



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
ZARAGOZA

USO DE BIOFERTILIZANTES,
SIMBIOSIS ENTRE LEGUMINOSA
-HONGO-BACTERIA PARA INCREMENTAR
EL RENDIMIENTO DE LA ALFALFA EN
UNA ZONA CERCANA A LA PRESA
TAXHIMAY, EDO. DE MEXICO.

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

ANA ROSA BENITEZ VILLANUEVA

México, D. F.

1982





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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

Contenido -----	Pag.
Resumen -----	1
Introducción -----	4
Objetivo -----	10
Antecedentes :	
Localización -----	11
Clima -----	11
Suelo -----	11
Vegetación -----	13
Terreno experimental -----	14
Material y Método :	
Descripción del suelo experimental -----	20
Características principales de la bacteria, hongo y- la alfalfa. -----	21
Determinación de materia orgánica -----	23
Determinación de PH -----	23
Determinación de textura -----	24
Densidad Aparente -----	24

Densidad Real -----	25
Color del suelo -----	25
Capacidad de intercambio catiónico total -----	25
Determinación de nutrientes -----	26
Propagación de bacterias -----	27
Simbiosis bacteriana en el campo -----	27
Simbiosis bacteriana en el invernadero -----	28
Obtención de sueros inmunológicos -----	29
Conteo de bacterias por el método de Mc. Farland ----	31
Propagación del hongo -----	35
Extracción de esporas del hongo -----	39
Conteo de esporas -----	39
Tinción de raíces de plantas hospederas -----	40
Identificación de esporas del hongo -----	42
Resultados -----	43
Interpretación de resultados -----	60
Discusión -----	69
Conclusión -----	71
Bibliografía -----	74
Apéndice A -----	78
Apéndice B -----	82

RESUMEN

La finalidad de este trabajo es básicamente establecer una doble simbiosis que permita lograr un rendimiento efectivo de la alfalfa.

En la introducción se hace referencia acerca de la bacteria Rhizobium meliloti, la cual fija el nitrógeno de la atmósfera en forma simbiótica con plantas Leguminosas y de -- que el hongo endomicorrízico obligado Glomus fasciculatus - interviene de manera simbiótica en la captación de fósforo y otros nutrientes por diversos tipos de plantas.

Estos dos microorganismos simbiotes ejercen mayor acción cuando las condiciones del suelo son pobres en nitrógeno y fósforo , o bien cuando se trata de un suelo infértil con base en tal conocimiento se buscó un suelo que presentara tales condiciones ; así como a los dos microorganismos - para efectuar el trabajo .

El suelo del terreno experimental presentaba algunas - características que se consideraron como problemas para el desarrollo óptimo de la alfalfa , por lo que se hacía necesario inocular los microorganismos simbiotes . Se trata-

de un suelo poco profundo , con grandes cantidades de arcilla a lo largo del perfil , permeabilidad muy lenta , poca-humedad ; condiciones poco favorables para el desarrollo de la raíz y de la misma planta .

El suelo presenta arcillas 2 :1 , las cuales se expanden o contraen de acuerdo al contenido de humedad , generalmente son áridos . En el caso de suelos del tipo Vertisol- (CARTA EDAFOLÓGICA CENTRAL, 1976) ; los ciclos del nitrógeno y fósforo presentan dificultades para estar a disposición de las plantas , ya que en estas condiciones las grandes cantidades de arcilla actúan como absorbente y adsorbente , como agente intercambiante ; lo cual implica un mayor-trabajo para la planta al adquirirlos .

Por todo esto se pensó de inmediato en el establecimiento de la simbiosis bacteriana para la captación de nitrógeno y la simbiosis micótica para la captación del fósforo . A pesar de que las condiciones que se presentan en el terreno experimental no son las óptimas , se tratará de establecer el cultivo de la alfalfa ; ya que el problema de la escasez de forraje en la zona es muy fuerte .

Por otro lado el suelo de la zona nunca ha sido sometido

do al cultivo de la alfalfa por lo que se hizo la prueba pa
ra ver si hay resultados positivos .

I N T R O D U C C I O N

Este proyecto está enfocado al uso de biofertilizantes como una medida complementaria al empleo de fertilizantes , ya que estos llegan a causar problemas ambientales e incluso a destruir el equilibrio ecológico , pudiendo también -- cambiar la estructura del suelo (Tisdale, S.L. y Nelson , - W.L., 1975) .

