

24/ 85

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EFFECTO DE LA INOCULACION EN SOYA
CULTIVADA EN DOS SUELOS DE TEMPORAL
DEL TROPICO HUMEDO DEL ESTADO DE
CAMPECHE.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

MA. DE LA PAZ MONTERRUBIO SOLIS

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

1. Introducción.
2. Revisión Bibliográfica.
 - 2.1. Características y usos de la soya.
 - 2.1.1. Taxonomía, morfología y generalidades.
 - 2.1.2. Características de la semilla.
 - 2.1.3. Importancia económica.
 - 2.1.4. Factores que afectan el cultivo.
 - 2.2. Características e importancia de la bacteria.
 - 2.2.1. Taxonomía, morfología y características.
 - 2.2.2. Importancia de la bacteria.
 - 2.3. Simbiosis eficiente en la Fijación Biológica del Nitrógeno y factores que la limitan.
 - 2.3.1. Inefectividad.
 - 2.3.2. Especificidad y proceso de infección.
 - 2.3.3. Efectividad en la Fijación Biológica.
 - 2.3.4. Interspecificidad y capacidad competitiva.
 - 2.3.5. Sobrevivencia de la bacteria en el suelo.
 - 2.3.6. Factores ambientales que afectan la Fijación Biológica.
 - 2.4. Inoculación.
 - 2.5. Localización de los suelos usados en el experimento.
3. Objetivo.
4. Material y Métodos.
5. Resultados.
6. Discusión.
7. Conclusiones y Recomendaciones.
8. Bibliografía.
9. Apéndice.

INTRODUCCION

El aumento de la población mundial, el deterioro del medio ambiente y el agotamiento de los recursos fósiles no renovables han estimado entre otros factores, el interés por el estudio intensivo de los diferentes procesos implicados directamente en la producción agrícola tales como la Fijación Biológica de Nitrógeno.

En estudios recientes se ha visto que para proporcionar alimento a la población en el año 2000 se requiere de elevar el incremento alrededor del 2.5% anual, a lo largo de los próximos 15 años.

La Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reporta que de los 3200 millones de hectáreas potencialmente cultivables sólo se utiliza la mitad, la otra mitad requiere de inmensos gastos para hacerla productiva. Por lo que no se cree que la parte no productiva pueda dar lugar a aumentos significativos, pues la tierra más adecuada ya está bajo cultivo.

Lo que se sugiera es un aumento en la producción agrícola por unidad de superficie. Uno de los factores que ha contribuido a esto, es el uso masivo de fertilizantes y especialmente los nitrogenados, sin embargo, la crisis energética, la progresiva carestía de estos productos debido al alto consumo de gas natural y petróleo utilizados en su fabricación, obliga a buscar otras alternativas.

Merece la atención cualquier medio para aliviar problemas como son la alimentación y el uso de fertilizantes. Dentro del sistema económico de México, la soya presenta un carácter estratégico importante por proporcionar un elemento indispensable en la dieta de la población y abastecer el insumo principal de la dieta de alimentos balanceados. Dado que en el

comportamiento de los principales indicadores de oferta y demanda se presenta insuficiencia de estos productos, se debe recurrir a importaciones crecientes a precios cada vez más altos, lo cual afecta la balanza agrícola del país.

En México el 85% de la soya que se siembra comercialmente se desarrolla bajo condiciones de riego y el otro 15% se efectúa en condiciones de temporal.

Una posible solución al incremento de las importaciones y en general para cubrir las necesidades de esta leguminosa, es la implantación de cultivos en zonas donde nunca se ha sembrado, lo que a la vez proporciona una importante fuente de empleo.

En el estado de Campeche es donde se ubica la zona de este estudio, los cultivos de soya son de temporal y se utiliza como cultivo asociado o alterno.

Una de las recomendaciones del INIA para esta zona es el estudio de la variedad de soya UFV-1 que cuando se usa ha mostrado una buena adaptación.

Por otra parte, entre las técnicas utilizadas para aumentar la producción de soya se tiene la inoculación de semillas con bacterias del género Bradyrhizobium. Ya que desde hace muchos años se tiene el conocimiento de que esta bacteria y la soya establecen una asociación y que en esta condición la bacteria reduce al nitrógeno elemental a formas útiles para la leguminosa, favoreciendo el desarrollo y producción de grano de la misma. El proceso que a su vez permite economizar fertilizante nitrogenado para este tipo de cultivo y aumentar la disponibilidad de fertilizante pa

ra otros cultivos.

De tal manera que la utilización de los inoculantes es cada vez de mayor significancia económica debido a la actual crisis energética.

Sin embargo, los beneficios que aporta el empleo de inoculantes están condicionados por la interacción de características de la bacteria, de la leguminosa y del suelo en que se desarrollan.

Por lo que en la práctica de la inoculación es necesario considerar los siguientes aspectos:

- La eficiencia de la bacteria en la Fijación de Nitrógeno.
- Interspecificidad de la bacteria por la leguminosa, la que es determinada por características genéticas de ambos simbioses.
- Capacidad competitiva y de sobrevivencia en el suelo de las bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Factores climáticos y edáficos que estimulan o inhiben el establecimiento de la simbiosis o bien la eficiencia y manifestación de la misma.

Lo anterior indica la importancia de introducir al suelo inoculantes bacterianos que reúnan las características mencionadas en los tres primeros incisos y efectuar estudios acerca de su adaptación e interacción con los factores del suelo.

Con base en lo anterior y como una contribución a las posibles alterativas para mejorar y conservar los suelos mediante el cultivo de leguminosas, que a su vez permite disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados el presente trabajo tiene como objetivo determinar la interacción de cepas preseleccionadas con la variedad UFV-1 y dos suelos del estado de Campeche.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Características y usos de la soya.

2.1.1. Taxonomía, morfología y generalidades.

La soya es una planta originaria de China, desde donde se extendió a la mayor parte de los países de Asia, algunos de Europa y posteriormente al Continente Americano, Circular CIAT (1977).

La soya pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoi-
deae y género Glycine a este género corresponden más de 12 especies de -
las cuales max es la de mayor importancia económica.

La familia Leguminosae es un grupo de plantas fanerógamas que se en-
cuentran tanto en regiones tropicales como en las templadas, varían desde
plantas pequeñas pero muy difundidas tales como el Trébol hasta árboles y
arborescentes como la Acacia, Burton (1979).

Esta familia comprende más de 12,000 especies de leguminosas (aunque
pocas de ellas tan sólo 100 son comúnmente usadas en la producción de ali-
mentos).

La soya es un cultivo que ocupa un lugar importante en la agricultura
mundial debido a la aplicación de sus propiedades en la alimentación y
en diferentes industrias.

2.1.2. Características de la semilla.

La importancia del grano de soya radica en que es la fuente de pro-
teína de buena calidad y más barata que existe en el país. otra caracte-
rística fundamental es su facilidad de transformación para elaborar pro-
ductos como: leche, queso, harina, pan, aceites y sustitutos del café y -

cacao.

La harina obtenida tiene un balance de aminoácidos esenciales semejantes a la proteína del huevo, patrón que usa la FAO para evaluar las proteínas.

El aceite es el principal producto que se extrae de las semillas y se usa en la fabricación de margarinas, jabones, tintas para impresión, insecticidas y desinfectantes. La lecitina es utilizada como agente hidratante y estabilizante en alimentos, medicamentos y detergentes.

Las semillas contienen: 5-9.4% de agua, 29.3-50.3% de proteínas, 13.5-24.2% de grasas, 14.0-23.9% de carbohidratos, 2.8-6.3% de fibras, 3.3-6.4% de cenizas y cantidades importantes de tiamina, riboflavina y niacina principalmente. Ciclos de Cultivo SARH (1982).

2.1.3. Importancia económica.

De 1970-1979 se sembraron anualmente en el país 300,000 Ha de soya y en 1980 por no haber suficiente agua en las presas se redujo a 130,000 Ha. Desde su introducción a México la cantidad acumulada que se ha sembrado es de 3.1 millones de toneladas de grano, con un valor en la producción superior a 19,000 millones de pesos; esto demuestra la importancia económica de la soya que ha promovido el desarrollo de la industria alimenticia y animal.

A nivel nacional los principales estados productores de soya son: Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Tamaulipas. En México este cultivo está ampliamente establecido en las áreas del noreste del país Sonora, Sinaloa y Chihuahua generalmente bajo condiciones de riego. El cultivo de esta legumi-

nosa bajo condiciones de temporal se inició en el sur de Tamaulipas en donde se sembraron 600 Ha con la variedad Tropicana, obteniéndose buenos resultados por lo que se extendió la superficie cultivada con soya a otras regiones tropicales del centro, sur y sureste del país. Econotecnia Agrícola (1983).

En el estado de Campeche la soya es un cultivo de reciente introducción, sin embargo, la superficie sembrada con esta leguminosa se ha incrementado rápidamente. En 1979 la soya ocupó una superficie de 927 Ha con una producción de 1.576 toneladas y un rendimiento por unidad de superficie de 1.70 ton/Ha.

Los suelos más apropiados para este cultivo son los rojos arcillosos conocidos regionalmente como Kankab. En el norte del estado existe una superficie potencial de 30,000 Ha de este tipo de suelo mecanizable y además de 10,000 que ya se explotan.

Actualmente la soya es uno de los cultivos más rentables de la región, el costo por Ha es de \$6,750.00 y los rendimientos medios 1.40 ton/Ha. Los gastos de una hectárea se pagan con 1.08 toneladas por lo que la ganancia neta es alrededor de \$2,000.00 por Ha. Con base en lo anterior y mediante la difusión adecuada sobre las propiedades nutricionales de este cultivo es probable que en el estado de Campeche llegue a ser un importante productor de soya en el sureste del país.

En el período de 1959-1969 se sembraron únicamente variedades americanas, sin embargo, de 1970-1980 gracias a las nuevas variedades originadas por la investigación agrícola a nivel nacional, se logró que el 80% del área ocupada por esta leguminosa en los diferentes estados productivos

res se sembrara con variedades mexicanas.

El programa de soya en el trópico húmedo, desde su establecimiento - en 1972, dió mayor énfasis a la introducción de líneas y variedades prove - nientes de otras regiones soyeras nacionales e internacionales con la fi - nalidad de detectar las que se adapten mejor a la región. De acuerdo a - los resultados de este tipo de estudios se determinó que Júpiter supera - el rendimiento de la variedad Tropicana, la cual fue desplazada en 1975, desde entonces cada año se reciben materiales de diversas partes del Con - tinento las cuales se siembran en distintas regiones del país para deter - minar su estabilidad regional. Los estudios al respecto han demostrado - que las variedades Viroja y UFV-1 son estables a nivel nacional y tienen rendimientos superiores a Júpiter. Logros y Avances (1981).

