); los cuales se han transformado en minerales secundarios (arcillas) o han sido lixiviados.

La densidad aparente varió de 1.18 a 1.29, lo que es típico para suelos con esta granulometría.

El pH varía de ligeramente ácido a muy ligeramente alcalino.

En los cationes intercambiables predomina el Ca^{++} y el Mg^{++} (80%) y la relación $\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++} / \text{K}^{+}$ muestra deficiencias importantes de calcio en la mayoría de estos suelos. La capacidad de intercambio catiónico varía de moderada a moderadamente baja. Estos valores corresponden a suelos que contienen minerales arcillosos haloisíticos de 7 A° (Soil Survey Staff, 1975).

La saturación de bases corresponde a la de suelos muy debilmente lavados lo que es frecuente en zonas templadas. En estos suelos existen ligeros riesgos de sodificación aunque no hay indicios detectables en la actualidad.

Los valores de conductividad eléctrica (0.33 a 0.62 mmhos/cm), muestran que no hay problemas de salinización.

Los contenidos de materia orgánica varían de medianos a medianamente ricos.

El nitrógeno total varió de medianamente pobre a mediano; la relación C/N fluctuó de 5.0 a 8.0 lo que, al igual que en los suelos de la localidad "La Cieneguilla", indica un balance adecuado entre el nitrógeno y el carbono.

El contenido de fósforo asimilable es muy bajo en estos suelos.

5.3 CONTEO DEL NUMERO MAS PROBABLE DE RIZOBIOS.

Se encontró que tanto la población de Rhizobium phaseoli como la de Rhizobium meliloti fueron notablemente mayores en la localidad de "La Cieneguilla" en comparación con las detectadas

Tabla 3.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS SUELOS.

Número de muestra	Color	Sénes	Humedad	Textura		Clasificación	Relación Lomo/ma	Densidad aparente	pH	Gases interporales		Soma de nutrientes mg/100g	Relación C/N	C/N ²	Cambio de base	SBR ² potencial base	Conductividad eléctrica	Extracción orgánica	Humedad orgánica	Ccarbón	Humedad C/N	Fósforo extractible (ppm)	Fósforo total (ppm)			
				arena	arcilla					NC	NO ₃															
1	6/2 10YR	3/2 10YR	40	18	22	Francoso	1.77	1.13	7.3	0.05	1.68	8.27	1.64	12.04	5.78	6.74	13.97	86.18	3.40	0.55	2.03	0.13	1.18	2.40	1.33	
2	6/2 10YR	3/2 10YR	38	21	20	Francoso	1.91	1.06	6.0	0.16	1.28	10.33	2.02	14.40	8.66	4.49	12.34	80.22	3.28	0.45	1.62	0.17	1.11	2.40	1.33	
3	6/2 10YR	3/2 10YR	42	16	16	Francoso	2.03	1.11	7.0	1.28	1.28	10.57	1.72	14.92	9.66	2.91	13.23	84.97	3.50	0.72	1.62	0.17	1.11	2.40	1.33	
4	6/2 10YR	3/2 10YR	54	10	16	Muy franco	1.88	1.16	7.2	2.33	1.76	9.35	2.73	16.01	6.77	3.37	13.63	89.69	14.52	1.22	1.50	0.16	0.85	2.56	0.95	
5	6/2 10YR	3/2 10YR	46	18	16	Muy franco	2.22	1.11	7.3	1.27	0.92	10.33	2.25	14.65	13.43	4.49	14.69	99.27	9.20	0.86	1.62	0.12	0.84	2.83	0.63	
6	6/2 10YR	3/2 10YR	54	14	14	Muy franco	2.22	1.20	6.7	0.32	0.80	4.33	1.52	8.63	9.28	2.77	13.73	76.08	4.44	0.84	1.30	0.09	0.72	2.33	0.88	
Perfil 1	6/2 10YR	3/2 10YR	42	14	22	Francoso	1.64	1.07	6.5	0.41	0.94	7.33	1.92	10.65	9.56	3.83	14.08	84.48	6.09	0.60	2.11	0.16	1.22	1.63	0.55	
7	6/2 10YR	3/2 10YR	42	16	20	Francoso	1.44	1.14	6.7	0.86	1.37	8.27	1.80	19.20	7.35	1	4.52	14.48	84.94	6.09	0.60	2.11	0.16	1.22	1.63	0.55
8	6/2 10YR	3/2 10YR	56	18	18	Muy franco	1.44	1.27	6.3	0.49	1.01	5.33	1.33	8.12	6.52	4.96	13.93	81.06	6.09	0.33	1.72	0.13	1.04	3.00	0.60	
9	6/2 10YR	3/2 10YR	56	22	22	Muy franco	1.40	1.27	6.4	0.75	1.37	5.97	1.53	9.45	6.63	4.90	12.44	71.96	6.95	0.52	1.30	0.15	0.79	3.00	0.60	
10	6/2 10YR	3/2 10YR	52	28	20	Francoso	1.40	1.28	6.3	0.38	0.53	4.14	1.22	10.10	6.28	3.28	14.08	72.37	5.79	0.45	1.87	0.03	1.08	3.68	0.60	
11	6/2 10YR	3/2 10YR	56	20	18	Muy franco	1.44	1.28	6.3	0.38	0.53	4.14	1.22	6.30	10.23	1.57	7.45	85.26	5.26	0.45	2.19	0.19	1.07	3.07	0.60	
12	6/2 10YR	3/2 10YR	54	20	16	Muy franco	1.48	1.22	7.4	0.28	0.22	4.14	2.49	7.77	8.84	1.66	8.67	89.62	3.02	0.41	1.71	0.14	0.99	3.07	0.60	
Perfil 2	6/2 10YR	3/2 10YR	66	24	10	Muy franco	2.40	1.28	7.6	0.30	0.21	3.22	1.64	3.28	6.39	1.96	7.14	83.47	6.54	0.38	1.92	0.13	0.71	3.46	0.60	

en la localidad de "La Calavera" (tabla 5.3), estos resultados son acordes con el uso actual del suelo en esas localidades, -- puesto que en la primera se siembran, de manera regular, las le guminosas homólogas y, como ya se había mencionado en los ante-- cedentes, esto trae como consecuencia un incremento en la pobla-- ción de rizobios nativos.

En términos generales, la población de Rhizobium phaseoli fué mayor que la de Rhizobium meliloti en ambas localidades (ta-- bla 5.3). Esto puede estar relacionado al hecho de que el fri--jol ha sido intensamente sembrado desde épocas muy remotas en -- nuestro país (de donde además es originario), pudiéndose afir-- mar que prácticamente no existe ningún área dedicada a la agri-- cultura, o que se haya dedicado a ella, en la que no se haya -- sembrado frijol, lo que significa que las cepas nativas de Rhi--zobium phaseoli existan en número elevado en casi todos los sue-- los del país.

El promedio de conteos de Rhizobium phaseoli, en los sue-- los de la localidad "La Cieneguilla" fué de 752,115 microorga-- nismos/g de suelo seco (de 12,525 a 4,000,000) en comparación -- con el promedio detectado en los suelos de la localidad "La Ca--lavera" que fué de 5,052 microorganismos/g de suelo seco (de -- 418 a 15,865). Estos resultados indican diferencias significa-- tivas entre ambas localidades. Resultados similares se pudie-- ron observar al hacer los conteos de Rhizobium meliloti, esti-- mándose un promedio de 24,031 microorganismos/g de suelo seco -- (de 1,587 a 50,100), en los suelos de la localidad "La Cienegui--lla", en comparación con los 20 microorganismos/g de suelo seco (de 7 a 33) en los suelos de la localidad "La Calavera". Como anteriormente se discutió, estas diferencias altamente signifi-- cativas entre los suelos de las dos localidades nos indican no

solo un manejo diferente sino que también un grado de desarrollo edáfico distinto que se manifiesta, además, en sus características físicas y químicas.

Siendo tan numerosos y complejos los factores que pueden influir en las poblaciones de los rizobios (además de los errores propios de la técnica que se emplee para su evaluación), resulta sumamente difícil establecer una comparación con los resultados que pudieran encontrarse en la literatura. No obstante, es interesante hacer notar que Sagardoy y Laborde (1977) han reportado poblaciones de Rhizobium meliloti de 2,500 microorganismos/g de suelo seco (de 417 a 15,000) que coinciden con los valores detectados en algunos suelos de "La Cieneguilla". En lo referente a Rhizobium phaseoli los resultados de la literatura fluctuaron aún más llegándose a detectar, bajo estas mismas técnicas, hasta 31,831,630 microorganismos/g de suelo seco (Palacio y Mier, 1978) en suelos bajo cultivo constante con frijol.

Se encontró que entre los puntos muestreados en una misma localidad y sobre todo en la localidad de "La Cieneguilla", -- existen diferencias en cuanto a las poblaciones para una misma especie de rizobios (tabla 5.3); para explicar esto hay que tomar en cuenta que el método utilizado unicamente nos da una estimación del número más probable de microorganismos presentes y nunca un valor exacto, además, existen muchos otros factores -- que intervienen, por ejemplo, se sabe que las raíces de las leguminosas y de otras plantas excretan ciertas sustancias que atraen a los rizobios (Tuzimura y Watanabe, 1959), por lo tanto, una muestra que se tome cerca de dichas raíces tendrá mayor número de rizobios que otra que se toma lejos de ellas. También puede influir la forma en la cual se ha trabajado cada uno de los puntos, pero para establecer bien ésto sería necesario rea-

TABLA 5.3 POBLACION DE LOS RIZOBIOS NATIVOS.

SUELOS	<u>Rhizobium phaseoli</u>	<u>Rhizobium meliloti</u>
	N.M.P. por gramo de suelo seco	
Localidad "La Cieneguilla"		
1	250,500	7,515
2	75,150	50,100
3	15,865	50,100
4	12,525	1,587
5	158,650	15,865
6	4,000,000	19,021
Localidad "La Calavera"		
7	4,175	7
8	752	7
9	7,515	15
10	418	25
11	1,586	33
12	15,865	33

N.M.P. = número más probable.

lizar estudios más detallados.

5.4 CEPAS AISLADAS.

A). Rhizobium phaseoli.

Localidad "La Cieneguilla":

1₁ fr, 2₁ fr, 2₂ fr, 3₁ fr, 3₂ fr, 4₁ fr,

5₁ fr, 5₂ fr, 6₁ fr, 6₂ fr, 6₃ fr.

Localidad "La Calavera":

7₁ fr, 8₁ fr, 8₂ fr, 9₁ fr, 9₂ fr, 10₁ fr,

11₁ fr, 11₂ fr, 12₁ fr.

B). Rhizobium meliloti.

Localidad "La Cieneguilla":

1₁ alf, 1₂ alf, 1₃ alf, 1₄ alf, 1₅ alf,

2₁ alf, 2₂ alf, 2₃ alf, 3₁ alf, 4₁ alf,

4₂ alf, 5₁ alf, 6₁ alf.

Localidad "La Calavera":

9₁ alf, 9₂ alf, 10₁ alf, 12₁ alf.

5.5 CURVAS DE CRECIMIENTO.

En las curvas de crecimiento obtenidas, se puede observar que tanto las cepas de Rhizobium phaseoli como las de Rhizobium meliloti, en general, presentaron una fase de latencia que duró aproximadamente 24 horas y la cual fué seguida de una fase de crecimiento logarítmico que duró hasta las 72 horas para poste-

riormente entrar en la fase de crecimiento estacionario (tabla 5.5 a y 5.5 b; gráficas). Estos resultados concuerdan con lo citado en la literatura, ya que según Vincent (1975), las cepas de Rhizobium phaseoli al igual que, las de Rhizobium meliloti - se consideran de crecimiento rápido, al sembrarse en medio maní tol- extracto de levadura e incubarse a 25-28°C presentan poco o ningún desarrollo durante las primeras 24 horas y alcanzan su máximo crecimiento entre el tercero y quinto día. La excepción a lo dicho anteriormente lo constituyeron, por un lado, aquellas cepas cuya fase de crecimiento logarítmico fué muy prolongado, - razón por la cual no se alcanzó a detectar el punto en el cual entran a su fase de crecimiento estacionario y que son la CIAT-905 (gráfica No. 3) y la 3644-RGR (gráfica No. 4), y por otro - lado, aquellas cepas cuya fase de crecimiento logarítmico fué - corta, alcanzando rápidamente su fase de crecimiento estacionario y que son la 1₁alf (gráfica No. 8), 2₁alf (gráfica No. 9), - 10₁alf (gráfica No. 10), 3₁alf (gráfica No. 11), 1₂alf y 2₃alf (gráfica No. 12).