Por otra parte México no produce la suficiente canti - dad de fertilizantes nitrogenados para satisfacer las deman - das agrícolas (González , V.E. y Reyes , R.G., 1977) .

Existe además la posibilidad de aumentar la producción de alimento y mejorar su calidad mediante el uso adecuado y prudente de las Leguminosas en asociación simbiótica con -- ciertas bacterias .

Los investigadores alemanes Hellriegel y Willfarátn -- (1886) , manifestaron en su descubrimiento , que ciertas -- bacterias , que más tarde se denominaron Rhizobium , pene - tran en las radículas de las semillas de las Leguminosas en etapa de germinación e inducen la formación de nódulos , -- dentro de las cuales , trabajan en forma simbiótica con el-

hospedero para fijar el nitrógeno atmosférico (opus cit.).

El fósforo , potasio y nitrógeno son los tres principa
les macronutrientes de las plantas ; pero de ellos el más -
importante es el nitrógeno , por ser el elemento principal-
de las proteínas que son componentes indispensables de los-
tejidos tanto vegetales como animales , Siendo las proteí-
nas la base de la vida , las Leguminosas constituyen una ri
queza , pues trabajando en forma simbiótica con su Rhizo --
biun específico , el nitrógeno inorgánico de la atmósfera -
es fijado y proporcionado al hombre en forma protéica ---
(Hanson , C.H., 1972) .

Los estudios citados y otros , ponen en evidencia la -
importancia de las Leguminosas como fuente protéica para el
hombre , ya sea en forma directa como alimento o bien indi-
rectamente como forraje para animales , además de acondicio
nar y enriquecer el suelo .

En este último aspecto , las Leguminosas son de gran -
interés ecológico y agrícola como fuente de nitrógeno , ya-
que sostienen la macrovida y la microvida propias del siste
ma suelo y compensan las continuas pérdidas de nitrógeno --
que caracterizan dicho sistema (opus cit.) .

Así pues , es necesario desarrollar una tecnología de la producción de inoculantes para Leguminosas , dicha tecnología no puede ser desarrollada únicamente en el laboratorio , pues la fijación simbiótica del nitrógeno es una relación compleja que se ve afectada por tres factores : la bacteria , la planta y el medio ambiente . Un mejor conocimiento de la naturaleza y un manejo adecuado del sistema biológico puede poner a nuestro alcance métodos económicos y eficientes para tener plantas de alta calidad protéica (opuscit.) .

Por otro lado existe otro tipo de simbiosis entre hongos y plantas superiores en áreas ampliamente distribuidas en todo el mundo . Este tipo de asociación entre hongos filamentosos y plantas vasculares se conoce como micorrizas . (Rovira , A.D., 1965) .

Con respecto a las micorrizas se sabe comúnmente que tienen ramificaciones más cortas , pero más gruesas y con frecuencia más abundantes que las raíces ordinarias , además poseen pocos o ningún pelo radical .

Al hongo micorrizico se le encuentra parte en el suelo y parte en la raíz del hospedero y a menudo forma una red -

de filamentos sobre la superficie de la raíz (manto) ; - -
de tal manera que la raíz no está en contacto directo con -
el suelo. Esto fué observado por primera vez por el micólogo
francés Louis René Tulasné (1841) .

Existen tres tipos de hongos micorrízicos : endotrófi-
cos , ectotróficos y peritróficos de acuerdo principalmente
a la forma como se encuentran interaccionando los filamen -
tos de los hongos con las raíces (Wilde , S.A., 1954) .

Nuestro trabajo está enfocado principalmente al estu -
dio de hongos endotróficos , que son los hongos endomicorrí-
zicos vesículo-arbusculares . Generalmente la mayoría per-
tenecen al grupo de los Ficomicetos y gran parte de ellos -
penetran en las células de la raíz , encontrándose muy ex -
tendidos en las raíces de las plantas; son muy difíciles de
estudiar y de cultivar . (opus cit.) .

Se sabe también que los endofitos involucrados en las
micorrizas vesículo-arbusculares (V-A) producen propágu -
los como clamidiosporas o zigosporas que son frecuentemente
grandes y pobremente adaptadas para la diseminación ; pero
a pesar de esto , están distribuidos en todos los suelos , -
desde vírgenes hasta habitats ecológicos climax (Barrow .-

N.J., 1977) .