En los cuadros 1 y 2 se describen algunas características de varieda - des de soya sembradas en México y de variedades obtenidas en el País.

CUADRO 1.

Características de las variedades Americanas de
Soya Crispín y Barriga (1975).

Variedad	Altura	Vegetativo	Observaciones	Estados
Lee	0.8 - 1.0 m	150 días	Susceptible al mildiu	Norte del país.
Hill	0.7 m	140 días	Susceptible al desgrane y resistente al acame.	Norte del país.
Bragg	0.9 m	160 días	Resistente al desgrane y acame.	Tamaulipas y Sinaloa.
Davis	0.8 - 0.9 m	140 días	Resistente al acame y susceptible al desgrane.	Noreste del país.
Júpiter	0.9 - 1.0 m	150 días	Resistente al acame	Tamaulipas Chiapas Veracruz.

CUADRO 2.

Características de Variedades de Soya Obtenidas en
México Crispín y Barriga (1975).

Variedades	Altura	Vegetativo	Observación	Estados
Tropicana	0.8 - 1.0 m	120 días	Susceptible a enfermedades.	Áreas del Golfo.
Cajeme	0.9 - 1.0 m	140 días	Resistente a roya	Norte y Noreste.
Culiacán	0.8 m	135 días	Resistente a acame desgrane y humedad relativa.	Campeche.
Viroja	0.6 m	114 días	Resistente al desgrane.	Sureste del país.
UFV-1	0.6 m	105 días	Resistente a enfermedades y desgrane.	Campeche.

2.1.4. Factores que afectan el cultivo.

Las condiciones ecológicas de Campeche son ideales para el cultivo de la soya, como lo indica un estudio de parámetros de estabilidad realizado en 16 localidades del trópico húmedo, que abarcó desde Río Bravo Tamaulipas hasta Tapachula Chiapas. En este trabajo las variedades evaluadas mostraron sus más amplios rendimientos en las regiones de Hecelchakán y Campeche y entre otras variedades sobresalieron viroja y Júpiter.

La soya prospera en tres regiones bien definidas de la entidad: El Camino Real, Los Chenes y la zona del Cayal Campeche.

La soya parece ser peculiarmente susceptible a cambios de clima aún cuando es tolerante a las heladas durante gran parte de su desarrollo. Desde el punto de vista de sus exigencias de humedad el período de germinación es el más crítico, después de iniciado su crecimiento, las plantas toleran períodos cortos de sequía, un período lluvioso no perjudica su crecimiento ni su rendimiento.

Es un cultivo sensible al fotoperíodo, por lo que es importante conocer la fecha de siembra óptima, que corresponde de 15 de junio al 30 de julio; observándose que en el mes de julio es cuando mejor se producen, en tanto que las siembras que se llevan a cabo en el mes de agosto generalmente son menos rendidoras, y esto probablemente se deba al efecto del fotoperíodo, así como a la ausencia de lluvias en la época de la floración Crispín y Barriga (1975).

por su sensibilidad a la duración del día se ha clasificado como planta de días cortos. Esta característica determina que las variedades tengan una área de adaptación limitada y que sea muy amplia la gama varie

tal en los lugares donde el cultivo es de importancia económica.

Las variedades de soya responden en forma distinta cuando se exponen diariamente a diferentes períodos de luminosidad aunque en realidad el período de oscuridad es el determinante para que una planta produzca o no flores. Algunas variedades requieren hasta 10 o más horas de oscuridad. Todas las variedades florecen más rápidamente con períodos oscuros de 14-16 horas que con períodos más cortos. De acuerdo con estas diferencias de sensibilidad fotoperiódica, las variedades se adaptan y se recomiendan para su uso.

La fecha de siembra determina la duración del fotoperíodo y ambos tienen influencia sobre características tan importantes como la altura de la planta, período vegetativo, rendimiento y desgrane. Además, a medida que cambian las condiciones de humedad y temperatura la población de maleza es diferente.

2.2. Características e importancia de la bacteria.

2.2.1. Taxonomía, morfología y características.

Jordan y Allen (1970) en el Manual de Bergey clasificaban en dos géneros a la familia Rhizobiaceae, el primero Rhizobium y el segundo Agrobacterium, a su vez el género Rhizobium comprendía: Grupo I o de crecimiento rápido formando parte de él, las especies phaseoli, meliloti, trifolii y leguminosarum. Y en el Grupo II se localiza japonicum y lupini que son microorganismos de crecimiento lento.

Actualmente Jordan (1984) en el Manual de Bergey clasifica a la familia Rhizobiaceae en cuatro géneros: Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacte-

rium y Phillobacterium. Rhizobium japonicum es el género Bradyrhizobium japonicum.

Es una bacteria Gram negativa, de aproximadamente 0.5-0.9 X 1.2-3.0 micras, se presenta en colonias circulares, blancas y opacas, raras veces translúcidas y convexas, que no exceden de 1 mm de diámetro, se considera una bacteria de crecimiento lento ya que su desarrollo se aprecia después de incubarla durante un periodo de 5-7 días en medio extracto de levadura manitol y rojo congo.

Es comúnmente pleomórfica, móvil, las células jóvenes presentan un flagelo polar o subpolar parecido a Rhizobium loti. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C, sin embargo algunas cepas toleran de 30-42°C, el pH óptimo varía entre 6-7 aunque algunas cepas crecen a pH 4.5, un 30% se desarrollan a un pH 4.0 y pocas debajo de 8.5.

Es una bacteria quimiorganotrófica que utiliza un gran número de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono, entre ellos: glucosa, galactosa, glicerol, fructosa, arabinosa o manitol el 10% de todas las cepas utilizan maltosa, raras veces usan lactosa, ramosa y sacarosa. Los ácidos que pueden utilizar son: ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico debiendo provenir del medio basal. No utiliza celulosa y almidón.

Producen un polisacárido extracelular, no produce ácido succínico, tampoco hidroliza la caseína y el agar, no produce precipitado en un medio que contenga glicerofosfato de calcio, es común la producción de penicilinas, da reacción alcalina con producción de zona de suero. Bradyrhizobium japonicum disminuye su desarrollo en un medio que contenga 2% de -

cloruro de sodio.

Como fuente de nitrógeno utiliza sales de amonio o nitratos, ciertos aminoácidos (glutamato, histidina, aspartato y prolina), la peptona es utilizada sólo en algunas cepas aisladas de Lotonosis.

No requiere de vitaminas con la rara excepción de la biotina que también puede llegar a inhibir ciertas cepas.

Se han encontrado diferentes antígenos a lo largo de su lento desarrollo, como son: antígeno flagelar y antígeno somático.

La inmunodifusión revela que no se comparten antígenos entre bacterias de crecimiento lento y bacterias de crecimiento rápido.

Bradyrhizobium es resistente a algunos antibióticos por ejemplo: tetraciclinas, estreptomocinas, penicilina G, viomicina los que se emplean como marcadores en tanto que su desarrollo es inhibido con D-alamina y bromuro de etilo.

2.2.2. Importancia de la bacteria.

La importancia de Bradyrhizobium y Rhizobium radica en que se asocia con todas las leguminosas y bajo estas condiciones, lleva a cabo la Fijación Biológica de Nitrógeno, proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico es transformado a compuestos asimilables por las plantas favoreciendo de esta manera el desarrollo de las mismas.

Este proceso es de particular importancia ya que el nitrógeno del aire es prácticamente inagotable y se calcula que anualmente se fijan de 100 a 500 millones de toneladas por vías biológicas, Date (1976). Corres-

pondiendo aproximadamente el 40% a la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

Los organismos son característicamente hábiles para invadir los pelos radiculares de las leguminosas de zonas tropicales y zonas templadas. Los miembros del género Rhizobium al infectar a la leguminosa apropiada causan la formación del nódulo y participan en la adquisición simbiótica de nitrógeno. Existe una clasificación para determinar la capacidad de un cultivo de Rhizobium que invade las raíces de un número restringido de plantas, además de la leguminosa de la cual se obtuvo el microorganismo. A causa del limitado número de hospederos se han establecido grupos de inoculación cruzada. Esta se refiere a un grupo de especies de leguminosas que forman nódulos en presencia de una bacteria obtenida de los nódulos de cualquier miembro de ese grupo particular de plantas. De la que siete han resultado ser de mayor importancia.

La presencia de una gran población de Rhizobia es de particular importancia para el desarrollo de la relación simbiótica. Los organismos son generalmente más numerosos en suelos cultivados con la leguminosa específica sola o en cultivos rotatorios, que en los campos donde no existe esa leguminosa.

Los Rhizobia son frecuentemente más abundantes en las proximidades de las raíces que a cierta distancia de ellas.

2.3. Simbiosis eficiente en la Fijación Biológica de Nitrógeno y factores que la determinan.

El establecimiento de simbiosis entre bacteria y leguminosa no asegura la Fijación de Nitrógeno, de tal manera que para obtener los beneficios derivados de este proceso natural es necesario asegurar la existen-

cia de una simbiosis eficiente la que está regulada por la interacción de características genéticas de la bacteria, de la leguminosa y de factores ambientales los que son considerados de manera integral y determinan un problema muy complejo.

Las características de la bacteria y de las leguminosas se manifiestan a través de diferentes etapas que se suceden en el establecimiento de la simbiosis entre los que pueden mencionarse: el reconocimiento entre la bacteria y las raíces de las leguminosas, la capacidad de la bacteria para penetrar a las raíces infectándolas e inducir en la leguminosa a la formación de nódulos y finalmente a la interespecificidad que determina diferentes grados en cuanto a eficiencia en la Fijación de Nitrógeno.

Por lo que los aspectos más estudiados en relación a la simbiosis son: de la bacteria, infectividad, capacidad competitiva, capacidad de adaptación y sobrevivencia en el suelo, de ambos simbioses: interespecificidad y de los factores ambientales: contenido de nutrimentos pH y temperatura del suelo. Graham y Hubbel (1975).

2.3.1. Infectividad.

La infectividad se refiere a la capacidad de la bacteria para infectar a las raíces e inducir la formación de nódulos independientemente de que fijen o no nitrógeno.