Se encontró que algunas cepas desarrollaron una mayor absorbancia que otras, lo cual probablemente se debe a que dichas cepas se adaptaron mejor a las condiciones del medio de cultivo y crecieron más, sin embargo, esto no se puede afirmar tan categóricamente, debido a que no se realizaron pruebas de observación y conteo directo de los microorganismos (Brock, 1978; Carpenter, 1979). Entre las cepas que dieron una absorbancia alta destacan para Rhizobium phaseoli las clasificadas como 2₁fr, -- 10₁fr (gráfica No. 1), 9₂fr (gráfica No. 2), 1₁fr (gráfica No. 3), 2₂fr y 6₂fr (gráfica No. 5), cuyos valores de absorbancia - fueron superiores a 0.3, y para Rhizobium meliloti las clasificadas como: 1₅alf (gráfica No. 11) y la 1₄alf (gráfica No. 12),

TABLA 5.5 a. CURVA DE CRECIMIENTO, Rhizobium phaseoli.

Cepas	Tiempo (días)			
	1	2	3	4
1 ₁ fr	0.004	0.021	0.328	0.377
2 ₁ fr	0.004	0.237	0.357	0.377
2 ₂ fr	0.009	0.229	0.310	0.347
3 ₁ fr	0.018	0.022	0.168	0.252
3 ₂ fr	0.036	0.102	0.181	0.222
4 ₁ fr	0.056	0.155	0.260	0.284
5 ₁ fr	0.000	0.114	0.301	
5 ₂ fr	0.092	0.244	0.301	
6 ₁ fr	0.009	0.046	0.215	0.292
6 ₂ fr	0.013	0.041	0.252	0.328
6 ₃ fr	0.046	0.114	0.222	0.244
7 ₁ fr	0.004	0.056	0.187	0.252
8 ₁ fr	0.009	0.092	0.180	0.237
8 ₂ fr	0.013	0.066	0.125	0.208
9 ₁ fr	0.013	0.071	0.149	0.201
9 ₂ fr	0.032	0.229	0.292	0.328
10 ₁ fr	0.018	0.066	0.276	0.319
11 ₁ fr	0.022	0.056	0.174	0.194
11 ₂ fr	0.018	0.046	0.208	0.276
12 ₁ fr	0.004	0.081	0.180	0.222
CIAT-905	0.027	0.041	0.071	0.102
3618-RGR	0.041	0.137	0.194	0.208
3622-RGR	0.076	0.137	0.194	0.208
3644-RGR	0.022	0.061	0.097	0.137

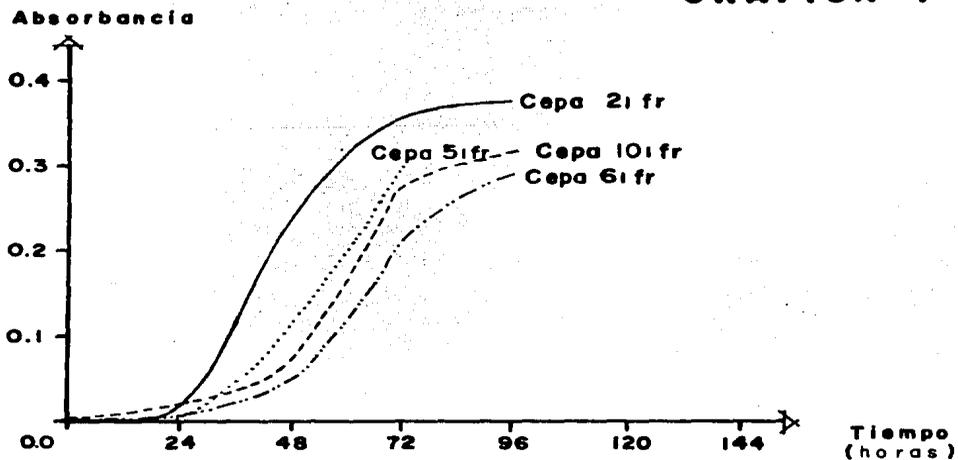
TABLA 5.5 b. CURVA DE CRECIMIENTO, *Rhizobium meliloti*.

Cepas	Tiempo (días)			
	1	2	3	4
1 ₁ alf	0.051	0.071	0.076	0.081
1 ₂ alf	0.032	0.092	0.092	
1 ₃ alf	0.081	0.208	0.252	0.268
1 ₄ alf	0.061	0.155	0.252	0.292
1 ₅ alf	0.066	0.187	0.284	0.301
2 ₁ alf	0.022	0.108	0.108	
2 ₂ alf	0.092	0.194	0.268	0.284
2 ₃ alf	0.051	0.071	0.086	
3 ₁ alf	0.046	0.097	0.097	
4 ₁ alf	0.022	0.066	0.181	0.215
4 ₂ alf	0.013	0.061	0.181	0.215
5 ₁ alf	0.041	0.131	0.215	0.222
6 ₁ alf	0.036	0.125	0.229	0.252
9 ₁ alf	0.018	0.125	0.215	0.260
9 ₂ alf	0.027	0.201	0.260	0.276
10 ₁ alf	0.060	0.071	0.071	
12 ₁ alf	0.041	0.167	0.208	0.208
2001	0.086	0.174	0.208	0.222