Por todo lo anterior , estos hongos se les encuentra - estrechamente asociados a una gran variedad de plantas cultivadas y silvestres, esto tiene ventajas ecológicas , especialmente en aquellas plantas de habitats con deficiencias de fósforo y nitrógeno . Además este tipo de hongo proporciona a las plantas un gran suministro de otros iones aparte de fosfatos ; tales como hierro , cobre , zinc , molibdeno , etc. La captación de fósforo por la planta hospedera se debe básicamente a que el hongo endotrófico posee una red extensiva de micelios con lo cual incrementa el área de superficie ocupada , es decir que estos micelios aumentan el volumen de suelo explorado y toman por un mecanismo semejante al de la raíz el fosfato de zonas alejadas a ella, en donde se está agotando ; luego de captarlo lo traslocan y liberan en la corteza de la raíz hospedera .

Así como resultado de esta acción por el hongo se tiene un mejoramiento en la nutrición del fósforo y el consiguiente aumento en el rendimiento del crecimiento vegetal .

De la misma manera que en el establecimiento de la simbiosis para la fijación del nitrógeno , los niveles de fós-

foro afectan al desarrollo del hongo , dado que la infección micorrízica es más densa sobre los suelos infértiles ; debido a que la adición de fertilizantes con estos macronutrientes llegan a reducir la infección micorrízica . Esto se debe principalmente a que el fósforo agregado al suelo reacciona con las arcillas tornándose cada vez menos asimilables químicamente por las plantas ; por lo que los suelos fertilizados regularmente tienen grandes reservas de fósforo no disponible y aunque el endofito no moviliza la fracción insoluble de algunas fuentes de fósforo como la harina de hueso, fosfato de calcio, apatita, roca fosfórica, fosfato de hierro, fosfato de aluminio, etc., si se asegura una mejor utilización del fósforo disponible presente en estas fuentes (Azcon-G , C. y Miguel , B.J., 1980) .

OBJETIVO GENERAL

Aumentar el rendimiento de la alfalfa (Variedad Astro) mediante el uso de una doble simbiosis (Leguminosa - Medicago sativa, - Bacteria fijadora de nitrógeno - Rhizobium meliloti, - Hongo endomicorrízico - Glomus fasciculatus) en un suelo arcilloso (Vertisol; 7a. aproximación) en Loma Alta , Municipio Villa del Carbón, Edo. de México .

A N T E C E D E N T E S

I.- LOCALIZACION :

La zona de trabajo se localiza al NW de la Presa Taxhimay en el poblado de Loma Alta , Municipio - Villa del Carbón , Edo. de México . Las coordenadas en que se encuentra , corresponden a los 19° 21' y 19° 51' Latitud Norte y 99° 20' y 99° 25' Longitud Oeste (CETENAL, - - - 1971) - Ver fig. 1 .