2.3.2. Especificidad y proceso de infección.

La especificidad está dada por características genéticas de la bacteria y del hospedero y se manifiestan en varias etapas durante el proceso de infección, formación de nódulos y el establecimiento de la fijación -

del Nitrógeno. Date (1976).

El proceso de la infección involucra numerosos pasos que comprenden:

- Estimulación de los microorganismos en la zona radical.
- Contacto entre la superficie de la bacteria y de los pelos radiculares de la leguminosa.
- Mecanismos de reconocimiento, los que son determinados por la presencia de sitios específicos en la superficie de ambos simbioses.
- Enroscamiento de los pelos radiculares y penetración de la bacteria la que da origen a un filamento en las células corticales de los pelos radiculares.
- Multiplicación de las células corticales y formación de nódulos.

En relación a la estimulación de las bacterias en la zona radicular numerosos autores reportan que productos de secreción vegetal estimulan la multiplicación de los microorganismos, y existen reportes que algunos de estos productos estimulan selectivamente a Rhizobium, como por ejemplo la homoserina secretada por las raíces de chícharo que estimulan preferencialmente a Rhizobium leguminosarum, Egersa (1975).

Hunter y Fahring (1980) reportan sustancias quimiotácticas secretadas por los pelos radiculares las que atraen al microorganismo hacia la superficie de los mismos. Esto favorece el contacto fisiológico entre bacteria y hospedero y es entonces cuando se lleva a cabo procesos de reconocimiento los que son determinados por las lectinas de las leguminosas y diferentes polisacáridos de la superficie del Rhizobium específico, Dazzo (1981)

Sharon y Lis (1972) indican que esta combinación se efectúa de mane-

ra análoga a la reacción antígeno-anticuerpo donde parte de la molécula - de los polisacáridos bacterianos actúan como receptores variables. Así en Rhizobium trifolii el azúcar 2-deoxiglucosa actúa como sitio receptor, - Dazzo y colab. (1976). En tanto que en Rhizobium japonicum esta función se atribuye a la hexosa D-galactosa, Bhuvanavare (1977) y Mort Bouer (1978) mencionados por Rodríguez y Vidor (1980 a).

Bohlool y Schmidt (1974) observaron que la lectina de Glycine max - marcada con isotiocianato de fluoroceína combina con la mayoría de las ce - pas de Rhizobium japonicum que induce la nodulación en soya, en tanto que no combina con las cepas de Rhizobia incapaces de formar nódulos en soya. De tal modo que el reconocimiento de las cepas de Rhizobium ocurren en di - ferentes grados de especificidad, lo que indica las diferencias de especi - ficidad, así como la capacidad competitiva por el sitio de infección, Vi - dor (1977) mencionado por Rodríguez y Vidor (1980 b).

La presencia de la bacteria apropiada sobre la raíz y del factor de - rivado de combinaciones homólogas induce el enroscamiento de los pelo ra - dicales y sobre este proceso influyen también el pH del suelo, nivel de calcio y contenido de nitrógeno. Dazzo y Hubbel (1975).

El siguiente paso de la infección comprende la penetración de la bac - teria y formación de un filamento infeccioso, proceso sobre el que hay di - ferentes teorías. Dart y Mercer (1963) indican que las bacterias pasan a través de los intersticios de las microfibrillas de la pared celular del pelo absorbente causando la infección. Nutman (1956) menciona que el Rhi - zobium genera un polisacárido que induce la producción de poligalacturona sa en la planta con el consecuente ablandamiento del pelo radicular y for

mación del filamento infeccioso, lo que depende de la capacidad del microorganismo para producir un complejo de enzimas hidrolíticas y éstos mismos autores reportan que la cantidad de poligalacturonasa en la rizósfera de Trifolium repens es mayor cuando se inocula con cepas de Rhizobium mutantes no virulentas y no infectivas.

Los cordones o filamentos infecciosos dentro del pelo radicular se desplazan hacia las células corticales internas en donde son liberadas, y la leguminosa da origen al nódulo que es la región cortical circundante en el que se localiza parte del sistema vascular de la planta, Alexander (1980).

2.3.3. Efectividad en la Fijación de Nitrógeno.

Es la característica de la bacteria que produce nódulos de larga vida en los que se fijan altas cantidades de nitrógeno a diferencia de otros Rhizobia que pueden comportarse como parásitos de las mismas plantas.

En diferentes investigaciones se ha demostrado que existen cepas altamente efectivas o eficaces en la Fijación de Nitrógeno y que presentan capacidad infectiva variable.

Para explicar las diferencias de comportamiento en cuanto a eficiencia en la Fijación de Nitrógeno se han dado numerosas explicaciones sin haberse establecido hasta el momento el factor o factores que determinan una baja eficiencia. Se asocia la baja eficiencia de la Fijación Biológica de Nitrógeno con una baja capacidad de la cepa para utilizar la energía proveniente de los productos de la fotosíntesis. Otra explicación se refiere a que algunas cepas acumulan 4-aminobutirato lo que reduce la can

tividad de nitrógeno disponible para la planta, Rodríguez y Vidor (1980a).

En tanto Schubert y Evans (1976) sugieren que el desprendimiento de H_2 de los nódulos durante la reducción de nitrógeno constituye uno de los factores que disminuyen la eficiencia fijadora de diferentes cepas de Rhizobium. Ya que por cada molécula de H_2 producida se hidrolizan 4 moléculas de ATP lo que conduce a un desprendimiento de energía innecesario y - una menor eficiencia en la Fijación de Nitrógeno.

En relación a lo anterior se han observado que algunas cepas de Rhizobium japonicum poseen un gene llamado Hup⁺ que determina la síntesis de la enzima hidrogenasa, estas cepas son capaces de formar nódulos que reciclan el hidrógeno producido durante la Fijación de Nitrógeno.

Albrecht y colab (1979) demostraron que la cepa de Rhizobium japonicum USDA 22 DES aumenta significativamente el contenido de nitrógeno y el peso seco de la parte aérea de las plantas, comparándose con unas cepas - mutantes Hup⁻ derivadas de Hup⁺ USDA 22 DES.

A su vez Hanus y colab (1981) reportan un aumento significativo de - 8.9% en el contenido de nitrógeno en semillas de plantas cultivadas en - suelo y que fueron inoculadas con cepas Hup⁺. Por lo que es recomendable considerar este tipo de estudios en la producción de inoculantes comerciales con cepas de Rhizobium japonicum.

La efectividad se inicia con la transformación de la bacteria en bacteroide dentro del nódulo, en donde constituye hasta 30% de materia seca Bergensen (1967).

Pankhurst (1973) mencionado por Date (1976) reporta que el número de

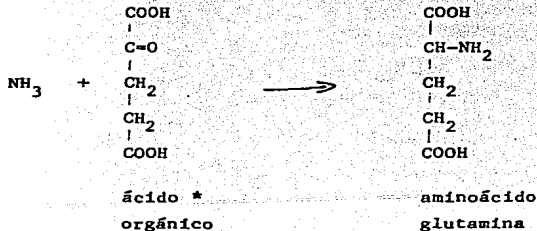
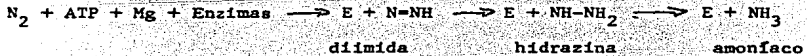
bacteroides estructuralmente organizados en las células del hospedero está relacionado con la actividad de la Fijación de Nitrógeno y que existen muy pocos casos de nódulos inefectivos en los que se observa tejido con bacteroides. En los bacteroides se encuentra la enzima nitrogenasa que es está constituida por dos componentes proteínicos:

- Componentes I con átomos de molibdeno y hierro.
- Componentes II con átomos de hierro.

Los átomos de hierro se agrupan en hexaedros independientemente de la proteína, pudiendo introducir electrones al componente II para que los transfiera al componente I en presencia de Mg-ATP a fin de formar un compuesto altamente reductor.

Aún cuando no se conoce el mecanismo con precisión, se sabe que son necesarios de 12-24 moléculas de ATP, para la oxidación de azúcares fotosintetizados y formar dos moléculas de amoníaco a partir de una de nitrógeno molecular.

Cuadro de reacciones:



* En soya con frecuencia el ácido orgánico es el ácido glutámico pero el amoníaco se puede incorporar en otras moléculas y formar alamina o glutamira.

Los bacteroides están circundados por una proteína llamada leg-hemoglobina, cuya función es mantener el flujo de oxígeno en cantidades limitadas pero suficientes para que se efectúe la fosforilación oxidativa. Esta proteína se localiza entre la membrana exterior del bacteroide y la membrana peribacterial, Postgate (1981).

El amoníaco fijado por el bacteroide es liberado en el citoplasma celular del hospedero, en donde por la acción catalizadora de la glutamino sintetasa es transferido al ácido α -cetoglutarico que genera un aminoácido (glutamina o asparagina) que se incorpora en el metabolismo vegetal.

2.3.4. Interspecificidad y capacidad competitiva.

Estas características están íntimamente ligadas con la especificidad que como se describió en páginas anteriores es determinada por las características genéticas de ambos simbioses los que se manifiestan por el proceso de infección, así como por la habilidad de la bacteria para inducir la nodulación y fijar nitrógeno cuando está asociado a la especie de hospedero específico, y en este sentido se sabe que las cepas de Bradyrhizobium japonicum presentan un considerable grado de interspecificidad con respecto a variedades de soya, dando lugar a asociaciones más eficientes desde el punto de vista de la Fijación de Nitrógeno, Rodríguez y Vidar (1980 a), Meza y colab (1983).

Respecto a la capacidad competitiva se tiene que las diferentes cepas de Bradyrhizobium japonicum compiten con otras bacterias de la misma especie por los sitios de infección del sistema radicular. Esta característica es también regulada por los genotipos de ambos simbioses. Roughley, Blowes y Herriage (1976) mencionados por Chamber (1979 a).

Means y colab (1961) mencionados por Vidor y colab (1979) encontraron que la cepa 76 estando en un inoculante en proporción de sólo 1% con respecto a la 38 fue la responsable del 85% de los nódulos formados.

Brockwell y Dudman (1968) aplicaron a la semilla de Trifolium subterraneum varias cepas efectivas en igual proporción encontrando que las cepas virulentas o competitivas formaron del 80-90% de los nódulos formados.