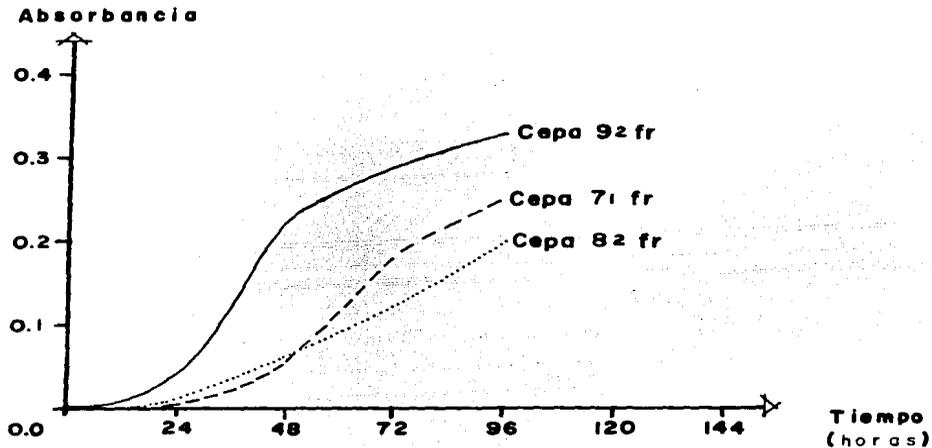
Curvas de Crecimiento

Rhizobium Phaseoli

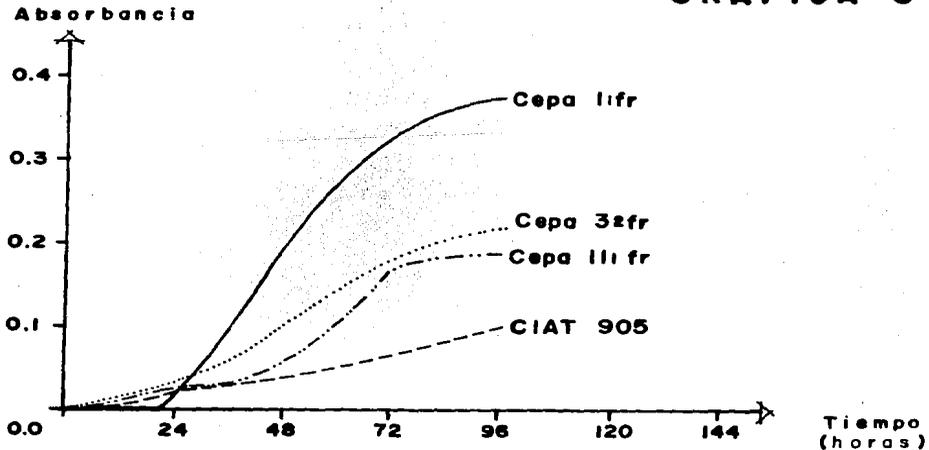
GRAFICA I



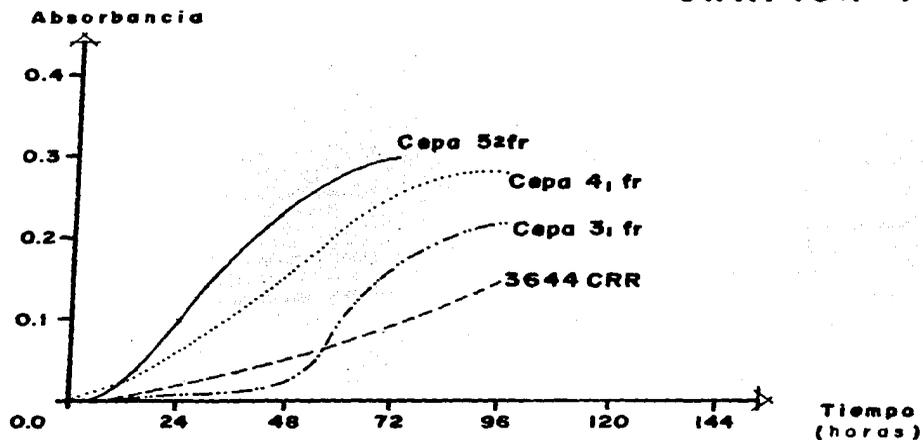
GRAFICA 2



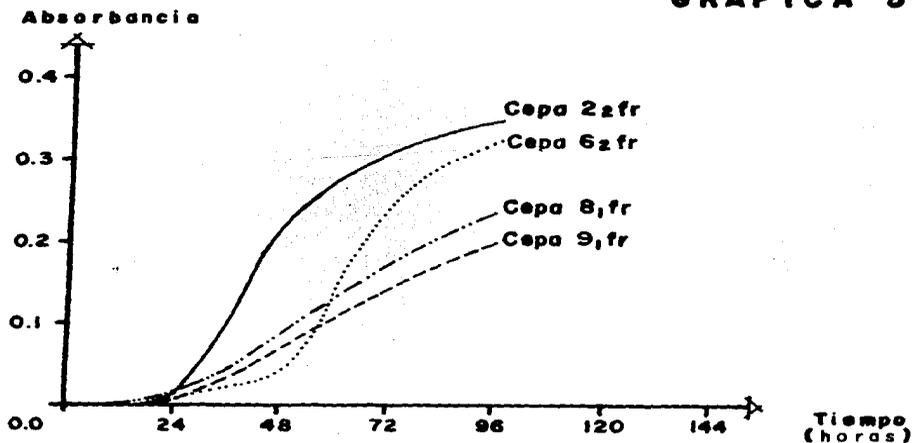
GRAFICA 3



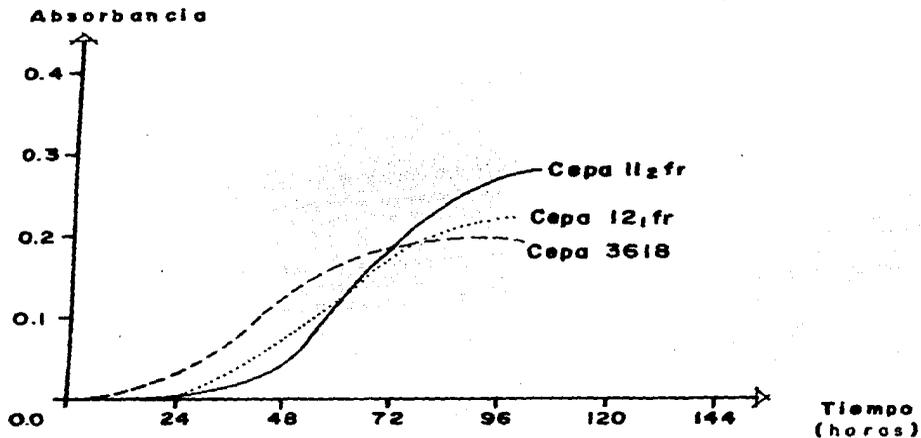
GRAFICA 4



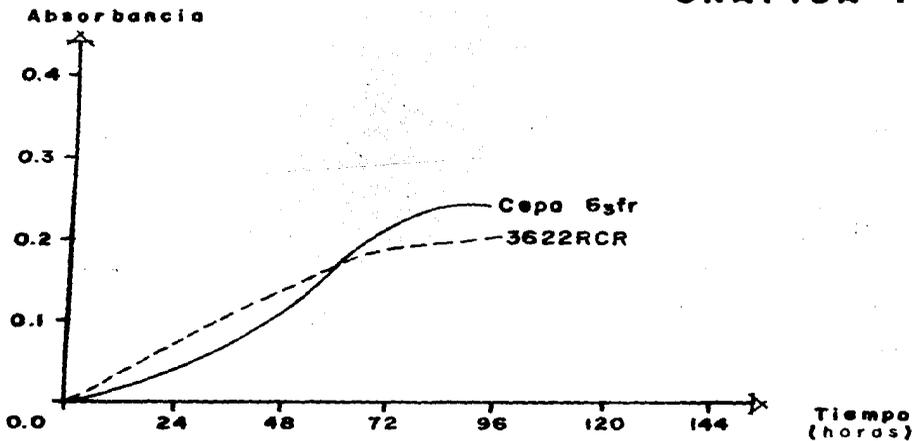
GRAFICA 5



GRAFICA 6



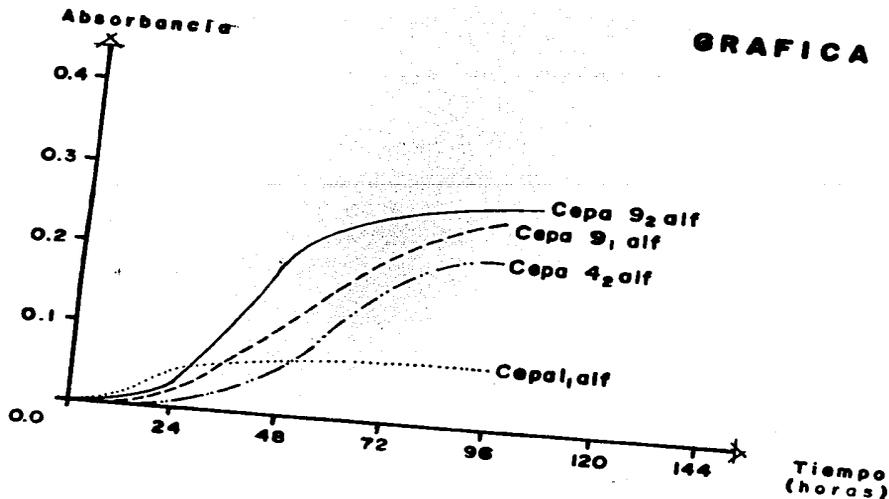
GRAFICA 7



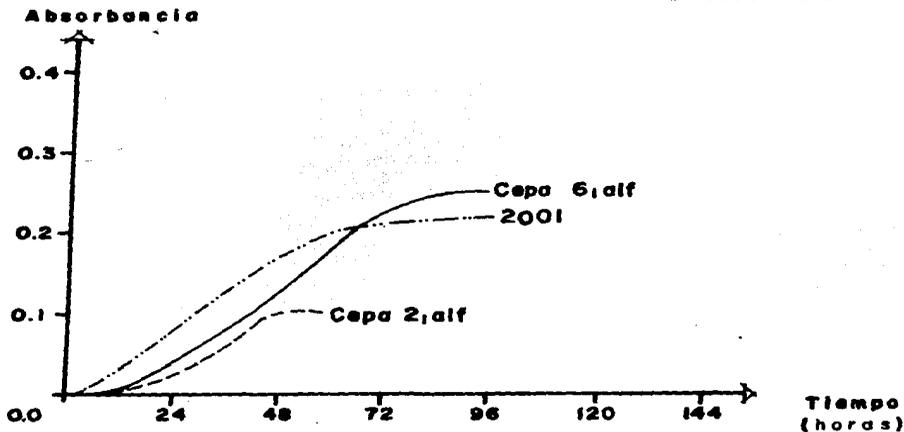
Curvas de Crecimiento

Rhizobium Mellioli

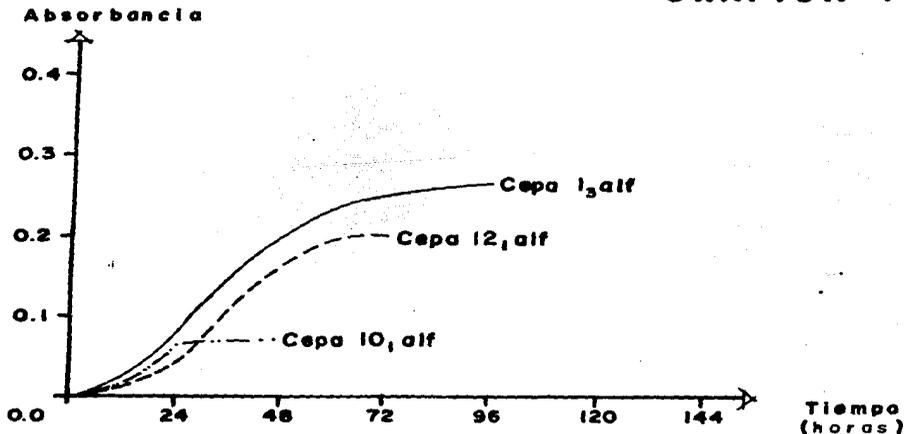
GRAFICA 8



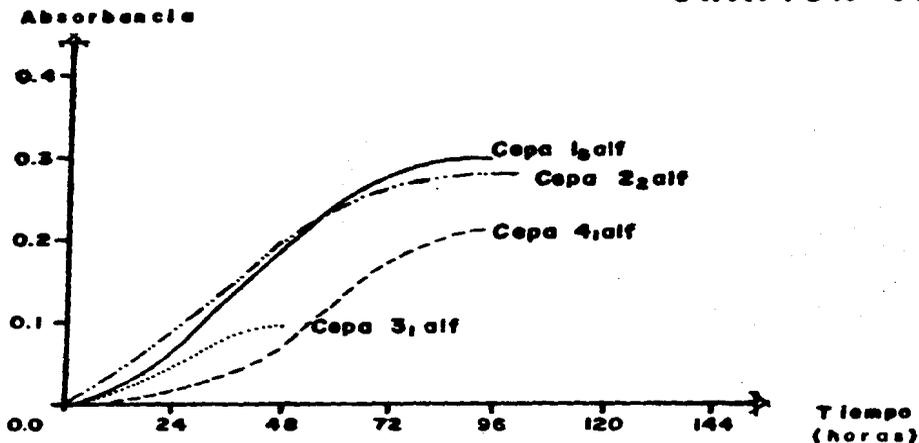
GRAFICA 9



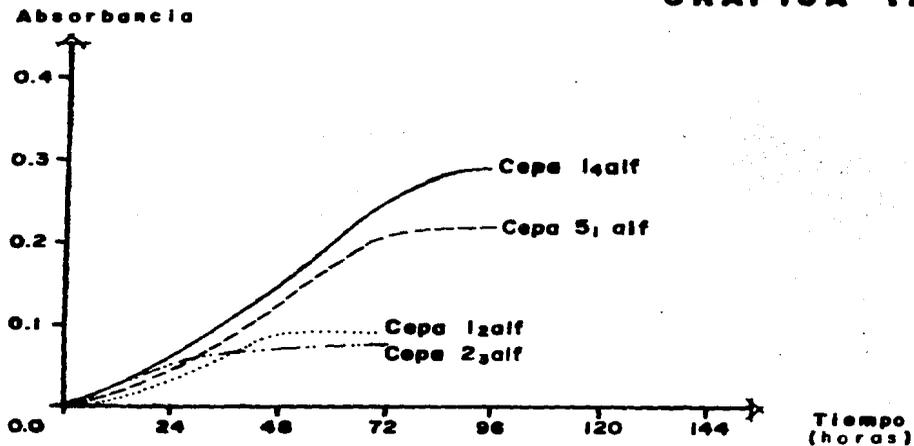
GRAFICA 10



GRAFICA 11



GRAFICA 12



que alcanzaron una absorbancia de 0.3.

Es importante mencionar que la mayoría de las cepas aisladas tuvo un buen crecimiento en el medio de cultivo, siendo la excepción aquellas cepas de Rhizobium meliloti cuyo crecimiento fué escaso (fase logarítmica corta) y que ya mencionamos anteriormente. Si la cepa que se va a utilizar como inóculo tiene un crecimiento abundante en el medio de cultivo, se podrá inocular a la semilla con un número grande de microorganismos, lo cual será una ventaja a la hora de que estos tengan que competir contra las cepas nativas por los sitios de formación de nódulos.

5.6 ANALISIS DE LOS RESULTADOS RELACIONADOS CON LA EFECTIVIDAD E INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS.

La efectividad de las cepas fué medida con base a la capacidad que tuvieron para reducir acetileno/hora/planta, mientras que la infectividad fué estimada en relación al número de nódulos formados/planta.

Por los resultados obtenidos (tabla 5.6 a y b) se observó que, tanto en el frijol como en la alfalfa, existe una correlación positiva entre la cantidad de acetileno reducido/hora/planta y el peso seco del follaje, de tal manera que a las cepas -- que redujeron una mayor cantidad de acetileno/hora/planta les -- corresponde el mayor peso seco del follaje y viceversa, a las -- cepas que redujeron la menor cantidad de acetileno/hora/planta les corresponde el menor peso seco de follaje. De esta manera tenemos por ejemplo, en relación a las cepas de Rhizobium phaseoli, que mientras las plantas noduladas con la cepa clasificada como 11₂fr, cuya cantidad de acetileno reducido/hora/planta

fué de 1.459 μ moles, alcanzaron un peso seco de follaje de 1.592 g, a las plantas noduladas con la cepa clasificada como 4₁fr, - cuya cantidad de acetileno reducido/hora/planta fué de 0.021 - μ moles, les corresponde unicamente, un peso seco de follaje de 0.500 g. Resultados similares se observaron con las plantas -- tratadas con Rhizobium meliloti citándose por ejemplo, a las -- plantas inoculadas con la cepa clasificada como 1₄alf, las cuales dieron una cantidad de acetileno reducido/hora/planta de - 2.205 μ moles y un peso seco de follaje de 0.125 g, mientras que a las plantas noduladas con la cepa clasificada como 4₁alf cuya cantidad de acetileno reducido/hora/planta fué de 0.021 μ moles, les corresponde un peso seco de follaje de 0.030 g.

Estos resultados obtenidos concuerdan con lo esperado ya - que al fijar la cepa una mayor cantidad de nitrógeno (mayor reducción de acetileno), la planta va a tener más nitrógeno disponible para sintetizar sus proteínas y, por lo tanto, va a desarrollar una mayor cantidad de follaje.

Por otra parte, se observó que no en todos los casos existió una correlación positiva entre el número de nódulos presentes en la raíz y la cantidad de acetileno reducido/hora/planta, ya que si bien es cierto que de los resultados obtenidos (tabla 5.6 a y b), se puede observar que muchas de las cepas aisladas, tanto de Rhizobium phaseoli como de Rhizobium meliloti, que redujeron muy poca cantidad de acetileno/hora/planta también tuvieron un número muy bajo de nódulos, por otro lado, no se puede generalizar a este respecto pues se observa que no necesariamente las cepas que redujeron la mayor cantidad de acetileno/hora/planta fueron las que tuvieron el mayor número de nódulos. - En este sentido, las cepas de Rhizobium phaseoli, clasificadas como comercial, 9₁fr y 4₁fr, no solo fueron las que tuvieron el

menor número de nódulos, con 29, 47 y 58, respectivamente, en comparación con las cepas de colección 3644-RCR y CIAT-905 que alcanzaron 131 y 281 nódulos, respectivamente, sino que también fueron las que redujeron la menor cantidad de acetileno/hora/planta, 0.003, 0.007 y 0.021 μ moles de acetileno reducido/hora/planta respectivamente, en comparación con los 0.561 y 1.459 μ moles de acetileno reducido/hora/planta obtenidos por la cepa de colección 3644-RCR y la cepa 11₂fr, respectivamente. Lo mismo se observa en algunas cepas de Rhizobium meliloti; tal es el caso de las cepas clasificadas como 4₁alf y 10₁alf, las cuales tuvieron un número muy bajo de nódulos (6 y 7 respectivamente), en comparación con la cepa 1₂alf, con 19 nódulos, y que, a su vez, dieron una escasa reducción de acetileno/hora/planta, 0.021 y 0.035 μ moles, respectivamente, en comparación a las cepas -- 2001 y 1₄alf, que redujeron 0.550 y 2.205 μ moles de acetileno -- reducido/hora/planta, respectivamente.

Con relación al hecho de que no necesariamente las cepas -- que redujeron la mayor cantidad de acetileno/hora/planta fueron las que tuvieron el mayor número de nódulos, tenemos que el 48% de las cepas de Rhizobium phaseoli estudiadas (1₁fr, 2₂fr, 5₁fr, 6₁fr, 6₂fr, 6₃fr, 7₁fr, 9₂fr, CIAT-905, 3618-RCR, 3622-RCR y la 3644-RCR) formaron un mayor número de nódulos en comparación -- con la cepa 11₂fr, la cual redujo la mayor cantidad de acetileno. Esto mismo se observa al comparar a la cepa CIAT-905 con la 11₂fr, en este caso, la primera formó más del doble de nódulos que la segunda (281 nódulos contra 123), sin embargo la segunda cepa redujo 5.5 veces más acetileno/hora/planta que la -- primera (1.459 μ moles contra 0.264 μ moles de acetileno/hora/---planta).