Es importante mencionar que la capacidad competitiva no está relacionada con la eficiencia de la cepa en la Fijación de Nitrógeno, de tal modo que puede existir la presencia de cepas competitivas ineficientes en el mismo sistema radicular, citado por Rodríguez y Vidor (1980b). Ver cuadros 3 y 4.

2.3.5. Sobrevivencia de la bacteria en el suelo.

Esta es una característica complementaria de gran importancia en la que se considera la capacidad de la bacteria para multiplicarse en el suelo en presencia o ausencia de hospedero. Chatel y colab (1973) encontraron que después de 1 ó 2 años algunas cepas dejaban de inducir nodulación en tanto que otras persistían y eran responsables de 97-100% de nódulos, además de invadir parcelas contiguas y formar allí del 30-68% de los nódulos.

Este tipo de estudios es de particular importancia en suelos en donde existen altas poblaciones de Rhizobia no eficientes o que no son específicas para la variedad de soya adecuada para esa región y que generalmente son muy competitivas por lo que desplazan a la microflora que se introduce en los inoculantes.

Todo lo anterior indica la importancia de realizar estudios en búsqueda de cepas altamente competitivas y con capacidad de sobrevivir en el suelo con el objeto de recomendar su empleo para una simbiosis eficiente.

En la tabla 5 se sumarian algunos resultados reportados por diferentes investigadores.

2.3.6. Factores ambientales que afectan la Fijación de Nitrógeno.

Caldwell y Hartwig (1970) indican que la Fijación de Nitrógeno es un proceso que no puede ser analizado aisladamente, y que es necesario considerar la interacción Rhizobium-planta-medio ambiente.

Los factores del medio ambiente tienen una marcada influencia en el desarrollo de la simbiosis, actúan provocando alteraciones fisiológicas - en ambos simbioses, así por ejemplo niveles inadecuados de nutrimentos - alteran la formación de nódulos, pero tales alteraciones son usualmente - el reflejo de un crecimiento anormal de la planta, Bowen y Kratky (1982).

Estos mismos autores reportan como factores que afectan la formación de nódulos y la Fijación de Nitrógeno a los siguientes:
temperatura, luz, pH, textura del suelo y contenido de nutrimentos en el mismo.

- Temperatura. La temperatura óptima para el desarrollo de las diferentes leguminosas es variable y diferente a la temperatura óptima para - que se establezca la asociación, se ha observado que el crecimiento de - Glycine javanica es estimulado a una temperatura de 40°C cuando se aplicó nitrógeno mineral, mientras que en plantas inoculadas los mejores rendimientos se obtuvieron a 30 y 36°C.

La nodulación generalmente tiene lugar en todas las temperaturas del suelo que toleran las plantas, pero la cantidad de nódulos se reduce en los extremos más fríos y más calientes de temperatura. Y se reportan efectos de temperatura sobre:

- a) Población de Rhizobium y número de nódulos, las que se disminuyen a altas temperaturas Date (1976).
- b) Retardo en la nodulación y en la actividad de la nitrogenasa. Date (1976) encontró que a 21°C la actividad de la nitrogenasa se detectó hasta los 26 días, en este sentido Roughley y Dary mencionados por Norris y Date (1976) indican que la temperatura afecta la cantidad de nitrogenasa pero no influye en su actividad, ya que ésta sólo se inactiva a 0 y 45°C.
- c) Degeneración de los nódulos. Lindermann y Ham (1979) corroboraron que a temperaturas próximas a 27°C (en este caso 25°C), se aumentó el número de nódulos y la actividad en la reducción de acetileno a las cuatro semanas en las que se hicieron las determinaciones, pero que los nódulos formados degeneraron rápidamente por lo que al repetir las determinaciones indicadas en un período de 5 semanas se observó mayor actividad de la nitrogenasa, mayor número de nódulos y mayor peso seco en el experimento que se condujo a 20°C.

- Luminosidad. La duración del día e intensidad de la luz afecta también el número de nódulos, la falta de luz tiende a disminuir el peso de los nódulos y altos niveles de CO₂ aumenta en número de nódulos. Lie - - (1969) indica que cuando la intensidad de la luz se aumentó de 10,000 a -

15,000 ergs/cm² x seg, el número de nódulos disminuyó. La luz roja tenue reduce la formación de nódulos y este efecto inhibitorio es eliminado en parte por la irradiación subsecuente con luz roja normal.

- Textura del suelo. Afecta la infiltración, permeabilidad, capacidad de retención y disponibilidad de agua y nutrimentos, esto forma parte del medio que será o no propicio para la asociación mutualista. Crozat (1982) y Weaver (1972) reportan una buena sobrevivencia de Rhizobium japonicum en suelos arcillosos de pH 6. Respecto a la salinidad del suelo se realizó un experimento aumentando la salinidad en cantidades de 2.0, 5.0 y 7.5 ohms/cm, llegando a la conclusión que la salinidad disminuye la nodulación y la fijación de Nitrógeno.

- Potencial de Hidrógeno. Las leguminosas tropicales difieren mucho en su sensibilidad al pH del suelo desarrollándose entre pHs de 3.5 hasta 8.0, siendo las condiciones óptimas entre 5.0-6.0 el efecto de la sobrevivencia de las bacterias del género Rhizobium es variable, siendo más tolerantes a la acidez las pertenecientes al grupo caupi. Lonerragan (1970).

Condiciones extremas de acidez en el suelo ocasionan alteraciones morfológicas de Rhizobium y pérdida en su inefectividad y efectividad, Van Schereven (1958) y Norris (1959).

Andrew (1978) encontró que las leguminosas tropicales toleran más la acidez debido a que son más eficientes que las de regiones templadas para extraer el calcio. Este mismo autor encontró que en suelos de pH 5.5 y 3% de saturación de calcio, Centrosema, Desmodium y Stylosanthis nodularon bien y no mostraron deficiencias de calcio en tanto que Medicago y Trifolium mostraron deficiencias de calcio y pobre nodulación.

En trabajos con Acacia sp en soluciones nutritivas carentes de nitrógeno con pH controlado entre 3.8 a 4.2, 5.0 a 5.5, 6.5 a 7.0 y 8.5 a 9.0 y soluciones con nitrógeno bajo los mismos niveles de pH, se observó que en cada nivel el pH afectaba más la nodulación que el desarrollo de la planta. La acidez del suelo afecta directamente impidiendo la absorción de nutrientes tales como fósforo, molibdeno y magnesio o bien solubilizando elementos tóxicos como el aluminio o disminuyendo la capacidad de intercambio iónico.

La acidez afecta también el encurvamiento de los pelos radiculares de la planta impidiendo la infección. Lie (1969) reporta un período sensible en este proceso de tal modo que si se regula el pH durante este período y se inicia el encurvamiento, éste continúa aún cuando baje el pH.

Cunningham (1984) reporta una producción mayor de polisacárido por cepas resistentes a la acidez que por bacterias sensibles. También observó que la cantidad de polisacárido depende del pH del medio de pH 7.0 la cantidad de polisacárido disminuye obteniéndose mayor cantidad a pH 5.5.

- Nutrientes. Para estudiar la relación entre los nutrientes, el desarrollo de la leguminosa y el establecimiento de la simbiosis, se han clasificado a los nutrientes en tres grados:

1. Nutrientes con efecto directo en la iniciación y desarrollo de los nódulos (N, P, Ca, S y B).
2. Nutrientes que influyen directamente en la simbiosis (Mo, Fe, P y S).
3. Nutrientes que intervienen directamente en el metabolismo y cre-

cimiento de la planta independientemente de la simbiosis y en este grupo se encuentran todos los macro y microelementos.

Cada nutrimento tiene múltiples efectos, el molibdeno es esencial en el segundo y tercer grupo y el fósforo en los tres.

Nitrógeno: Niveles altos de nitrógeno combinado reducen el número y peso de nódulos, así como la cantidad de nitrógeno fijado, sin embargo, se ha manifestado que pequeñas dosis de este elemento estimula la simbiosis, Pate y Dart (1961). También indican que la Fijación de Nitrógeno por sí sola no puede producir los máximos rendimientos y otros autores consideran que con el uso racional de pequeñas cantidades de nitrógeno aplicado a la siembra se aumentan los rendimientos de grano sin perjuicio de la relación mutualista.

Lie (1971) en sus estudios sobre el efecto de nitrógeno combinado en la nodulación reporta que la mejor nodulación se obtiene en ausencia de nitrógeno y que el efecto inhibitorio de nitrato de amonio empezó a ser significativo alrededor de 25 ppm de nitrógeno causando la inhibición total a 100 ppm de nitrógeno.

Se ha observado que la fertilización con 25 Kg de N/Ha en cultivos inoculados, mejora la nodulación pero cantidades superiores provoca disminución de la nodulación con la consiguiente pérdida de la capacidad simbiótica, Chamber (1979 b) Este mismo autor menciona a Webber que reportó a los nitratos más perjudiciales que los iones amonio sobre la nodulación de Rhizobium japonicum.

Fósforo: La presencia de este elemento es indispensable en el desa--

rollo nodular y la Fijación Simbiótica de Nitrógeno, siendo tan necesaria su presencia como lo es la especificidad de los simbioses.

En suelos tropicales la disponibilidad de fósforo es baja, lo cual hace que haya respuesta altamente significativa a la fertilización fosforada, reportándose aumentos del número de nódulos, de masa nodular, diferencia de la eficiencia en Fijación de Nitrógeno y consecuentemente en el contenido de nitrógeno de la planta y rendimiento total.

Calcio: Este elemento ejerce una doble función, ya que además de ser esencial para la planta es necesaria para el proceso simbiótico de la Fijación de Nitrógeno. De tal modo que deficiencias de calcio restringen la cantidad de nitrógeno fijado por las leguminosas debido a la alteración en el desarrollo de la planta hospedera, y cuando las deficiencias son leves el efecto directo es sobre la simbiosis interfiriendo en el encurvamiento del pelo radicular. También existen algunas evidencias que la deficiencia de calcio es importante en la acidez del suelo sobre la Fijación de Nitrógeno y reflejándose en una disminución en el peso de nódulos Bowen y Kratky (1982).

Molibdeno: La necesidad de los microorganismos por el elemento molibdeno se debe probablemente a que la nitrogenasa lo contiene, se ha observado que el pH ácido de los suelos disminuye considerablemente la disponibilidad de molibdeno, aún cuando se encuentre en cantidades altas. Los organismos que toman el nitrógeno de fertilizantes no tienen ese problema, pero si las plantas que lo obtienen de la Fijación de Nitrógeno. Esta deficiencia se puede corregir agregando pequeñas cantidades al suelo, Alexander (1980).