Con respecto a Rhizobium meliloti tenemos que el 47% de -- las cepas estudiadas (1₁alf, 1₂alf, 1₃alf, 1₅alf, 2₃alf, 3₁alf,

4₂alf, 6₁alf y la 12₁alf) formaron un mayor número de nódulos, en comparación con la cepa 1₄alf, la cual redujo la mayor cantidad de acetileno. Del mismo modo, si comparamos a la cepa 1₂alf contra la cepa 1₄alf, veremos que la primera de ellas formó poco más del doble de nódulos que la segunda (19 nódulos formados contra 9) sin embargo, la segunda cepa redujo 15 veces más acetileno/hora/planta que la primera (2.205 μ moles contra 0.144 μ moles de acetileno reducido/hora/planta). Podemos explicar los resultados anteriores considerando que existen diferencias en cuanto a los grados de infectividad y efectividad que presentan las cepas, encontrándose que aunque algunas cepas son muy infectivas y por lo tanto forman un número abundante de nódulos, su actividad nitrogenásica es baja, lo que se traduce en una escasa capacidad de reducción de acetileno, mientras que por el contrario, otras cepas que no son tan infectivas tienen una buena actividad nitrogenásica y, por lo tanto, reducen una mayor cantidad de acetileno. Es importante recordar que la presencia de cepas nativas muy infectivas y poco efectivas es uno de los principales factores que se deben considerar al determinar las necesidades de inoculación.

De igual manera, no se observó una correlación positiva entre la cantidad de acetileno reducido/hora/planta y el peso seco de los nódulos, ya que no necesariamente las cepas que redujeron la mayor cantidad de acetileno/hora/planta, tuvieron el mayor peso seco de nódulos. Aunque normalmente se establece que los nódulos efectivos tienen un mayor peso que los nódulos inefectivos debido, principalmente a su concentración de leghemoglobina, con los resultados obtenidos no se puede apreciar claramente esto debido a que las diferencias en cuanto al número y quizás al tamaño de los nódulos formados entre las plantas ino-

culadas con las distintas cepas, dificultan las comparaciones, por esta razón no se profundizó mucho en este punto.

Cepas seleccionadas de Rhizobium meliloti:

a). Reducción de acetileno.

Los resultados obtenidos de la reducción de acetileno/hora/planta con las cepas aisladas de Rhizobium meliloti fluctuaron entre 0.021 y 2.205 μ moles de acetileno reducido/hora/planta. - Estos resultados quedan dentro de la escala de valores citada por otros autores con experimentos de invernadero, y que van de 1.0 a 5.0 μ moles de acetileno reducido/hora/planta (Hardarson - et al, 1980) sin embargo, es difícil establecer una comparación exacta de estos resultados debido a las diferencias en las condiciones de experimentación.

De las cepas aisladas de la localidad "La Cieneguilla" el 54% de ellas (1₂alf, 2₁alf, 2₃alf, 3₁alf, 4₁alf, 4₂alf, y 6₁alf) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente menor a la obtenida con la cepa de colección; el 38% de ellas -- (1₁alf, 1₃alf, 1₅alf, 2₂alf, 5₁alf) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente igual a la obtenida con la cepa de colección y únicamente el 8% (1₄alf) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente mayor a la obtenida con la cepa de colección.

Todas las cepas aisladas de la localidad "La Calavera" (9₁alf, 9₂alf, 10₁alf, 12₁alf) redujeron, estadísticamente, una menor cantidad de acetileno/hora/planta, en comparación con la cepa de colección. El nivel de reducción de acetileno/hora/planta obtenida con el inoculante comercial, también resultó estadísticamente menor a la obtenida por la cepa de colección (tabla 5.6 a, cuadro No. 1 del apéndice).

b). Infectividad.

El número de nódulos/planta formados por las cepas de Rhizobium meliloti aisladas de ambas localidades, fluctuó entre 6 y 19. Estos datos coinciden con resultados de otros investigadores que han experimentado también bajo condiciones de invierno; tal es el caso de Hardarson et al (1980) y Amarger(1981) quienes indican haber obtenido de 6 a 19 y de 8 a 33 nódulos/--planta, respectivamente.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al número de nódulos formados por las cepas nativas y las cepas utilizadas como inoculantes (tabla 5.6a y cuadro No. 3 del apéndice).

c). Peso seco de follaje.

Finalmente, al comparar el peso seco del follaje de las plantas inoculadas, con las cepas en estudio, contra las plantas testigo fertilizadas con N(+), no inoculadas, se encontró lo siguiente:

En la localidad "La Cieneguilla" el 39% de las cepas (2₁ alf, 2₃ alf, 3₁ alf, 4₁ alf, 4₂ alf) alcanzaron un peso seco de follaje estadísticamente inferior al obtenido con las plantas testigo fertilizadas no inoculadas; el 46% (1₁ alf, 1₂ alf, 1₃ alf, 2₂ alf, 5₁ alf y 6₁ alf) dieron un peso seco de follaje estadísticamente igual al obtenido con las plantas testigo fertilizadas y el 15% (1₅ alf y 1₄ alf) tuvieron un peso seco de follaje estadísticamente superior al obtenido con las plantas testigo fertilizadas. Esto significa que al inocular con las cepas clasificadas como 1₁ alf, 1₂ alf, 1₃ alf, 2₂ alf, 5₁ alf y 6₁ alf, vamos a obtener, en teoría, el mismo rendimiento de cosecha que si se usaran fertilizantes nitrogenados, y que, probablemente al inocular con las cepas 1₄ alf y 1₅ alf se podría obtener un mayor --

rendimiento en la cosecha que con la fertilización nitrogenada.

Es importante hacer notar que son justamente estas dos cepas nativas (1_4 alf y 1_5 alf) las que además de haber producido - el mayor incremento en peso seco de follaje, alcanzaron también las tasas más altas de reducción de acetileno.

Es interesante considerar que, en la localidad "La Calavera" el grado de efectividad de las cepas nativas fué estadísticamente diferente al obtenido con las cepas de la localidad "La Cieneguilla". En este sentido las cepas aisladas de la localidad "La Calavera" alcanzaron un peso seco de follaje estadísticamente inferior al obtenido con las plantas testigo fertilizadas (tabla 5.6 a, cuadro No. 5 del apéndice).

En relación al efecto de la inoculación sobre el incremento en peso de follaje entre la cepa de colección (2001-RCR) y - las plantas testigo fertilizadas no inoculadas no hubo diferencias estadísticamente significativa en el peso seco de follaje, sin embargo, las plantas inoculadas con el inoculante comercial tuvieron un peso seco de follaje estadísticamente inferior al - obtenido con las plantas testigo fertilizadas no inoculadas.

Cepas seleccionadas de Rhizobium phaseoli:

a). Reducción de acetileno.

Los resultados obtenidos de la reducción de acetileno/hora/ /planta obtenidos con las cepas aisladas de Rhizobium phaseoli, fluctuaron entre 0.007 y 1.459 μ moles de acetileno reducido/hora/planta, al comparar estos resultados con el obtenido por la cepa de colección 3644-RCR observamos que las cepas aisladas de la localidad "La Cieneguilla" el 55% de ellas (2_1 fr, 3_1 fr, 3_2 fr, 4_1 fr, 5_1 fr y 5_2 fr) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente inferior a la obtenida por la cepa testigo y - el otró 45% (1_1 fr, 2_2 fr, 6_1 fr, 6_2 fr y 6_3 fr) tuvo una reducción

de acetileno/hora/planta estadísticamente igual a la obtenida por la cepa testigo.

A diferencia de lo sucedido con las cepas de Rhizobium meliloti aisladas de la localidad "La Calavera" entre las cepas de Rhizobium phaseoli aisladas de esta localidad se encontraron algunas muy efectivas, así tenemos que el 56% de estas cepas -- (8₁fr, 9₁fr, 9₂fr, 11₁fr y 12₁fr) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente inferior a la obtenida por la cepa testigo, el 33% de las cepas (7₁fr, 8₂fr y 10₁fr) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente igual a la obtenida por la cepa testigo y el 11% de las cepas (11₂fr) tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente superior al obtenido por la cepa testigo (tabla 5.6 b, cuadro No. 2 del apéndice).

Este último resultado es muy interesante, la cepa de Rhizobium phaseoli más efectiva se aisló de la localidad "La Calavera" y no de la localidad "La Cieneguilla" como tal vez se esperaba debido a que en esta última localidad se siembra de manera regular la leguminosa homóloga, lo que podría favorecer la presencia de cepas más efectivas (Date, 1977).

El inóculo comercial tuvo una reducción de acetileno/hora/planta estadísticamente inferior a la obtenida por la cepa testigo.

b). Infectividad.

El número de nódulos formados por las cepas aisladas de Rhizobium phaseoli fluctuó entre 47 y 235 nódulos/planta en ambas localidades "La Cieneguilla" y "La Calavera". Estos datos caen dentro de la escala de resultados obtenidos por otros investigadores que han experimentado también bajo condiciones de invernadero; tal es el caso de Ferrera-Cerrato (1980) quienes -

indican haber obtenido de 3 a 411 nódulos/planta dependiendo de la especie de frijol y la cepa de rizobio utilizada.

Similarmente a lo ocurrido con las cepas de Rhizobium meliloti, para las cepas de Rhizobium phaseoli en general, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al número de nódulos formados por las cepas nativas y la cepa de colección. Solamente la cepa aislada de la localidad "La Cieneguilla" clasificada como 5₂fr, las cepas aisladas de la localidad "La Calavera" clasificadas como 9₁fr, 10₁fr y 11₁fr, además de el inoculante comercial presentaron un número de nódulos estadísticamente inferior al obtenido con la cepa testigo (tabla 5.6 b, cuadro No. 4 del apéndice).

Es importante observar que la cepa de colección clasificada como CIAT-905 formó un número muy alto de nódulos, el cual fue estadísticamente superior al número de nódulos formados con la cepa de colección escogida como testigo, sin embargo, su capacidad de reducción de acetileno no fue muy alta (0.264 μ moles de acetileno reducido/hora/planta) por lo tanto, el uso de esta cepa se recomendaría solamente si las cepas nativas fueran muy infectivas pero muy poco efectivas.

c). Peso seco de follaje.

Al comparar el peso seco del follaje de las plantas de frijol inoculadas con nuestras cepas en estudio contra el peso seco del follaje de una planta testigo fertilizada N(+) (tabla No. 6 del apéndice), observamos que el 88% de las cepas estudiadas incluyendo a la cepa de colección y al inoculante comercial, tuvieron un peso seco de follaje estadísticamente inferior al obtenido por el testigo fertilizado, y solamente a las cepas clasificadas como 6₁fr, 8₂fr y 11₂fr, les corresponde un peso seco de follaje estadísticamente igual al obtenido con el testigo -

fertilizado. De tal manera que por medio de la inoculación con estas últimas cepas se puede obtener en teoría, el mismo rendimiento de producción de cosecha que si usamos fertilizantes nitrogenados.

Aquí también se hace notar que son justamente estas tres cepas nativas (6₁fr, 8₂fr y 11₂fr) las que además de haber producido el mayor incremento en peso seco de follaje, alcanzaron a su vez, las tasas más altas de reducción de acetileno.

Finalmente, diremos que es importante subrayar la baja infectividad y efectividad que presentaron las cepas comerciales de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti.

TABLA 5.6 b EFECTIVIDAD E INEFECTIVIDAD DE LAS CEPAS DE *EMBIOSUM PHASEOLI*.

Clave de la cepa	1 _{Fr}	2 _{Fr}	3 _{Fr}	4 _{Fr}	5 _{Fr}	6 _{Fr}	7 _{Fr}	8 _{Fr}	9 _{Fr}	10 _{Fr}	11 _{Fr}	12 _{Fr}	STAT 905	3618 905	3622 905	3644 905	Comer- 905	T(+)	T(-)										
Peso seco de hoja	2	0.859*	0.517	0.800	0.764*	0.717*	0.500*	0.649	0.692	1.458	1.159*	0.909	1.000*	0.459	1.175	0.534	0.767	0.922*	0.759*	1.522	0.659*	0.884*	0.775*	1.134*	1.007*	0.509*	1.767*	0.559*	
% Proteína (g)	2	0.353	0.035	0.755	0.152	0.188	0.100	0.253	0.077	0.031	0.013	0.338	0.100	0.183	0.267	0.015	0.078	0.078	0.078	0.077	0.920	0.188	0.276	0.200	0.188	0.182	0.282	0.233	0.052
Número de noduloso/planta	2	330	78	183	116	100	48	206	69	204	369	182	226	66	85	87	171	84	123	309	281	178	151	333	29	0	0	0	0
Nódulos/planta(mg)	2	77	110	36	17	18	50	71	39	64	75	3	101	81	64	25	47	19	19	17	77	43	82	16	6	44	0	0	0
Peso seco de nódulos/planta(mg)	2	81.80	14.78	40.28	11.01	10.84	8.05	20.40	11.78	19.38	23.09	37.54	23.81	4.44	24.77	7.78	19.05	17.56	17.31	26.72	23.85	16.37	12.43	42.70	18.77	0.88	0	0	0
Índice de acumulación	2	0.296	0.085	0.275	0.278	0.274	0.093	0.188	0.137	0.215	0.295	0.211	0.554	0.094*	0.440	0.007	0.234	0.482	0.184*	1.452*	0.065*	0.264	0.264*	0.254	0.265	0.265	0.003	0	0
Índice de % fijado/nódulo	2	0.258	0.076	0.183	0.130	0.132	0.036	0.094	0.067	0.070	0.058	0.056	0.155	0.063	0.037	0.008	0.008	0.008	0.008	0.177	0.117	0.055	0.069	0.100	0.050	0.110	0.002	0	0
Índice de % fijado/nódulo/planta	2	0.059	0.014	0.093	0.093	0.071	0.007	0.063	0.038	0.112	0.145	0.104	0.175	0.028	0.145	0.002	0.078	0.161	0.061	0.486	0.022	0.068	0.068	0.118	0.187	0.001	0	0	0

*diferencias significativas contra el cepo de colección testigo (3644-905)

*diferencias significativas contra el testigo fertilizado

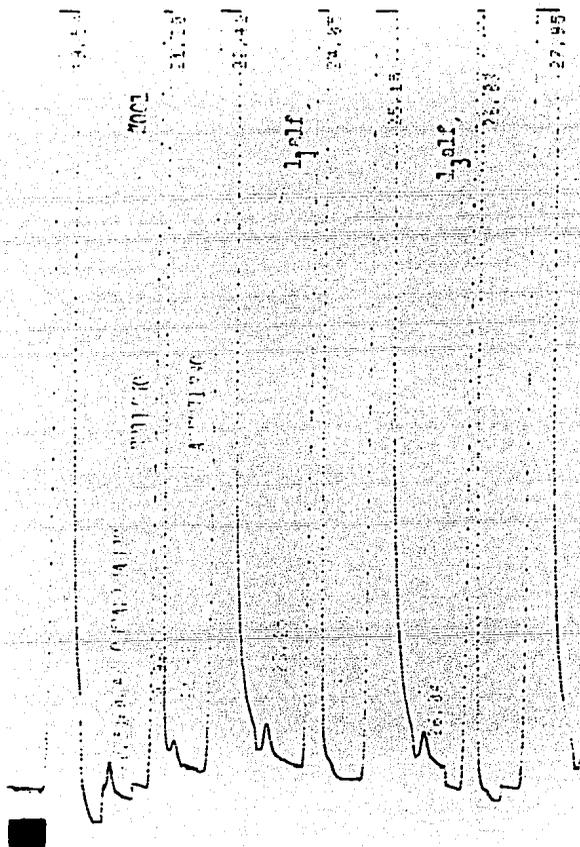
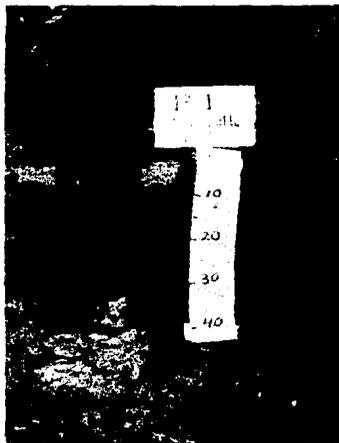




FOTO No. 2
PERFIL DE SUELO
TOMADO EN LA LOCALIDAD
"LA CALAVERA".

FOTO No. 3
PERFIL DE SUELO
TOMADO EN LA LOCALIDAD
"LA CIENEGUILLA".



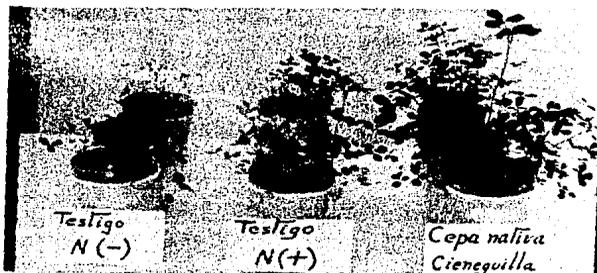


FOTO N^o. 4

PLANTAS DE ALFALFA: SIN FERTILIZAR, FERTILIZADAS CON KNO_3 E INOCULADAS CON UNA CEPA NATIVA EFECTIVA DE Rhizobium meliloti.

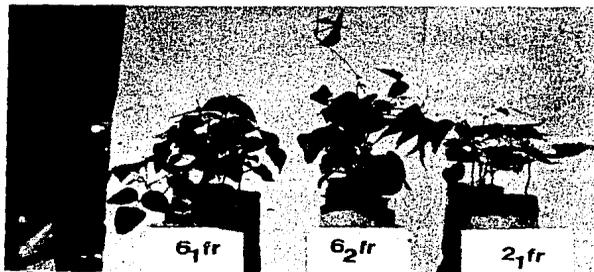


FOTO No. 5

PLANTAS DE FRIJOL QUE MUESTRAN LOS DISTINTOS GRADOS DE EFECTIVIDAD DE LAS CEPAS NATIVAS DE Rhizobium phaseoli CON QUE FUERON INOCULADAS.

6. Conclusiones.

1.- Del estudio edafológico realizado en las dos localidades objeto de estudio, se concluye lo siguiente:

a). Los suelos de la localidad "La Cieneguilla", clasificados como Planosoles y Regosoles eútricos, Feozems háplicos, - Fluvisoles y Cambisoles, que actualmente tienen, principalmente, un uso agrícola, presentan como riesgos naturales e inducidos - los siguientes: erosión hídrica laminar, compactación y degradación física y, en menor grado, inundación en épocas de lluvia. En esta localidad, los suelos varían de someros a profundos, de texturas medias a moderadamente gruesas que les confiere porosidad y drenaje adecuado, no obstante existen riesgos de encostramiento y compactación. Se hace notar además que por su contenido en sodio existe en estos suelos un riesgo potencial a la sodificación. La mayoría de estos suelos denotó deficiencias en Ca^{++} y una gran pobreza en fósforo.

b). En la localidad de "La Calavera" los suelos se encuentran representados por una asociación de Planosoles eútricos, - Feozems háplicos y Litosoles muy someros y degradados. En estos suelos la pendiente y la erosión hídrica constituyen las -- principales causas de su degradación. En términos generales, - las características físicas y químicas de estos suelos coinciden con las propiedades de los suelos de la localidad anterior, siendo notorias su deficiencia en Ca^{++} y su pobreza en fósforo.

2.- Por lo anterior, se concluye que en las dos localidades estudiadas son importantes los problemas de degradación física, química y biológica de sus suelos. Gran parte de esos -- problemas, se originan por causas naturales entre las cuales -

la erosión hídrica, condicionada por el relieve, y el encostramiento relacionado a su composición textural son los más importantes. No obstante, la degradación de estos suelos se debe -- también a causas humanas, debidas principalmente al mal manejo de los suelos entre los que sobresale el pastoreo, principal responsable de la compactación de los suelos.

3.- Del estudio microbiológico, enfocado hacia la cuantificación de Rhizobium phaseoli y Rhizobium meliloti; en los suelos de ambas localidades, se concluye lo siguiente:

A). No obstante que estas dos bacterias se pudieron detectar en todas las muestras de suelo, Rhizobium phaseoli resultó ser la más abundante, probablemente por ser una bacteria asociada a una leguminosa nativa de México. Sin embargo, los conteos más elevados de ambas bacterias corresponden en todos los casos, a los suelos de la localidad "La Cieneguilla", tradicionalmente agrícolas en los cuales se siembran, de manera regular, las leguminosas homólogas a estas bacterias.

B). En relación al aislamiento y selección de cepas nativas, se concluye que, con respecto a Rhizobium phaseoli, se pudieron detectar cepas infectivas y efectivas en ambas localidades, lo que se relaciona con el hecho de ser una bacteria estrechamente ligada al frijol nativo en México. Esto no ocurrió -- con Rhizobium meliloti, ya que en este caso las cepas efectivas aisladas corresponden, casi en un 100%, a los suelos de la localidad "La Cieneguilla", cuyos suelos se han dedicado tradicionalmente al cultivo de la alfalfa.

C). La efectividad de las cepas estimada por la técnica de la reducción de acetileno indicó, con respecto a Rhizobium phaseoli, que las cepas más efectivas alcanzaron niveles similares o superiores a las cepas de colección de efectividad conoci

da y superiores a las del inoculante comercial probado. Además, con respecto a su rendimiento, las plantas inoculadas con las cepas más efectivas igualaron en su rendimiento a las plantas de los tratamientos no inoculados y fertilizados químicamente.

Con respecto a Rhizobium meliloti la efectividad de aproximadamente la mitad de las cepas aisladas de la localidad "La Cieneguilla" resultó igual (38%) o superior (8%) al alcanzado por las cepas de colección y superior, en su totalidad, a la efectividad obtenida con el inoculante comercial. Se hace notar, además, que las plantas inoculadas con las cepas más efectivas aisladas alcanzaron niveles de biomasa superiores al de las plantas fertilizadas químicamente.

Las poblaciones relativamente bajas de las cepas nativas tanto de Rhizobium phaseoli como de Rhizobium meliloti, y la presencia en ellas de cepas inefectivas nos indican las necesidades de inoculación. La alta efectividad mostrada por algunas de las cepas nativas aisladas, sumada al hecho de que precisamente por ser cepas nativas de las localidades en estudio no presentan problemas de adaptación a las condiciones ambientales que en ellas prevalecen, sugiere que estas cepas son las más apropiadas para ser utilizadas como inoculantes en esta región.

4.- Es importante hacer notar que con este trabajo se dan las bases para la realización de las investigaciones en campo sobre el uso más adecuado de los inoculantes para alcanzar mejores rendimientos y el mejoramiento de los suelos a través del uso de la fijación biológica del nitrógeno en estas localidades.

RECOMENDACIONES:

1. Tomar las medidas necesarias para detener los procesos de degradación del suelo según las condiciones de cada localidad, considerándose que:

a). Los suelos de la localidad "La Calavera" no son recomendables para uso agrícola ni prático, ya que el relieve y su condición de suelos someros y erosionados constituyen las causas principales de su degradación. Es por tanto, recomendable la reforestación con especies perennes nativas de la región que sirvan de cobertura y que permitan su recuperación.

b). Que los suelos de la localidad "La Cieneguilla", los más aptos para la agricultura, de estas dos localidades, se les dé un uso más racional, evitando el sobrepastoreo y fomentando especies forrajeras semiperennes como la alfalfa con la cual, además de disminuir el excesivo manejo mecánico del suelo resulta una excelente mejoradora y regeneradora de los suelos.

2. Es recomendable además, que la inoculación de estas dos leguminosas, alfalfa y frijol, que constituyen cultivos importantes en la región, se lleve a cabo utilizando las mejores cepas aisladas de la región.

3. Considerar que el éxito en la experimentación de campo dependerá del equilibrio entre las plantas, las bacterias y los niveles adecuados de nutrientes, por lo tanto, es necesario tomar las medidas necesarias para amortiguar las deficiencias en calcio y fósforo que tuvieron los suelos con el fin de obtener el máximo provecho de los inoculantes.

Glosario.

- Aluvión:** Arena, arcilla, limos y otros sedimentos depositados sobre la tierra por las corrientes.
- Arenisca:** Roca sedimentaria continental o marina, de textura de grano grueso.
- Cambisol:** Suelo recientemente constituido, en el cual la alteración química y biológica predominan sobre la disgregación física.
- Conglomerado:** Conjunto heterogéneo de rocas ocasionalmente cementadas.
- Erosión hídrica laminar:** Es un proceso de degradación y pérdida de suelo por efecto de agua que escurre en su superficie.
- Erosión hídrica en cárcavas:** Es una forma grave de erosión producida por grandes volúmenes de aguas encausadas.
- Eútrico:** Suelo rico en bases.
- Fase dúrica:** Suelo cementado por sílice, impermeable al agua, - al aire y a las raíces.
- Fase lítica somera:** Es cualquier roca dura, continua y coherente que se localiza dentro de los primeros 50 cm. de profundidad en un suelo.
- Feozem háptico:** Suelo con aptitud agrícola, de color oscuro, - rico en materia orgánica y bases intercambiables, donde generalmente predomina el ión Ca^{++} .
- Fluvisol:** Cualquier suelo aluvial reciente.

- Horizonte A mólico: Horizonte de color oscuro, rico en materia orgánica y en bases (principalmente Ca^{++}).
- Horizonte A ócrico: Horizonte de color claro, con bajos porcentajes de materia orgánica y moderado contenido en bases intercambiables (menos de 250 ppm de P_2O_5).
- Horizonte B cámbico: Horizonte de alteración y acumulación de bases, arcillas y óxidos e hidróxidos de fierro y aluminio.
- Horizonte E álbico: Horizonte de color muy claro, pobre en materia orgánica, arcilla y bases, constituido por efecto de un lavado intenso en el suelo.
- Horizonte húmico: Cualquier horizonte superficial con más de 1% de carbono.
- Horizonte úmbrico: Horizonte de color oscuro, rico en materia orgánica pero pobre en bases, generalmente ácido.
- Litosol: Suelo somero (menos de 10 cm. de espesor) que sobreyace a una roca.
- Planosol: Suelo degradado por uso agrícola y mal manejo, se caracteriza principalmente por la presencia de un horizonte de lavado de bases alcalino y alcalinotérreas.
- Regosol: Suelo mineral, originado principalmente por la desagregación mecánica de una roca, normalmente se caracteriza por una textura gruesa (arenosa) y su falta de estructura (grano suelto).
- Roca riolítica: Roca rica en SiO_2 (más de 65%), de origen ígneo (volcánico).