Lozano de Yunda (1982) reporta que la aplicación de molibdeno en el suelo produce aumentos significativos en el contenido de nitrógeno en las plantas, obteniéndose mayores resultados con respecto al testigo cuando se agregan al suelo 750 g de molibdato de amonio o 2.5 mg/l de molibdato de amonio en el inoculante.

La fertilización fosfatada y el encalado del suelo, aumenta la disponibilidad del molibdeno, hasta el grado de aumentar el crecimiento de Rhizobium en perjuicio del desarrollo de la planta Uvalle Bueno (1985).

Hierro: Es un micronutriente que utilizan tanto los microorganismos del suelo como los vegetales y forma parte de las dos proteínas que constituyen la nitrogenasa. En condiciones de pH ácido el hierro forma parte de la solución del suelo causando toxicidad reflejándose en el rendimiento bajo de la cosecha de leguminosa.

Cobalto: Se considera importante puesto que forma parte de la vitamina B₁₂ además de que el elemento se encuentra como tal en el nódulo. Aún cuando no se han reportado evidencias de una marcada necesidad de cobalto, en algunos suelos deficientes de cobalto la adición del mismo estimula el crecimiento de la leguminosa y asimilación de nitrógeno, produciéndose la respuesta a sales de cobalto adicionadas en una concentración de 150 g/Ha.

2.4. Inoculación.

La inoculación de leguminosas se refiere a la introducción de cepas del género Bradyrhizobium ó Rhizobium para favorecer el establecimiento de la simbiosis y la Fijación Biológica de Nitrógeno. Estos microorganismos son aplicados a la semilla o bien directamente al suelo.

Los inoculantes comerciales se distribuyen en tres formas de presentación:

- Sólida (con base de turba u otro compuesto orgánico).
- Líquida.
- Deshidratados (ya sea por congelación o liofilización).

Se ha probado que 300 bacterias de Rhizobium por semilla son suficientes para lograr una excelente nodulación, pero hay muchos factores adversos a la sobrevivencia de la bacteria que obliga en ocasiones a incrementar hasta 600,000 microorganismos por semilla para lograr una buena nodulación por lo que en este sentido es necesario saber los antecedentes de los suelos a los que se introducirá este tipo de productos, así como considerar el manejo que se les da durante su transporte y la forma en que se aplican.

Aún cuando la inoculación ofrece una alternativa para disminuir la utilización de fertilizantes químicos nitrogenados es necesario señalar que no habrá respuesta cuando el inoculante se agrega a suelos que contienen altas concentraciones de nitrógeno disponible o a aquellos donde existen Rhizobia nativos eficientes y específicos para la leguminosa a cultivar, en estos casos se puede asegurar que no hay necesidad de efectuar la inoculación. La falta de respuesta al inoculante se manifiesta también cuando en el suelo hay Rizobia nativos ineficientes los que desplazan a la flora introducida, sin embargo se obtienen incrementos en la producción de grano mediante la adición de fertilizantes químicos nitrogenados lo que indica la necesidad de efectuar la inoculación y considerar la aplicación de una concentración mayor de microorganismos a la recomendada comercialmente e introducir cepas altamente competitivas e interespecíficas.

cas para asegurar una posición ventajosa a las cepas introducidas sobre la población natural.

2.5. Localización de los suelos utilizados en el experimento.

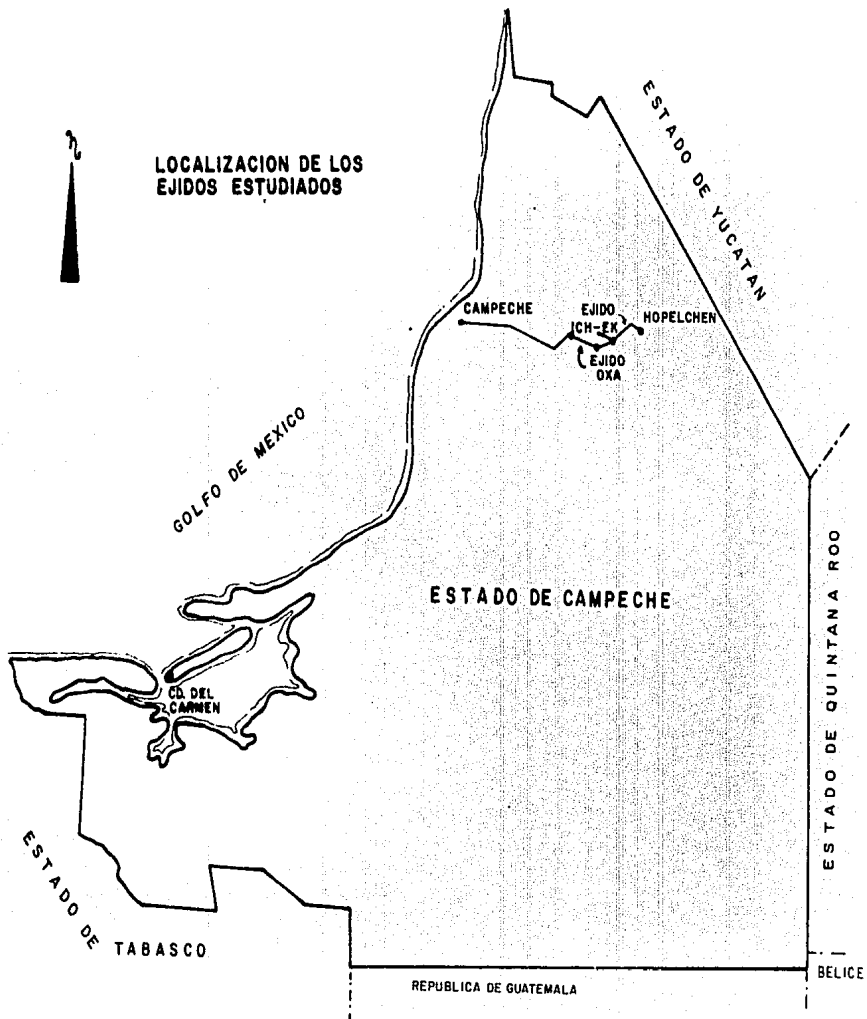
Suelo Oxá. El ejido comprende una superficie de aproximadamente 750 Ha, se ubica a 48 Km. de la Ciudad de Campeche las cuales desde hace 8 años se siembran con soya en el ciclo primavera-verano en condiciones de temporal y girasol en otoño-invierno en condiciones de riego. El nombre actual de este predio es el rancho "Cenit".

Suelo Ich-ek. Es un ejido que se encuentra localizado a 56 Km de la Ciudad de Campeche por la carretera Campeche-Hopelchén, en este suelo generalmente se siembra maíz-soya en los ciclos primavera-verano.

Ambas localidades se encuentran comprendidas por las coordenadas $19^{\circ}49'53''$ - $19^{\circ}53'58''$ latitud norte y $90^{\circ}16'29''$ - $19^{\circ}01'50''$ latitud oeste, ubicándose Oxá en el municipio de Campeche e Ich-ek en el municipio de Hopelchén, los ejidos pertenecen a pequeños propietarios que facilitan sus tierras para cooperar con la investigación de soya, mas no son parcelas experimentales.

El clima identificado para esta región corresponde a climas cálidos con temperatura media anual mayor a 22°C y la inferior es de 18°C . La precipitación media anual es de 1099 mm distribuyéndose el 85% en los meses mayo-octubre.

LOCALIZACION DE LOS
EJIDOS ESTUDIADOS



CUADRO No. 3.

Resultado de investigaciones sobre interespecificidad en soya.

Objetivo y Referencia	Combinación		Asociación
	Cepa	con Variedad	
Determinación de la interespecificidad de 6 cepas de <u>B. japonicum</u> y 4 variedades de <u>Glycine max.</u> Rodríguez y Vidor (1980 a).	5527	Sta. Rosa	Muy eficiente, mayor interespecificidad. Con ellas se obtuvieron la mayor masa nodular, peso de materia seca y nitrógeno total. Ineficiente.
	532	UFV-1	
	587	Bragg	
	587		
	5019		
	586	IAC-2	
	5020		
	5020	Sta. Rosa	Ineficiente.
Se usaron 14 cepas de <u>Rh. japonicum</u> y 7 variedades de soya. Meza F.G. y colab (1983)	FQ 17	Davis	Mayor interespecificidad, respondieron mejor con 1 ó 2 de las cepas probadas.
	FQ 5	Alamo	
	FQ 17,18	V-1	
	FQ 4,6	Bragg	
	7,8,9,11 16.17.18	Júpiter Cajeme BN-2	
			Menor interespecificidad de estas asociaciones, recomiendo a FQ 17 que dió lugar a asociaciones eficientes con 5 de las variedades.
Corroborar la interespecificidad de 2 cepas de <u>B. japonicum</u> con 1 variedad de soya en condiciones de campo. Chamber (1979 a)	110		Muy eficiente, son la que se incrementó la cantidad de grano y proteína/Ha.
	1809	Amsoy	
Chamber (1980)	1809	Hadgson	

CUADRO No. 4

Resultados de competitividad de varias cepas de Rhizobium.

Variedad	Cepa	Resultado	Referencia
Bragg UFV-1 Sta. Rosa	5019 587	Mediante tipificación serológica se obtuvo mayor porcentaje de nódulos por estas cepas.	Rodríguez y Vidor (1980 a).
Amsoy	CB-1809	Se obtuvo nodulación adecuada en presencia de Rhizobia nativos y se recomienda agregar al suelo altas concentraciones de microorganismos (10^9 mos/g de turba) para obtener éstos resultados.	Chamber (1979 a)
Malayan	CB-1809	A temperatura de 27°C se observó una mayor cantidad de nódulos infectados por la cepa mencionada.	Roughley y colab (1980).
Cajeme Davis	CP-36	Mayor porcentaje de biomasa nodular que cuando se aplicaron cepas aisladas de inoculantes comerciales.	Armenta (1985).

CUADRO No. 5

Estudios a cerca de sobrevivencia de cepas de Rhizobium en el suelo.

<u>Cepas</u>	<u>Condiciones Experimentales</u>	<u>Resultados</u>	<u>Referencia.</u>
<u>Rhizobium phaseoli</u> CP MEX 150	Condiciones restringidas de humedad.	Número de nódulos formados y número de <u>Rhizobia/g</u> de suelo fueron menores que en condiciones normales.	Espinosa V. (1985).
<u>Rhizobium japonicum</u> 311B138	pH 6-7	Mostró buena sobrevivencia.	Crozat y colab (1982)
<u>Rhizobium japonicum</u>	Presencia de antibiótico en el suelo.	Se encuentra que la estreptomycin presente en el suelo afecta la sobrevivencia de los microorganismos, recomendándose usar mutantes.	Scotti (1981)
<u>Rhizobium japonicum</u> T-1, 309 CB 156 y 201	Efecto de la temperatura 35°C y humedad, condiciones de sequía.	Afecta el desarrollo y por lo tanto su persistencia en el suelo.	Nantakorn (1981)

O B J E T I V O

Con base en lo anteriormente expuesto en el presente trabajo se tiene el objetivo de realizar un estudio preliminar de la interacción de diferentes cepas de Bradyrhizobium japonicum (tres preseleccionadas y un inoculante comercial) con soya (variedad UFV-1) y dos suelos de temporal del trópico húmedo del estado de Campeche.

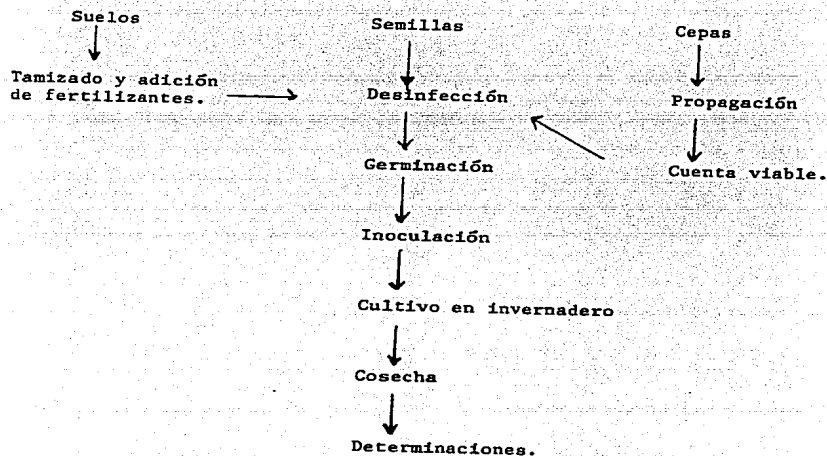
El cual constituye una aportación al Programa de Inoculación en Soya en el que se señalan como objetivos:

La selección de cepas de acuerdo a:

- Eficiencia en la Fijación de Nitrógeno.
- Interspecificidad.
- Competitividad entre ellas y con los Rhizobia adaptados a diferentes regiones soyeras.
- Adaptación a suelos a los que se introducirá el cultivo de Glycine max L. Merril.

MATERIALES Y METODOS

ORGANIGRAMA DEL EXPERIMENTO



Suelos.

Los suelos utilizados provinieron de los ejidos Ich-ek y Oxá pertenecientes al estado de Campeche. Estos fueron secados, tamizados y distribuidos en macetas en cantidades de 2.3 y 2.2 Kg respectivamente.

Fertilizantes. Se utilizó urea, superfosfato de calcio triple y cloruro de potasio, las concentraciones que se agregaron a cada suelo corresponden a las usadas por el campesino en el lugar de muestreo y son: para Ich-ek (60-80-0) por hectárea y para Oxá 200 Kg de fertilizante con la proporción de nitrógeno y fósforo de 18 y 46 más 30 Kg de potasio como cloruro de potasio.

Cepas.

Las cepas de Bradyrhizobium japonicum utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química UNAM y corresponden a las claves FQ 9, FQ 17 y FQ 18.

El inoculante comercial SW fue proporcionado por la Compañía Nitragin localizada en la ciudad de Guadalajara Jal.

Las cepas de colección se mantuvieron en tubos con medio inclinado de extracto de levadura manitol y rojo congo (Apéndice I).

Semillas.

Para este experimento se usaron semillas certificadas de soya variedad UFV-1 proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones - - Agrícolas. Las semillas se seleccionaron manualmente, se desinfectaron - con solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 10 min. y después se - lavaron vigorosamente con 6 cambios de agua estéril.

Se colocaron en cajas de Petri sobre algodón humedecido estéril y se mantuvieron a 28°C durante 3 días para favorecer la germinación.

Inóculo.

La propagación de Bradyrhizobium japonicum se hizo en caldo de levadura y manitol incubándose a 28°C a 250 rpm en un agitador rotatorio (Culter Hammer) hasta obtener un crecimiento abundante, el cual se registró a los 5 días. La cantidad de Rhizobía por mililitro de caldo de cultivo fue variable para cada cepa y se determinó por el método de Miles-Misra (Vincent 1970).

Inoculación.

A cada maceta se le agregó el fertilizante y el agua hasta alcanzar el 60% de capacidad de campo. Se colocaron en cada maceta 4 semillas germinadas, orientando la radícula hacia abajo.

En condiciones de asepsia se procedió a inocular tomando un mililitro de cada cultivo el que se agregó directamente a cada semilla, cubriéndola al final con suelo. En el caso del inoculante comercial se hicieron excavaciones de aproximadamente 6 cm, agregando primeramente inoculante, posteriormente la semilla, después más inoculante comercial y finalmente se cubrió con suelo.

La cantidad de inoculante fue 0.25 g aproximadamente.

Diseño Experimental.

El diseño experimental que se utilizó fue el de disposición completamente al azar, en donde cada unidad experimental estuvo constituida por una maceta con suelo. Ambos experimentos tuvieron tres repeticiones por tratamiento.

Condiciones en el invernadero.

Los parámetros que se controlaron en el invernadero fueron:

- Humedad relativa. Alrededor de 76%
- Temperatura. 28-32°C durante el día y 19-23°C en la noche.
- Iluminación. En periodos de 13-13.5 horas durante el primer mes y 12 horas diarias posteriormente.

Estas condiciones se mantuvieron hasta el momento de la cosecha.

Cosecha.

La cosecha de las plantas se realizó a los 60 días, cuando las plantas se encontraron en un 50% de la floración.

Determinaciones.

Realizadas en el suelo, se desarrollaron en el laboratorio del Campo Agrícola Experimental Cotaxtla, Ver. INIA.

- % de materia orgánica.
- % de nitrógeno total
- Relación carbono/nitrógeno.
- Fósforo (ppm).
- Calcio (ppm).
- Magnesio (ppm).
- Potasio (ppm).
- pH relación 1:1
- Textura.
- Color seco y húmedo.

Las determinaciones efectuadas a las plantas se hicieron en el Laboratorio de Microbiología Experimental en la Facultad de Química UNAM, y fueron las siguientes:

- Peso seco de la parte aérea. Se cortaron las plantas al ras del suelo depositándose en bolsas de papel que fueron colocadas en estufa a 80°C hasta peso constante. Por diferencia se obtiene el peso seco de la planta.

- Peso seco de nódulos. Se separó el suelo de la raíz con ayuda de agua, después se lavó a chorro de agua sobre un tamiz y se siguió el procedimiento anterior.

- Contenido de nitrógeno total por el método de Mitchell (1972).

Tratamientos.

A. Suelo Ich-ek.

Inoculante	Fertilizante		
	N	P	K
1. Testigo negativo	0	80	0
2. Testigo positivo	60	80	0
3. Cepa FQ 9	0	80	0
4. Cepa FQ 17	0	80	0
5. Cepa FQ 18	0	80	0
6. Inoculante comercial	0	80	0

B. Suelo Oxã.

Inoculante	Fertilizante		
	N	P	K
1. Testigo negativo	0	46	30
2. Testigo positivo	18	46	30
3. Cepa FQ 9	0	46	30
4. Cepa FQ 17	0	46	30
5. Cepa FQ 18	0	46	30
6. Inoculante comercial	0	46	30

Las cantidades en gramos de los fertilizantes agregados tanto en los problemas como en los testigos aparecen en el apéndice II.

R E S U L T A D O S

Resultados del análisis estadístico.

Nomenclatura.

T_t	Total de los tratamientos.
\bar{X}_t	Media de los tratamientos.
GL	Grados de libertad.
CM	Cuadrado medio.
SC	Suma de cuadrados.
F	Valor de F requerido para la significación estadística.
P	Nivel de significancia descriptivo aproximado.
α	Nivel significativo al 0.05.
R	Valor de R al nivel del 0.05.
DSM_m	Diferencia significativa mínima.
S	Desviación típica.
P	Posición relativa en la ordenación.

Programa de Diseños Balanceados (Anova B).

Número de factores	71
No. de niveles del factor A	76
Número de repeticiones	13

Nombre del archivo:

PACEN	Parte aérea del suelo Oxá
CNCEN	Contenido de nitrógeno en parte aérea suelo Oxá
PNCEN	Peso de nódulos en suelo Oxá
PADEH	Parte aérea suelo Ich-ek.
CNDEH	Contenido de nitrógeno en parte aérea suelo Ich-ek.
PNDEH	Peso seco de nódulos en suelo Ich-ek.

En el análisis estadístico de todos los experimentos se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ y se usó la siguiente regla de decisión:

Si α es menor que P entonces no se rechaza la hipótesis. H_a .

Si α es mayor que P entonces se rechaza la hipótesis. H_o .

H_o . Los tratamientos no tienen ningún efecto.

No existe diferencia significativa.

H_a . Las diferencias se deben a los tratamientos o sea a las cepas.

Si hay diferencia significativa.

Experimento Suelo Oxá

CUADRO No. 6

Análisis de varianza de peso seco de parte aérea (PACEN).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	0.299332	5.98663B-02	1.33547
Error	12	0.537933	4.48278E-02	
Total C	17	0.837265		

$$\alpha = 0.05$$

$$DSM_m = 0.25$$

$$DSM_m > \alpha$$

No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

CUADRO No. 7

Análisis de varianza de contenido de nitrógeno total (CN_TEN).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	3.11584E-02	6.23169E-03	0.514188
Error	12	0.145462	1.21218E-02	
Total C	17	0.17662		

$\alpha = 0.05$

$MSV = 0.75$

$DSM_x > \alpha$

No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

CUADRO No. 8

Análisis de varianza de peso seco de nódulos (PNCEN).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	1384.31	276.863	1.33465
Error	12	2984.31	207.443	
Total C	17	3873.62		

α = 0.05

DSM_m = 0.25

$DSM_m > \alpha$

No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

CUADRO No. 9

Resultados del efecto de la inoculación de Bradyrizobium ja
ponicum en soya variedad UFV-1 desarrollada en suelo procedente de Oxá.