Suelos Ilíticos: Suelos donde predominan las arcillas ilitas.

Suelos de origen aluvial: Son suelos recientes (menos de 20,000 años) constituidos por el transporte y depósito de materiales en suspensión.

Apéndice.

CUADRO No. 1

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 CANTIDAD DE ACETILENO REDUCIDO POR LAS CEPAS DE Rhizobium meliloti
 EN Micromoles/hora/planta.

Cepas confrontadas contra la cepa testigo (2001)	v_o Valor* calculado	C Valor de Tablas	$v_o < C < v_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ alf	1.565	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₂ alf	10.055	7.710	$v_o > C$	Significativa
1 ₃ alf	0.206	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₄ alf	8.280	7.710	$v_o > C$	Significativa
1 ₅ alf	6.124	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₁ alf	11.592	7.710	$v_o > C$	Significativa
2 ₂ alf	3.886	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₃ alf	13.028	7.710	$v_o > C$	Significativa
3 ₁ alf	9.436	7.710	$v_o > C$	Significativa
4 ₁ alf	15.138	7.710	$v_o > C$	Significativa
4 ₂ alf	14.668	7.710	$v_o > C$	Significativa
5 ₁ alf	0.293	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₁ alf	10.062	7.710	$v_o > C$	Significativa
9 ₁ alf	10.131	7.710	$v_o > C$	Significativa
9 ₂ alf	11.123	7.710	$v_o > C$	Significativa
10 ₁ alf	14.356	7.710	$v_o > C$	Significativa
12 ₁ alf	10.993	7.710	$v_o > C$	Significativa
Comercial	14.504	7.710	$v_o > C$	Significativa

*Se realizó como prueba estadística un análisis de varianza para datos completamente al azar.

CUADRO No. 2

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 CANTIDAD DE ACETILENO REDUCIDO POR LAS CEPAS DE Rhizobium phaseoli
 EN Micromoles/hora/planta.

Cepas confrontadas contra la cepa testigo (3644-RGR)	v_o Valor* calculado	C Valor de Tablas	$v_o < C < v_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ fr	3.318	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₁ fr	45.671	7.710	$v_o > C$	Significativa
2 ₂ fr	6.205	7.710	$v_o < C$	No significativa
3 ₁ fr	8.285	7.710	$v_o > C$	Significativa
3 ₂ fr	16.072	7.710	$v_o > C$	Significativa
4 ₁ fr	65.005	7.710	$v_o > C$	Significativa
5 ₁ fr	19.851	7.710	$v_o > C$	Significativa
5 ₂ fr	41.732	7.710	$v_o > C$	Significativa
6 ₁ fr	0.363	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₂ fr	0.073	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₃ fr	2.604	7.710	$v_o < C$	No significativa
7 ₁ fr	0.117	7.710	$v_o < C$	No significativa
8 ₁ fr	41.581	7.710	$v_o > C$	Significativa
8 ₂ fr	0.106	7.710	$v_o < C$	No significativa
9 ₁ fr	75.067	7.710	$v_o > C$	Significativa
9 ₂ fr	24.770	7.710	$v_o > C$	Significativa
10 ₁ fr	0.098	7.710	$v_o < C$	No significativa
11 ₁ fr	8.379	7.710	$v_o > C$	Significativa
11 ₂ fr	8.832	7.710	$v_o > C$	Significativa
12 ₁ fr	48.492	7.710	$v_o > C$	Significativa
Comercial	77.830	7.710	$v_o > C$	Significativa
CIAT-905	3.142	7.710	$v_o < C$	No significativa
3618-RGR	12.090	7.710	$v_o > C$	Significativa
3622-RGR	1.684	7.710	$v_o < C$	No significativa

CUADRO No. 3

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 NUMERO DE NODULOS FORMADOS POR LAS CEPAS DE Rhizobium meliloti.

Cepas confrontadas contra la cepa testigo (2001)	v_o Valor* calculado	C Valor de Tablas	$v_o < C < v_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ alf	2.485	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₂ alf	5.133	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₃ alf	0.097	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₄ alf	0.002	7.710	$v_o < C$	No significativa
1 ₅ alf	0.957	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₁ alf	0.151	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₂ alf	0.039	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₃ alf	0.131	7.710	$v_o < C$	No significativa
3 ₁ alf	4.428	7.710	$v_o < C$	No significativa
4 ₁ alf	0.910	7.710	$v_o < C$	No significativa
4 ₂ alf	3.665	7.710	$v_o < C$	No significativa
5 ₁ alf	0.021	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₁ alf	0.638	7.710	$v_o < C$	No significativa
9 ₁ alf	1.247	7.710	$v_o < C$	No significativa
9 ₂ alf	0.058	7.710	$v_o < C$	No significativa
10 ₁ alf	0.287	7.710	$v_o < C$	No significativa
12 ₁ alf	0.651	7.710	$v_o < C$	No significativa
Comercial	0.231	7.710	$v_o < C$	No significativa

CUADRO No. 4

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 NUMERO DE NODULOS FORMADOS POR LAS CEPAS DE Rhizobium phaseoli.

Cepas confrontadas contra la cepa testigo (3644-RCR)	v_o Valor* calculado	C Valor de Tablas	$v_o < C < v_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ fr	5.416	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₁ fr	0.693	7.710	$v_o < C$	No significativa
2 ₂ fr	0.871	7.710	$v_o < C$	No significativa
3 ₁ fr	2.125	7.710	$v_o < C$	No significativa
3 ₂ fr	5.291	7.710	$v_o < C$	No significativa
4 ₁ fr	6.438	7.710	$v_o < C$	No significativa
5 ₁ fr	3.388	7.710	$v_o < C$	No significativa
5 ₂ fr	12.469	7.710	$v_o > C$	Significativa
6 ₁ fr	3.873	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₂ fr	0.430	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₃ fr	2.720	7.710	$v_o < C$	No significativa
7 ₁ fr	2.555	7.710	$v_o < C$	No significativa
8 ₁ fr	3.452	7.710	$v_o < C$	No significativa
8 ₂ fr	1.529	7.710	$v_o < C$	No significativa
9 ₁ fr	34.055	7.710	$v_o > C$	Significativa
9 ₂ fr	2.129	7.710	$v_o < C$	No significativa
10 ₁ fr	8.567	7.710	$v_o > C$	Significativa
11 ₁ fr	17.483	7.710	$v_o > C$	Significativa
11 ₂ fr	0.639	7.710	$v_o < C$	No significativa
12 ₁ fr	0.401	7.710	$v_o < C$	No significativa
Comercial	16.363	7.710	$v_o > C$	Significativa
CIAT-905	40.320	7.710	$v_o > C$	Significativa
3618-RCR	0.939	7.710	$v_o < C$	No significativa
3622-RCR	4.145	7.710	$v_o < C$	No significativa

CUADRO No. 5

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 PESO SECO DE FOLLAJE DE LAS PLANTAS INOCULADAS CON LAS CEPAS
 DE Rhizobium meliloti.

Plantas inoculadas con las sig cepas confron- tadas vs testigo fer- tilizado no-inoculado	V_o Valor* calculado	C Valor de Tablas	$V_o < C < V_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ alf	0.914	7.710	$V_o < C$	No significativa
1 ₂ alf	6.174	7.710	$V_o < C$	No significativa
1 ₃ alf	0.304	7.710	$V_o < C$	No significativa
1 ₄ alf	19.631	7.710	$V_o > C$	Significativa
1 ₅ alf	15.273	7.710	$V_o > C$	Significativa
2 ₁ alf	17.806	7.710	$V_o > C$	Significativa
2 ₂ alf	2.144	7.710	$V_o < C$	No significativa
2 ₃ alf	21.644	7.710	$V_o > C$	Significativa
3 ₁ alf	8.841	7.710	$V_o > C$	Significativa
4 ₁ alf	23.039	7.710	$V_o > C$	Significativa
4 ₂ alf	23.262	7.710	$V_o > C$	Significativa
5 ₁ alf	3.430	7.710	$V_o < C$	No significativa
6 ₁ alf	6.596	7.710	$V_o < C$	No significativa
9 ₁ alf	7.804	7.710	$V_o > C$	Significativa
9 ₂ alf	11.891	7.710	$V_o > C$	Significativa
10 ₁ alf	19.400	7.710	$V_o > C$	Significativa
12 ₁ alf	13.574	7.710	$V_o > C$	Significativa
2001	0.339	7.710	$V_o < C$	No significativa
Comercial	22.611	7.710	$V_o > C$	Significativa
Testigo (-)	53.737	7.710	$V_o > C$	Significativa

CUADRO No. 6

PRUEBA ESTADISTICA DE ANALISIS DE VARIANZA ($\alpha = 0.05$).
 PESO SECO DE FOLLAJE DE LAS PLANTAS INOCULADAS CON LAS CEPAS
 DE Rhizobium phaseoli.

Plantas inoculadas con las sig. cepas confrontadas vs testigo fertilizado no-inoculado	v_o Valor calculado	C Valor de Tablas	$v_o < C < v_o$ Comparación	Diferencia
1 ₁ fr	12.775	7.710	$v_o > C$	Significativa
2 ₁ fr	86.538	7.710	$v_o > C$	Significativa
2 ₂ fr	23.690	7.710	$v_o > C$	Significativa
3 ₁ fr	36.642	7.710	$v_o > C$	Significativa
3 ₂ fr	37.093	7.710	$v_o > C$	Significativa
4 ₁ fr	75.257	7.710	$v_o > C$	Significativa
5 ₁ fr	32.637	7.710	$v_o > C$	Significativa
5 ₂ fr	57.983	7.710	$v_o > C$	Significativa
6 ₁ fr	2.658	7.710	$v_o < C$	No significativa
6 ₂ fr	20.496	7.710	$v_o > C$	Significativa
6 ₃ fr	24.111	7.710	$v_o > C$	Significativa
7 ₁ fr	27.570	7.710	$v_o > C$	Significativa
8 ₁ fr	74.244	7.710	$v_o > C$	Significativa
8 ₂ fr	6.037	7.710	$v_o < C$	No significativa
9 ₁ fr	41.506	7.710	$v_o > C$	Significativa
9 ₂ fr	52.364	7.710	$v_o > C$	Significativa
10 ₁ fr	18.402	7.710	$v_o > C$	Significativa
11 ₁ fr	51.014	7.710	$v_o > C$	Significativa
11 ₂ fr	0.002	7.710	$v_o < C$	No significativa
12 ₁ fr	52.803	7.710	$v_o > C$	Significativa
CIAT-905	18.035	7.710	$v_o > C$	Significativa
3618-RCR	31.399	7.710	$v_o > C$	Significativa
3622-RCR	13.495	7.710	$v_o > C$	Significativa
3644-RCR	23.261	7.710	$v_o > C$	Significativa
Comercial	45.330	7.710	$v_o > C$	Significativa
Testigo(+) vs Testigo(-)	77.298	7.710	$v_o > C$	Significativa

7. Bibliografía.

- 1.- Ahmed, S. and Evans, H. J. 1960.
Cobalt: a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions.
Soil Sci. 90. pp. 205-210.
- 2.- Alexander, M. 1977.
Ecology of nitrogen-fixing organisms, pp. 99-114.
In A. Ayanaba and P. J. Dart (eds.),
Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Wiley, New York.
- 3.- Allen, O. N. and Allen, E. K. 1981.
The leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation.
Ed. Mc Millan. Wisconsin, U.S.A.
- 4.- Amarger, N. 1975.
Competition between strains of rhizobia for nodule formation; selection of competitive strains. In Fifth American Rhizobium Conference, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- 5.- Amarger, N. 1981.
Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of Rhizobium meliloti.
Soil Biol. Biochem. 13. pp. 475-480.
- 6.- Amarger, N. 1981.
Selection of Rhizobium strains on their competitive ability for nodulation.
Soil Biol. Biochem. 13. pp. 481-486.
- 7.- Am. Soc. for Test and Mat. 1958.
Procedures for testing soils.
Am. Soc. Testing Mater, Philadelphia.

- 8.- Anderson, A. J. and Spencer, D. 1950.
Sulphur in nitrogen metabolism of legumes and non-legumes.
Aust. J. Sci. Res. 3. pp 431-439.
- 9.- Association of Official Agricultural Chemist (AOAC). 1970.
Official methods of analysis.
Washington, D.C. Broad, William and Herwats.
- 10.- Ayanaba, A. 1977.
Toward better use of inoculants in the humid tropics.
Pp. 181-187. In A. Ayanaba and P.J. Dart (eds.),
Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the
tropics. Wiley, New York.
- 11.- Banath, C. L., Greenwood, E. A. N. and Loneragan, J. F. 1966.
Effect of calcium deficiency on symbiotic fixation.
Pl. Physiol. 41. pp. 760-763.
- 12.- Barber, L. 1982.
Rhizobium meliloti distribution in the soil following
alfalfa inoculation.
Plant and Soil 64(3). pp. 363-368.
- 13.- Barnes, D. K., Vance, C. P. and Heichel, G. H. 1979.
Seed coating and nodulation effectiveness in alfalfa.
In Pro 9th Annual Alfalfa Symp., Univ. of Illinois and the
Certified Alfalfa Seed Council. 13-14. March, 1979. Peoria.
- 14.- Bat-Sheva. 1982.
Nitrogen Fixation its current relevance and future potential.
Isr. J. B. T. 31(1-4). pp. 5-44.
- 15.- Berlijn, J. D. y Bernardon, A. E. 1982.
Cultivos forrajeros (manuales para la educación agropecua-
ria). Ed. Trillas, México.
- 16.- Bethenfalvay, G. L. and Yader, J. F. 1981.
The Glycine-Glomus-Rhizobium symbiosis. I.
Phosphorus effect on nitrogen fixation and mycorrhizal
infection.
Physiol. Plant 52(1). pp. 141-145.

- 17.- Bouyoucos, G. J. 1963.
Directions for making mechanical analysis of soil by hydrometer method.
Soil Sci. 42. pp. 25-30.
- 18.- Bowen, G. D., and Kennedy, M. M. 1959.
Effect of high soil temperatures on Rhizobium spp.
Qd. J. Agric. Sci. 16. pp.177-197.
- 19.- Bray, H. H. and Kurtz, T. L. 1945.
The determination of total organic and available forms or phosphorus in soils.
Soil Sci. 59. pp. 439-445
- 20.- Brill, J. W. 1981.
Fijación Biológica de Nitrógeno.
- 21.- Brock, Thomas D. 1982.
Biología de los Microorganismos.
Ed. Omega. Barcelona, España.
- 22.- Bromfield, E. S. P. and Jones, G. D. 1980.
The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of Rhizobium trifolii.
Ann. Appl. Biol. 91. pp. 211-219.
- 23.- Bruch, C. W. and Allen, O. N. 1957.
Host specificity of four Lotus bacteriophages.
Can. J. Microbiol. 3. pp. 181-189.
- 24.- Bryan, O. C. 1923.
Effect of acid soils on nodule-forming bacteria.
Soil Sci. 15. pp. 37-40.
- 25.- Buller, R. E. 1977.
La producción de alfalfa; variedades, siembra y utilización forrajera en México.
S. A. G. Folleto de divulgación. México.

- 26.- Buller, R. E. 1979.
Adaptación de zacates y leguminosas para forraje,
conservación y mejoramiento del suelo en México.
Oficina de Estudios Especiales.
Folleto de divulgación. México.
- 27.- Burger, A. y Raw, P. 1971.
Biología de suelo. Aspectos microbiológicos,
botánicos y zoológicos.
Editorial Omega, S. A. Barcelona, España.
- 28.- Burris, R. H., Eppling, F. J., Wahlin, H. B.
and Wilson, P. W. 1943.
Detection of nitrogen fixation with isotopic nitrogen.
J. Biol. Chem. 148. pp. 349-357.
- 29.- Carpenter, P. L. 1979.
Microbiología.
Nueva Editorial Interamericana.
México.
- 30.- CETENAL. 1973.
Cartas de Uso de Suelos. Uso potencial, edafológica,
geológica y topográfica.
Lagos de Moreno, Jalisco.
- 31.- Chapman, D. H., Parker, F. P. 1981.
Métodos de Análisis para Suelos, Plantas y Aguas.
Editorial Trillas. México.
- 32.- Chatel, D. L. and Parker, C. A. 1972.
Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts.
Soil. Biol. Biochem. 4. pp. 289-294.
- 33.- Chen, M. and Alexander, M. 1971.
Resistance of soil microorganisms to starvation.
Soil Biol. Biochem. 4. pp. 283-288.
- 34.- Damirgi, S. M. and Johnson, H. W. 1966.
Effect of soil actinomycetes on strains of
Rhizobium japonicum.
Agron. J. 58. pp. 223-224.

- 35.- Danso , S. K. S. 1977.
The ecology of Rhizobium and recent advances in the study of the ecology of Rhizobium. Pp. 115-125. In A. Ayanaba, and P. J. Dart (eds.), Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Wiley, New York.
- 36.- Danso, S. K. A. and Alexander, M. 1974.
The survival of two strains of Rhizobium in soil. Proc. Soil Sci. Am. 38. pp. 86-89.
- 37.- Danso, S. K. A. and Alexander, M. 1975.
Regulations of predation by prey density: the protozoan-Rhizobium relationship. Appl. Microbiol. 29. pp. 515-521.
- 38.- Danso, S. K. A., Habte, M. and Alexander, M. 1973.
Estimating the density of individual bacterial populations introduced into natural ecosystems. Can. J. Microbiol. 19. pp. 1450-1451.
- 39.- Danso, S. K. A., Keya, S. O. and Alexander, M. 1975.
Protozoa and the decline of Rhizobium populations added to soil. Can. J. Microbiol. 21. pp. 884-895.
- 40.- Dart, P. J., Day, J. M. and Harris, D. 1972.
Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction, pp. 85-100. In Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. International Atomic Agency Technical Report. 149.
- 41.- Dart, P. J. and Wildson, D. C. 1970.
Nodulation and nitrogen fixation by Vigna sinensis and Vicia atropurpurea: the influence of concentration, form and site of application of combined nitrogen. Aust. J. Agric. Res. 21. pp. 45-56.
- 42.- Date, R. A. 1976.
Principles of Rhizobium strain selection. pp. 137-148. In P. S. Nutman (ed.), simbiotic nitrogen fixation in plants.

- 43.- Date, R. A. 1977.
The development and use of legume inoculants. pp. 169-180.
In A. Ayanaba and P. J. Dart (eds.), Biological nitrogen
fixation in farming systems of the tropics.
Wiley, New York.
- 44.- David, B. y Parsons, M. 1981.
Frijol y chícharo.
Manuales para educación agropecuaria.
Ed. Trillas, México.
- 45.- De Carvalho, M.M., Edwards, D. G., Asher, C. J. and
Andrew, C. S. 1982.
Effects of aluminium on nodulation of two
Stylosanthes species grown in nutrient solution.
Plant and Soil 64(2). pp. 141-152.
- 46.- de Mooy, C. J. and Pesek, J. 1966.
Nodulation responses of soybean to added phosphorus,
potassium and calcium salts.
Agron. J. 58. pp. 275-280.
- 47.- de Mooy, C. J., Pesek, J. and Spaldon, E. 1973.
Mineral nutrition. In Soybeans; improvement, production
and uses, edited by B. E. Caldwell, Agronomy 16, 267-325.
American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- 48.- Demeterio, J. L., Ellis, R. and Paulsen, G. M. 1972.
Nodulation and nitrogen fixation by two soybean
varieties as affected by phosphorus and zinc nutrition.
Agron. J. 64. pp. 566-568.
- 49.- Dilworth, M. J. 1966.
Acetylene reduction by nitrogen-fixing
preparations from Clostridium pasteurianum.
Biochem. Biophys. Acta 127. pp. 285-294.
- 50.- Döbereiner, J. 1966.
Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen
fixation of beans Phaseolus vulgaris L. in acid soils.
Pl. Soil 24. pp. 153-166.

- 51.- Dudman, W. P. and Brockwell, J. 1968.
Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. I. A. survey of field performance of clover inoculants by gel immunodiffusion serology. Aust. J. Agric. Res. 19. pp. 739-747.
- 52.- Duke, J. A. 1981.
Handbook of leguminosas world, economic importance. Ed. Plenum. New York, U.S.A.
- 53.- Duke, S. H., Collins, M. and Soberalske, R. M. 1980.
Effects of potassium fertilization on nitrogen fixation and nodule enzymes of nitrogen metabolism in alfalfa. Crop Sci. 20(2). pp. 213-219.
- 54.- Edwards, D. G. 1977.
Nutritional factors limiting nitrogen fixed by rhizobia. pp. 189-204. In A. Ayanaba, and P. J. Dart (eds.), Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Wiley, New York.
- 55.- FAO-UNESCO. 1970.
Clasificación de las unidades de suelos: FAO, Roma. V. 33. p. 37.
- 56.- FAO. 1985.
Inoculantes para leguminosas y su uso. Impreso en Italia.
- 57.- Fassbender, H. W. 1975.
Química de suelos, con énfasis en suelos de America Latina. Ed. Ilca. Turrialba, Costarrica.
- 58.- Ferrera-Cerrato, R. 1980.
Inoculación de Rhizobium phaseoli a diferentes especies del género Phaseolus originarias de México. Rev. Lat. de Microbiología. 22. pp. 175-180.
- 59.- Fletcher, H. P. and Kurtz, L. T. 1964.
Differential effects of phosphorus fertility on soybean varieties. Proc. Soil Sci. Soc. Am. 28. pp. 225-228.

- 60.- Foulds, W. 1971.
Effect of growth on three species of *Rhizobium*.
Pl. Soil 35. pp. 665-667.
- 61.- 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. pp. 27-48.
- 62.- Fried, M. and Broeshart, H. 1975.
An independent measurement of the amount
of nitrogen fixed by a legume crop.
Pl. Soil 43. pp. 707-711.
- 63.- Garcia de Miranda E. 1973.
Modificaciones al sistema de clasificación climática
de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la
República Mexicana). México. pp. 245.
- 64.- Geogle, V. W., Hohenberg, J. S. Righet, T. L.
and Lauter, D. L. 1981.
Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair
interaction, nodulation and growth of soybean.
Can. J. Plant Sci. 61(2). pp. 231-239.
- 65.- Goldsworthy, P. R. and Heathcote, R. 1964.
Fertilizer trials with soyabeans in northern Nigeria.
Emp. J. Exp. Agric. 32. pp. 257-262.
- 66.- Greenwood, E. A. N. and Hallsworth, E. G. 1960.
Studies on the nutrition of forage legumes. II. Some
interactions of calcium, phosphorus, copper and molyb-
denum on the growth and chemical composition of *Trifolium*
subterraneum L.
Pl. Soil 12. pp. 97-127.
- 67.- Hallsworth, E. G., Greenwood, E. A. N. and
Yates, M. G. 1964.
Studies on the nutrition of forage legumes. III. The
effect of copper on nodulation of *Trifolium* subterraneum
L. and *Trifolium* repens.
Pl. Soil 20. pp. 17-33.

- 68.- Hardarson, G., Heichel, G. H., Vance, C. P. and Barnes, D. K. 1980.
Evaluation of alfalfa and Rhizobium meliloti for compatibility in nodulation and nodule effectiveness. Appl. Environ. Microbiol. 45(6). pp. 1790-1794.
- 69.- Hardy, R. W. F., Burns, R. C. and Holsten, R. D. 1973.
Applications of the acetylene-etylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5. pp. 47-81.
- 70.- Hernández, Mercedes, Chávez, Adolfo y Bourges, Héctor. 1983.
Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Tablas de uso práctico. Instituto Nacional de la Nutrición. México.
- 71.- Hitchner, E. R. 1930.
The isolation of bacteriolytic principle from the root of nodule of red clover. J. Bacteriol. 19. pp. 191-201.
- 72.- Holding, A. J. and Lowe J. F. 1971.
Some effects of acidity and heavy metals on the Rhizobium-leguminous plant association. Pl. Soil 3. pp. 153-166.
- 73.- Infante, M. y Pinchina, A. 1978.
Situación del cultivo de frijol en América Latina. C. I. A. T. Folleto de divulgación. Cali, Colombia.
- 74.- Ireland, J. A. and Vincent, J. M. 1968.
A quantitative study of competition for nodule formation. IXth Internacional Congress of Soil Science Transactions 2. pp. 85-93.
- 75.- Jackson, M. L. 1964.
Soil Chemical Analysis. Prentice Hall, Inc. Ed. Omega, Barcelona. Madison Wisconsin. pp. 647.