Tratamiento	Peso seco de parte aérea. (g)	Nitrógeno total parte aérea. (g)	Peso seco nódulos. (mg)
T+	1.85	1.033	71.3
FQ 9	1.76	1.080	87.3
In. Com.	1.68	1.004	81.3
FQ 18	1.60	0.943	85.6
FQ 17	1.53	1.006	88.0
T-	1.49	0.990	69.3

Los datos son valores medios de tres repeticiones.

Experimento suelo Ich-ek.

CUADRO No. 10

Análisis de varianza de peso seco de parte aérea (PADEH).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	1.00095	0.200189	1.29391
Error	12	1.8566	0.154716	
Total C	17	2.85754		

α = 0.05

DSM_m = 0.25

DSM_m $> \alpha$

No hay diferencia significativa
entre los tratamientos.

CUADRO No. 11

Análisis de varianza de contenido de nitrógeno total (CNDEH).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	0.224108	4.48215E-02	1.24431
Error	12	0.432256	3.60213E-02	
Total C	17	0.65363		

α = 0.05

DSM_m = 0.25

$DSM_m > \alpha$

No hay diferencia significativa
entre los tratamientos.

CUADRO No. 12

Análisis de varianza de peso seco de nódulos (PNDEH).

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F Calculado
A	5	3366.4	673.281	4.94655
Error	12	1633.33	136.11	
Total C	17	4999.73		

α = 0.05

DSM_m = 0.25

DSM_m \wedge α

Si hay diferencia significativa
entre los tratamientos.

Prueba de cooperación múltiple de Duncan.

Diferencia significativa mínima = 0.0098

P	2	3	4	5	6
R	1.00	1.05	1.08	1.09	1.10
DSM _m	9.52	9.71	10.00	10.38	10.47

Ordenación de las medias de los tratamientos en forma ascendente.

T-	T+	FQ 18	FQ 17	IC	FQ 9
2.5	13.333	19.666	29.333	37.666	41.666

Comparación de las diferencias de las medias de los tratamientos.

<u>T-</u>	<u>T+</u>	<u>FQ 18</u>	<u>FQ 17</u>	<u>IC</u>	<u>FQ 9</u>
-----------	-----------	--------------	--------------	-----------	-------------

CUADRO No. 13

Resultados del efecto de la inoculación de Bradyrhizobium ja
ponicum en soya variedad UFV-1 desarrollada en suelo procedente de Ich-ek.

Tratamientos	Peso seco de parte aérea (g)	Nitrógeno total en parte aérea (mg)	Peso seco de nódulos (mg)
T+	1.527	0.752	13.333
FQ 9	1.515	0.718	41.666
In. Com.	1.399	0.751	37.666
FQ 17	1.036	0.514	29.333
FQ 18	1.032	0.788	29.666
T-	0.983	0.522	2.5

Los datos son valores medios de tres repeticiones.

CUADRO No. 14

Resultado de las determinaciones químicas de los suelos en estudio.

DETERMINACIONES	SUELO / PROFUNDIDAD			
	ICH-EK		OXA	
	0-15 cm	16-30 cm	0-15 cm	16-30 cm
Materia orgánica	3.73 R	1.55 MP	3.45 R	1.24 R
Nitrógeno	0.254 ER	0.117 P	0.254 ER	0.116 M
Relación C/N	8.50 B	7.69 MB	7.87 MB	6.26 MB
Fósforo (ppm)	4.83 M	2.24 P	4.69 M	1.54 P
Calcio (ppm)	2530 ER	1900 ER	2733 ER	1955 ER
Magnesio (ppm)	233 ER	210 ER	335 ER	185 ER
Potasio (ppm)	527 ER	322 ER	570 ER	338 ER

Claves de significaciones agronómicas:

EP	Extremadamente pobre	R	Rico
MR	Medicamento rico	A	Alto
MB	Muy bueno	M	Mediano
B	Bajo	ER	Extremadamente rico
P	Pobre		

Campo Agrícola Experimental de Cotaxtla, Ver.

CUADRO No. 15

Determinaciones físicas de los suelos en estudio.

DETERMINACIONES	SUELO / PROFUNDIDAD			
	ICH-EK		OXA	
	0-15 cm	16-30 cm	0-15 cm	16-30 cm
% Arcilla	41.72	47.26	37.08	79.08
% Arena	16.36	36.92	30.92	10.92
% Limo	16.36	15.82	32.00	10.00
Textura	Arcilla	Arcilla	Migajón arcillosa	Arcilla
Color seco	Rojo amarillento	Rojo amarillento	Rojo amarillento	Rojo amarillento
Color húmedo	Rojo oscuro	Café roji- zo oscuro.	Rojo oscu ro.	Rojo
pH (1:1)	6.3 LH	6.2 LH	6.8 N	6.5 LH

Claves de significaciones agronómicas:

N Neutro

LH Ligeramente ácido

Campo Agrícola Experimental de Cotaxtla, Ver.

D I S C U S S I O N

Aún cuando en el análisis estadístico (cuadros 6,7 y 8) no se detectan diferencias significativas en los tres parámetros evaluados, los valores medios indican tendencias, observándose en el experimento realizado en el suelo Oxá que la cantidad de nitrógeno total existente en el mismo es alta (cuadro 14), se registró un aumento en el peso seco de la parte aérea y el contenido de nitrógeno total en los tratamientos inoculados y en el tratado con nitrógeno mineral (cuadro 9) lo que nos indica la respuesta a la adición de nitrógeno y la necesidad de efectuar la inoculación en éstos suelos en donde probablemente el nitrógeno se encuentra inmovilizado.

En relación al peso seco de nódulos se observa que existe Rhizobia adaptado a este tipo de suelo y que la infección fue favorecida en todos los tratamientos inoculados obteniéndose mayor peso de nódulos secos. (cuadro 9).

El fósforo está reportado como un factor que limita el desarrollo de la planta, del microorganismo y del establecimiento y manifestación de una simbiosis eficiente.

En este caso particular se agregó fósforo en la dosis recomendada para esta zona, pero el alto contenido de calcio (cuadro 14) pudo favorecer la inmovilización de este elemento y afectar la Fijación de Nitrógeno.

La relación de los tres parámetros evaluados indican que las cepas que obtuvieron mejor comportamiento corresponden a la FQ 9 y el inoculante comercial.

En el experimento realizado en el suelo procedente de Ich-ek los resultados del análisis estadístico muestran diferencias significativas en

el peso seco de nódulos (cuadro 12) observándose una mejor respuesta con la cepa FQ 9, y que la adición de nitrógeno estimuló la actividad de los Rhizobia existentes que se encuentran en proporciones muy bajas y que probablemente proceden del arrastre de poblaciones existentes en parcelas vecinas, dado que este suelo no había sido cultivado previamente con soya.

La tendencia de los resultados obtenidos en las evaluaciones de peso seco de parte aérea y nitrógeno total es similar a la descrita para los suelos Oxá (cuadro 13) en tanto que en el análisis estadístico no se observa diferencias significativas (cuadros 10 y 11).

Es importante señalar que los análisis de textura indican que los dos suelos son de tipo arcilloso (cuadro 15) lo que ocasionó que en el suelo de Ich-ek durante el experimento se presentaran problemas de drenaje, que se manifestaron por una acumulación de agua en la superficie siendo necesario modificar el sistema de riego, que se efectuó añadiendo agua a recipientes colocados en la parte inferior de la maceta para favorecer la absorción por capilaridad. Sin embargo se considera que en los nódulos afectados en la primera etapa se produjeron cambios irreversibles que impidieron la manifestación de la eficiencia de la simbiosis en los otros dos parámetros evaluados.

Es importante mencionar que en un estudio reciente de interespecificidad realizado bajo condiciones nutricionales y microbiológicas controladas Tsuzuki (1986) reporta que las cepas FQ 17 y FQ 18 son muy eficientes con la variedad UFV-1, en tanto que en esta investigación la cepa FQ 9 su pero a las cepas antes mencionadas lo que nos indica la importancia de las características del suelo y su efecto sobre los microorganismos que son introducidos al mismo.

CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES

1. Presencia de Rhizobía adaptados a los suelos en estudio.
2. Respuesta a la adición de fertilizantes nitrogenados y necesidad de inoculación.
3. Se recomienda la introducción de la cepa FQ 9 en el inoculante comercial.
4. Se recomienda probar un mayor número de cepas interespecíficas para esta variedad y realizar experimentos de campo con la cepa FQ 9 e inoculante comercial SW considerando los siguientes aspectos:
 - 4.1. Diferentes dosis de fósforo para establecer las cantidades óptimas necesarias.
 - 4.2. Introducir inoculantes con poblaciones superiores a las recomendadas comercialmente a fin de favorecer el desplazamiento de las cepas adaptadas que fueron menos eficientes que las estudiadas.
 - 4.3. Efectuar el seguimiento de las cepas introducidas para determinar su competitividad, adaptación y persistencia.

BIBLIOGRAFIA

Albrecht, S.L., Majer, R.J. and Hanus, F.J. (1979) Hidrogenase in Rhizobium japonicum increases nitrogen fixation by nodulated soybean. - Science 203: 1235-1257.

Alexander, M. (1980) Introducción a la Microbiología del Suelo, ACT - Editores. México.

Andrew, C.S. (1978) Legume and acid soil. In Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. p 135-166.

Armenta, B.A.D. (1985) Interacción de Rhizobium en cultivos de soya - (Glycine max) en el estado de Sinaloa. Tercera Reunión sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. México p 31.

Bergensen, F.J. (1967) Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legume. Ann. Rev Plant Physiol. 2:121-140.

Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. (1974) Lectins: A possible basis for - specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science - - 1985:269-271.

Bowen, J.E. y Kratky, B. (1982) Nitrógeno. Fijación Biológica en Legumi - nosas Tropicales. Agricultura de las Américas.

Burton, J.C. (1979). Methods of inoculating seeds and their effect on survival of Rhizobia, In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. PS - Nutman IBP 7. Cambridge University Press.

Caldwell, B.E. and Hartwig, E.E. (1970) Serological distribution of - soybean root nodule bacteria in soils of south eastern USA. Agron. J. 62:621-622.