- 76.- Johnson, H. W., Means, U. M. and Weber, C. R. 1965.
Competition for nodule sites between strains of Rhizobium japonicum applied as inoculum and strains in the soil.
Agron. J. 57. pp. 179-185.
- 77.- Johnston, A. W. B. and Beringer, J. E. 1976.
Mixed inoculations with effective and ineffective strains Rhizobium leguminosarum.
Journal of Applied Bacteriology 40. pp. 375-380.
- 78.- Jones, G. D. 1966.
The contribution of white clover to a mixed upland sward II. Factors affecting the density and effectiveness of Rhizobium trifolii.
Pl. Soil 24. pp. 250-259.
- 79.- Juscafresa, B. 1980.
Forrajes, fertilizantes y valor nutritivo.
Ed. Aedos, España.
- 80.- Kang, B. T. and Fox, R. L. 1975.
Influence of soil fertility on the protein and sulfur contents of grain legumes. In Proceedings collaborators meeting grain legume improvement, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- 81.- Keya, S. O. and Alexander, M. 1975.
Regulation of parasitism by host density: the Bdellovibrio-Rhizobium interrelationship.
Soil Biol. Biochem. 7, pp. 231-237.
- 82.- Koch, B. and Evans, H. J. 1966
Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules.
Plant Physiol. 41, pp. 1748.
- 83.- Labandera, C. A. and Vincent, J. M. 1975.
Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of Rhizobium trifolii.
Plant and Soil 42, pp. 327-347.

- 84.- Lluch, C., Gómez, M. and Olivares, J. 1982.
The effect of the fertilization leguminous plants with sulphur on ethylene production by roots and Rhizobium nodulation.
Agrochimica 26(1), pp. 79-86.
- 85.- Loneragan, J. F. 1959.
Calcium in the nitrogen metabolism of subterranean clover.
Aust. J. Biol. Sci. 12, pp. 26-39.
- 86.- Loneragan, J. F. and Dowling, E. J. 1958.
The interaction of calcium and hydrogen ions in the nodulation of subterranean clover.
Aust. J. Agric. Res. 9, pp. 464-472.
- 87.- Lowther, W. L. and Loneragan, J. F. 1968.
Calcium and nodulation in subterranean clover (Trifolium subterraneum L.).
Pl. Physiol. 43, pp. 1362-1366,
- 88.- Luse, R. L., Kang, B. T., Fox, R. L. and Nangju, D. 1975.
Protein quality in grain legumes grown in the lowland humid tropics, with special reference to West Africa. In fertilizer use and protein production. XIth Colloquium International Potash Institute, Bornholm, Denmark.
- 89.- Marques Pinto, C., Yao, P. Y. and Vincent, J. M. 1974.
Nodulating competitiveness amongst strains of Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii.
Australian Journal of Agricultural Research 25, pp. 317-329.
- 90.- Marshall, K. C. 1956.
A lysogenic strain of Rhizobium trifolii.
Nature (London). 177, pp. 92.
- 91.- Marshall, K. C., Mulcahy, M. J. and Chowdhury, M. S. 1963.
Second year clover mortality in Western Australia—a microbiological problem.
J. Aust. Inst. Agric. Sci. 29, pp. 160-164.
- 92.- Marshall K. C. and Roberts, F. J. 1963.
Influence of fine particle materials on survival

of Rhizobium trifolii in sandy soil.
Nature (London) 198, pp. 410-411.

- 93.- Marshall, K. C. and Vincent, J. M. 1954.
Relationship between the somatic antigens of Rhizobium trifolii and susceptibility to bacteriophage.
Aust. J. Sci. 17, pp. 68-69.
- 94.- Mc Clellan, W. D. 1975.
Alfalfa: effects of seeding rates and Rhizobium inoculations.
California Agriculture 29, p. 13.
- 95.- Mc Grady, P. W. 1946.
Standar methods of water analysis:
Am. Pub. Health and Am. Water Assoc.
9th Ed., pp. 131-138.
- 96.- Mulder, E. G. 1949.
Investigations on the nitrogen nutrition of pea plants.
Pl. Soil 1, pp. 179-212.
- 97.- Mulder, E. G., Bakema, K. and Van Veen, W. L. 1959.
Molybdenum in symbiotic nitrogen fixation
and in nitrate assimilation.
Pl. Soil 10, pp. 319-334.
- 98.- Munns, D. N. 1968.
Nodulation of Medicago sativa in solution culture, I.
Acid-sensitive steps.
Pl. Soil 28, pp. 129-146.
- 99.- Munns, D. N. 1968.
Nodulation of Medicago sativa in solution culture, III.
Effects of nitrate on root hairs and infection.
Pl. Soil 29, pp. 33- 47.
- 100.- Munns, D. N., Hohenberg, J. S., Righeti, T. L.
and Lauter, D. J. 1981.
Soil acidity tolerance of symbiotic
and nitrogen fertilized soybeans.
Agron. J. 73(3), pp. 407-410.

- 101.- Munsell Soil Chart. 1975 Edition.
Munsell Color, Co.
Maryland, E. U. A.
- 102.- Nicol, H. and Thornton, H. G. 1942.
Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 130, pp. 32-59.
- 103.- Obaton, M. 1971.
Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique du Rhizobium. C. R. Acad. Sci. 272, pp. 2630-2633.
- 104.- Obaton, M. 1977.
Effectiveness, saprophytic and competitive ability: three properties of Rhizobium essential for increasing the yield of inoculated legumes, pp. 127-133. In Ayanaba, and P. J. Dart (eds.), Biological Nitrogen Fixation in farming systems of the tropics. Wiley, New York.
- 105.- Oghoghorie, C. G. O. and Pate, J. S. 1971.
The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (Pisum arvanse L.). Techniques for measurement and evaluation in physiological terms. Pl. Soil, Special Volume, pp. 185-202.
- 106.- Olivares, J., Bedmar, E. J. y Casadesus, J. 1979.
La fijación biológica de nitrógeno. Importancia y perspectivas. Anales de Edafología y Agrobiología XXXVIII (9-10), pp. 1457-1466.
- 107.- Olivares, J., Casadesus, J. and Bedmar, E. J. 1980.
Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains. 39(5), pp. 967-970.
- 108.- Palacios, S. y Mier, L. B. 1978.
Efecto de un herbicida del grupo de las cloro-5-triazinas en la microflora de algunos suelos del valle de Toluca,

Estado de México.
Revista del Instituto de Geología de la
U. N. A. M. 2(2), pp. 194-199.

- 109.- Papadakis, J. 1980.
El suelo, con referencia especial a los suelos de América Latina, Península Ibérica y ex-colonias ibéricas.
Ed. Albatros. Buenos Aires, Argentina. pp. 364.
- 110.- Parker, O. T. and Allen, O. N. 1957.
Characteristics of four rhizobia phages active against Rhizobium meliloti and phages capable of lysing Rhizobium meliloti.
Can. J. Microbiol. 3, pp. 651-668.
- 111.- Parker, C. A. and Grove, P. L. 1970.
Bdellovibrio bacteriovorus parasitising Rhizobium in Western Australia.
J. Appl. Bacteriol. 33, pp. 253-255.
- 112.- Peech, M. 1947.
Methods of soil analysis for soil fertility investigation.
U. S. Dept. Agr. Sci. pp. 757.
- 113.- Peterson, E. A., Sirois, J. C., Berndt, W. B. and Miller, R. W. 1983.
Evaluation of competitive ability of Rhizobium meliloti strains for nodulation in alfalfa.
Can. J. Microbiol. 29, pp. 541-545.
- 114.- Postgate, J. 1981.
Fijación del nitrógeno (cuaderno de Biología).
Ed. Omega, Barcelona, España. 82 pp.
- 115.- Ramírez, M. 1974.
El cultivo de alfalfa en México.
Dirección General de Extensión Agrícola,
folleto de divulgación. Chapingo, México.

- 116.- Rise, W. A., Olsen, P. E. and Page, W. J. 1984.
ELISA evaluation of the competitive abilities
of two Rhizobium meliloti strains.
Can. J. Microbiol. 30(9), pp. 1187-1189.
- 117.- Robert, F. M. and Schmidt, E. L. 1983.
Population changes and persistence of
Rhizobium phaseoli in soil and rhizospheres.
Appl. Environ. Microbiol. 45(2), pp. 703-705.
- 118.- Robinson, A. C. 1969.
Host selection for effective Rhizobium trifolii by
red clover and subterranean clover in the field.
Australasian Journal of Agricultural Research 20,
pp. 1053-1060.
- 119.- Roughley, R. J. 1976.
The production of high quality inoculants and their
contribution to legume yield. Pp. 125-135. In P. S.
Nutman (ed.). Symbiotic nitrogen fixation in plants. USA.
- 120.- Russell, P. E. and Jones, G. D. 1975.
Variation in the selection of Rhizobium trifolii
by varieties of red and white clover.
Soil Biology and Biochemistry 7, pp. 15-18.
- 121.- Sagardoy, M. A. 1976.
Effect of ammonium nitrate on a native strain of
Rhizobium meliloti with produces nodules in alfalfa.
Rev. Assoc. Argent. Microbiol. 8(3), pp. 109-113.
- 122.- Sagardoy, M. y Laborde, H. 1977.
Inoculación de Vicia sativa L. y Medicago sativa L.
con Rhizobium en suelos del valle bonaerense del Río
Colorado.
Rev. Latinoamericana Microbiol. 19, pp. 145-150.
- 123.- Schmidt, E. L. 1974.
Quantitative autoecological study of
microorganisms in soil by immunofluorescence.
Soil Sci. 118, pp. 141-149.

- 124.- Schöllhorn, R. and Burris, R. H. 1966.
Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 38, pp. 213-216.
- 125.- Singleton, P. W., El Swaify, S. A.
and Bohlool, B. B. 1982.
Effect of salinity on Rhizobium growth and survival.
Appl. Environ. Microbiol. 44(4), pp. 884-890.
- 126.- Sironval, C. 1958.
Relation between chlorophyll metabolism and
nodule formation in soya bean.
Nature 181 (4618), pp. 1272-1273.
- 127.- Soil Surveys Staff. 1975.
A basic system of soil clasification for
making and interpreting soil surveys.
U. S. Departament of Agriculture Soil
Conservation Service. 754 pp.
- 128.- Staniewski, R. 1968.
Typing of Rhizobium by phages.
Can. J. Microbiol. 6, pp. 1003-1009.
- 129.- Subba-Rao, N. S., Lakshmi-Murami, M.,
Singh, C. S. and Magu, S. P. 1972.
Nodulation of lucerne (Medicago sativa L.)
under the influence of sodium chloride.
Indian J. Agric. Sci. 42, pp. 384-386.
- 130.- Torres, R. E. 1981.
Manual de conservación de suelos agrícolas.
Ed. Diana, México.
- 131.- Trinick, M. J. 1969.
Identification of legume nodule bacteroids
by the fluourescent antibody reaction.
J. Appl. Bacteriol. 32, pp. 181-186.

- 132.- Turner, G. L. and Gibson, A. H. 1980.
Measurement of nitrogen fixation by indirect means.
pp. 111-138. In J. F. Bergersen (ed.). Method for
evaluating biological nitrogen fixation.
- 133.- Tuzimura, K. and Watanabe, I. 1959.
Saprophytic life of Rhizobium in
soils free of the host plant.
J. Sci. Soil Manure. 30, pp. 506-510.
- 134.- U.S.D.A. 1974.
Soil conservation service.
Soil survey Manual.
U.S. Dept. Agr. Misc. Publ. 274.
- 135.- Valdés, M. y Hubbell, D. H. 1973.
Fertilizantes naturales para plantas leguminosas
(inoculación).
Boletín COFAA-IPN. México.
- 136.- van Rensburg, H. J. and Strijdom, B. W. 1982.
Competitive abilities of Rhizobium meliloti strains
considered to have potential as inoculants.
Applied and Environmental Microbiology. 44(1), pp. 98-106.
- 137.- van Schreven, D. A. 1958.
Some factors affecting the uptake of nitrogen by legumes.
In Nutrition of Legumes, edited by E. G. Hallsworth,
pp. 137-163. Butterworths, London.
- 138.- van Schreven, D. A. 1970.
Some factors affecting growth and survival
of Rhizobium spp. in soil-peat cultures.
Pl. Soil 32, pp. 113-130.
- 139.- Vincent, J. M. 1962.
Influence of calcium and magnesium on growth of Rhizobium.
J. Gen. Microbiol. 28, pp. 653-663.

- 140.- Vincent, J. M. 1975.
Manual práctico de Microbiología.
Ed. Hemisferio Sur, S.R.L.
Argentina, pp. 90-92.
- 141.- Vincent, J. M. and Waters, L. M. 1953.
The influence of the host on competition
amongst clover root-nodule bacteria.
Journal of General Microbiology 9, pp. 357-370.
- 142.- Virttanen, A. I. 1945.
Symbiotic nitrogen fixation.
Nature 155(3945), pp. 747-748.
- 143.- Walkley, A. 1947.
Critical examination for determining
organic carbon in soils.
Soil Sci. 63, pp. 251-264.
- 144.- Wilson, J. R. 1970.
Response to salinity in Glycine. VI.
Some effects of a range of short-term salt stresses
on the growth, nodulation and nitrogen fixation of
Glycine Wightii.
Aust. J. Agric. Res. 21, pp. 571-582.
- 145.- Wooding, F. J., Paulsen, G. M. and Murphy, L. S. 1970.
Response of nodulation and non-nodulated soybean
seedlings to sulfur nutrition.
Agron. J. 62, pp. 277-280.