- Chamber, P.M.A. (1979 a) Efecto de la concentración de varias razas de Rhizobium japonicum introducidas en los inoculantes sobre la nodulación y producción de soya. An INIA/Ser. Prod. veg. No. 10. España p 121-133.
- Chamber, P.M.A. (1979 b) Respuesta de la soya a diferentes inoculantes comerciales y a varias dosis de abono nitrogenado. An INIA/Ser. Prod. veg. No. 10 España p 135-148.
- Chamber, P.M.A. (1980) Especificidad en la simbiosis entre 3 variedades de soya (Glycine max L. merril) y 4 razas de Rhizobium japonicum. An. INIA/Ser. Prod. veg. No. 12 España p 425-432.
- Chatel, D.L. and Parker, C.A. (1973) The colonization of host-root and soil by Rhizobia. I. Species and strain differences in the field. Soil Biol. Biochem. 5:269-277.
- Ciclos de cultivo (1982) Diagrama de las principales especies vegetales en las cuales se efectúan investigaciones agrícolas. Depto. de Difusión técnica. SARH/INIA México.
- Crispín, M.A. y Barriga, C. (1975) El cultivo de la soya en México. - INIA/SAG. México.
- Crozat, Y. and Cleyet, J.C. (1982) Survival rates of Rhizobium japonicum populations introduced into different soil. Soil Biol. Biochem. - 14:401-405.
- Cunningham, S.D. and Munns, D.N. (1984) The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in Rhizobium. - Soil Sci. Am. J. 48:1273-1276.

Dart, P.J. and Mercer, F.V. (1963) Development of bacteroid in the root nodule of barrel medic subterranean clover. Arch. Mikrobiol. 46:382-401.

Date, R.A. (1976) Principles of Rhizobium strain selection. Quality of Legume Inoculants. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. P.S. Nutman IBP 7. Cambridge university Press.

Dazzo, F.B. and Hubbel, D. (1975) Cross-reactive antigens and lectines determinants of symbiotic specificity in Rhizobium clover symbiosis. - Applied and Environmental Microbiology. Washington D.C. 30:1017-1033.

Dazzo, F.B., Napoli, C.A. and Hubbel, D.H. (1976) Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in Rhizobium clover symbiosis. Applied and Environmental Microbiology. Washington D.C. 32:166-171.

Dazzo, F.B. (1981) the mechanism of recognition between legume roots and Rhizobia: Some implications for biological nitrogen fixation in the tropic. In: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H. and Harris S.C. (Eds) CIAT, Cali Colombia. - p 115-127.

Econotecnia Agrícola 1960-1982 (1983). Producción Agrícola Nacional. - Subsecretaría de Agricultura y Operaciones/DGEA. México.

Egeraat, A.W.S.M. (1975) Exudation of ninhydrin-positive compounds by peaseedling roots: A study of sites of exudation and of the composition of the exudate. Plant and Soil 42:37-47.

El Cultivo de la Soya en el Noreste de Tamaulipas. (1977) Circular - - CIAT No. 14 SARH. México.

- Espinosa, V.D., Ferrera Cerrato, R. y Larque Saavedra A. (1985) Efecto de la sequía en la sobrevivencia y competitividad de mutantes de Rhizobium phaseoli resistentes a antibióticos. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. México p 17.
- Fahraeus, G and Ljunggren, H (1968) Pre-infection phases of the legume symbiosis. In the Ecology of soil bacteria. An International Symposium. Univ. Press. Liverpool p 396-421.
- Graham, P.H. and Hubbel, P.H. (1975) Soil-plant-Rhizobium interaction in tropical agriculture. In Soil Management in Tropical America. In: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H. and Harris, S.C. (Eds) CIAT, Cali Colombia. p 217-227.
- Hanus, J.F., Albrecht, S.L., Zablutowicz, A.S. and Evans, H.J. (1981) Yield and N content of soybean seed as influenced by Rhizobium japonicum inoculants possessing the hydrogenase characteristic. Agronomy - Journal 73:368-371.
- Hunter, W.J. and Fahring, C.J. (1980) Movement by Rhizobium and nodulation of legume. Soil Biol. Biochem. 12:537-542.
- Jordan, D.C. and Allen, D.N. (1970) In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Baltimore: Williams Co.) p 262-267.
- Jordan, D.C. (1984) In Berger's Manual of Determinative Bacteriology - (Baltimore: Williams and Wilkins Co) p 234-245.
- Lie, T.A. (1969) Effect of low pH on different phases on nodule formation in pea plants. Plant and Soil 31:389-406.

- Lie, T.A. (1971) Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. Plant Soil Special Volume p 117-127.
- Lindermann, W.R. and Ham, G.E. (1979) Soybean plants growth nodulation and nitrogen fixation as affected by root temperature. Soil Sci. Am. - J. 43:1133-1134.
- Loneragan, J.H. (1970) The Ca nutrition of plants. Plants Nutrition - and Soil Fertility Proceedings of the XI International Grassland Congress. University of Quesland Press. p 358-362.
- Logros y Avances de la Investigación Agrícola en el Estado de Campeche. (1981) SARH/INIA. México.
- Lozano de Yunda and Mora de González, N. (1982) Influenced of molybdenum on nitrogen fixation by white clover in the Bogotá Savana. In: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H. and Harris, S.C. (Eds) CIAT. Cali Colombia. p 161-167.
- Meza F.G., Hernández, S.G., Amaya, L.G., Tsuzuki, R.G. y Ramírez G.R.M. (1982) Inoculación de Rhizobium japonicum en diferentes variedades de soya (Nivel Invernadero). 2da. Reunión sobre Pijación Biológica de Nitrógeno Resúmenes. Marzo 1983. Chapingo México. p 17.
- Mitchell, H.L. (1972) Microdetermination of nitrogen in plant tissues. Journal of the AOAC. 55:1-3.
- Nantakorn, B and Weaver, R.W. (1981) Supervival of cowpea Rhizobia as affected by soil temperature and moisture. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H. and Harris, S.C. - - (Eds) CIAT, Cali Colombia. p 456-459.

Norris, D.O. (1959) Legume Bacteriology in Tropics. J. Aust. Inst. - -
Agric. Sci. 25:202-207.

Norris, D.O. and Date, R.A. (1976) Legume Bacteriology in Tropical Pas-
ture Research: Principles and methods (Ed. N.H. Shaw and W.W. Bryan) -
CAB. Bull p 51.

Nutman, P.S. (1956) The influence of the legume in root nodule symbio-
sis: A comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev.
31:109-151.

Pate, J.S. and Dart, P.J. (1961) Nodulation studies in legume. IV The
influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitra-
te on symbiosis response. Plant and Soil 15:329-346.

Postgate, J. (1981) Fijación de Nitrógeno. Cuadernos de Biología. Edi-
torial Omega. Barcelona, España. p 28-37.

Rodríguez, P.J.R. y Vidor, C. (1980 a) Selecao de estirpes de Rhizo-
bium japonicum e competitividade por sitios de infeccao nodular em cul-
tívars de soja (Glycine max L. merril). Agronomia Sulriograndense. -
Porto Alegre 16(2):205-219.

Rodríguez, P.J.R. y Vidor, C. (1980 b) Relacao entre concentracão de -
células no inoculante é competição por sitios de infeccão nodular en-
tre estirpes de Rhizobium japonicum en soja. Rev. Bras. Ci. Solo - -
4:139-143.

Roughley, R.J., Bromfiel, E.S., Pulver, E.L. and Day, J.M. (1980) Com-
petition between species of Rhizobium for nodulation of Glycine max. -
Soil Biol. Biochem. 12:467-470.

Schiel, E. y Dieguez, R.N. (1970) Nuevo portador para inoculantes de leguminosas a base de paja de trigo. Revista de investigaciones Agropecuarias. INIA Buenos Aires, Argentina. Serie 2 Biología y Producción Vegetal. Vol. VIII, 4:211-237.

Schubert, K.R. and Evans, H. (1976) Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodule symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences. 4:1207-1211.

Scotti, M.R. y colab. (1981) Susceptibility of Rhizobium strains to antibiotics: A possible reason for legume inoculation failure in cerrado soil. In: Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Graham, P.H. and Harris, S.C. (Eds) CIAT, Cali Colombia.

Sharon, N and Lis, H. (1972) Lectins: Cell-agglutinating and sugar specific protein. Science 177(4053):949-959.

Tsuzuki, R.G. y Barrios, L.T. (1980) Selección de cepas efectivas de Rhizobium japonicum para frijol soya variedad "Júpiter". Tesis Profesional. Fac. Química UNAM. México.

Tsuzuki, R.G. (1986) Comunicación Personal.

Uvalle Bueno, J.X. (1985) Inoculación de Rhizobium japonicum y efecto del molibdeno en frijol soya (Glycine max). Así como la influencia de la nutrición con fósforo y zinc sobre el rendimiento y la toma de nutrientes. Resúmenes de la Tercera Reunión de Fijación Biológica de Nitrógeno. Chapingo, México. p 19.

Van Schreven, D.A. (1958) Some factors affecting the uptake of nitrogen by legume. In Nutritional of Legume. Science 177(4053):137-163.

Vidor, C., Ederman, B. y Pereira, S.J. (1979) Competicao por sitios de infecao nodular entre estirpes de Rhizobium japonicum em cultivares de soja (Glycine max L. merril). Agronomia Sulriogradense. Porto Alegre 15(2):229-238.

Vincent, J.M. (1970) A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications.

Weaver, R.W. (1972) Effect on soybean an soil properties on numbers of Rhizobium japonicum in Iowa soils. Soil Sci. 114:137-141.

APENDICE I.

Caldo Extracto de Levadura y Manitol.

K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agua destilada	1000.0 ml

Esterilizar en autoclave a 120°C durante 15 min.

El medio sólido (Agar Extracto de Levadura con Manitol) contiene -
15 g de agar por litro.

APENDICE II.

Cantidades de los fertilizantes fosforados en los problemas.

Localidad	Kg de suelo	g/SFCT ⁺	g/KCl
Ich-ek	2.3	0.1632	-
Oxã	2.2	0.1837	0.063

Cantidad de fertilizantes agregados a los testigos positivos de ambos suelos, tanto fosforado como nitrogenado.

Localidad	Kg de suelo	g/Urea	g/KCl	g/SFCT ⁺
Ich-ek	2.3	0.1532	--	0.1672
Oxã	2.2	0.0880	0.063	0.1837

+ Superfosfato de calcio triple.