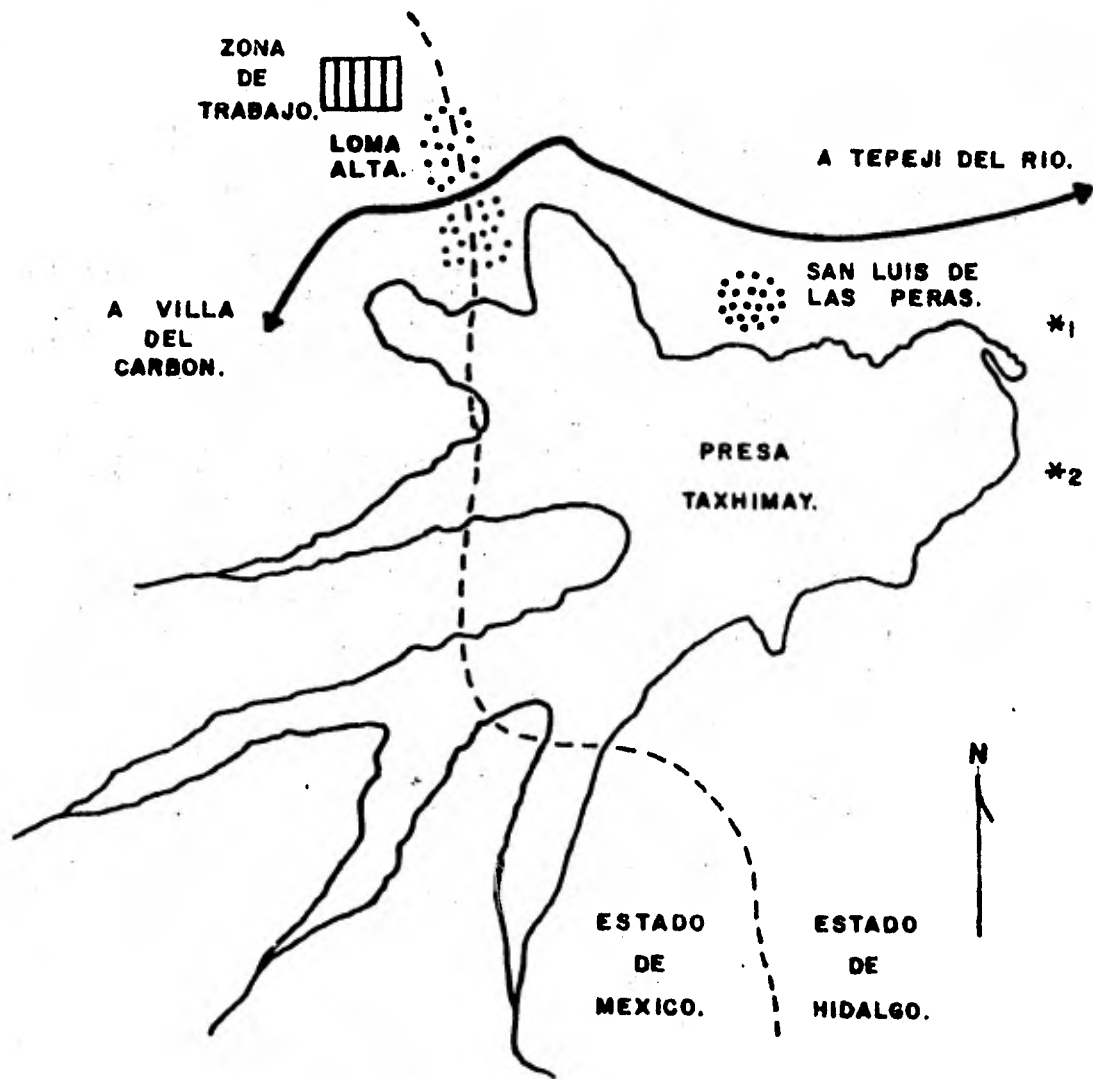
II.- CLIMA :

El lugar presenta una elevación de 2220 m.s.n.m por lo que el clima predominante ahí , es templado subhúmedo; con lluvias en verano (Cw) y con porcentaje de lluvia invernal entre 5 y 10.02 de la anual, la precipitación del mes más seco es menor de 40 mm con variantes , dependiendo del grado de humedad en diversos puntos de la zona (Clasificación de Köppen modificado por García , 1978) .

III.- SUELO :

En la zona de trabajo se reportan los siguientes tipos de suelo : Feozem Háptico , predomina principalmente y tiene una textura media a los 30 cm superficiales -

FIGURA I.



*1 ESTACION CLIMATOLOGICA.

*2 PLANTA HIDROELECTRICA.

del suelo. Se encuentra también el Vertisol Pélico , con -
textura media en los 30 cm superficiales (CARTA EDAFOLOGICA
CETENAL, 1976) .

En términos generales son suelos delgados y muy pesa -
dos , limitados por un estrato endurecido (Feozem , Verti-
sol y Litosol) y presentan cierta pedregosidad .

IV.- VEGETACION :

La vegetación natural de la zona contrasta
con el tipo de clima , pues en ella se encuentran plantas -
características de regiones áridas : huizaches (Acacia - -
sp.) , nopales (Opuntia sp.) y magueyes (agave sp.) .
Sin embargo esto se explica por la accidentada topografía ,
que promueve un excesivo escurrimiento del agua de lluvia -
y consecuentemente una baja absorción y retención de agua -
por el suelo ; esto favorece la presencia de texturas finas
y estratos endurecidos.

Los terrenos cultivables son en su mayoría de temporal
y se someten a monocultivo (maíz) , aunque también es posi-
ble encontrar frijol , calabaza y alfalfa .

Las zonas dependientes pronunciadas presentan vegeta -
ción natural principalmente de tipo secundario (matorral -

inorme , nopalera) , mientras que las partes superiores de éstas laderas se cubren principalmente de pastos inducidos, generalmente sobrepastoreados .

(Subsecretaría Forestal y de la Fauna ., 1979) y datos obtenidos de observaciones directos de los personajes que realizaron este trabajo .

v.- PARCELA EXPERIMENTAL :

La parcela fue rentada mediante un convenio entre dueño y UNAM , por lo que el tiempo para experimentar en ella era limitado (un año , de ENERO 1980 - ENERO 1981) . El terreno está ubicado frente a la casa del dueño y a otro terreno cultivado con maíz .

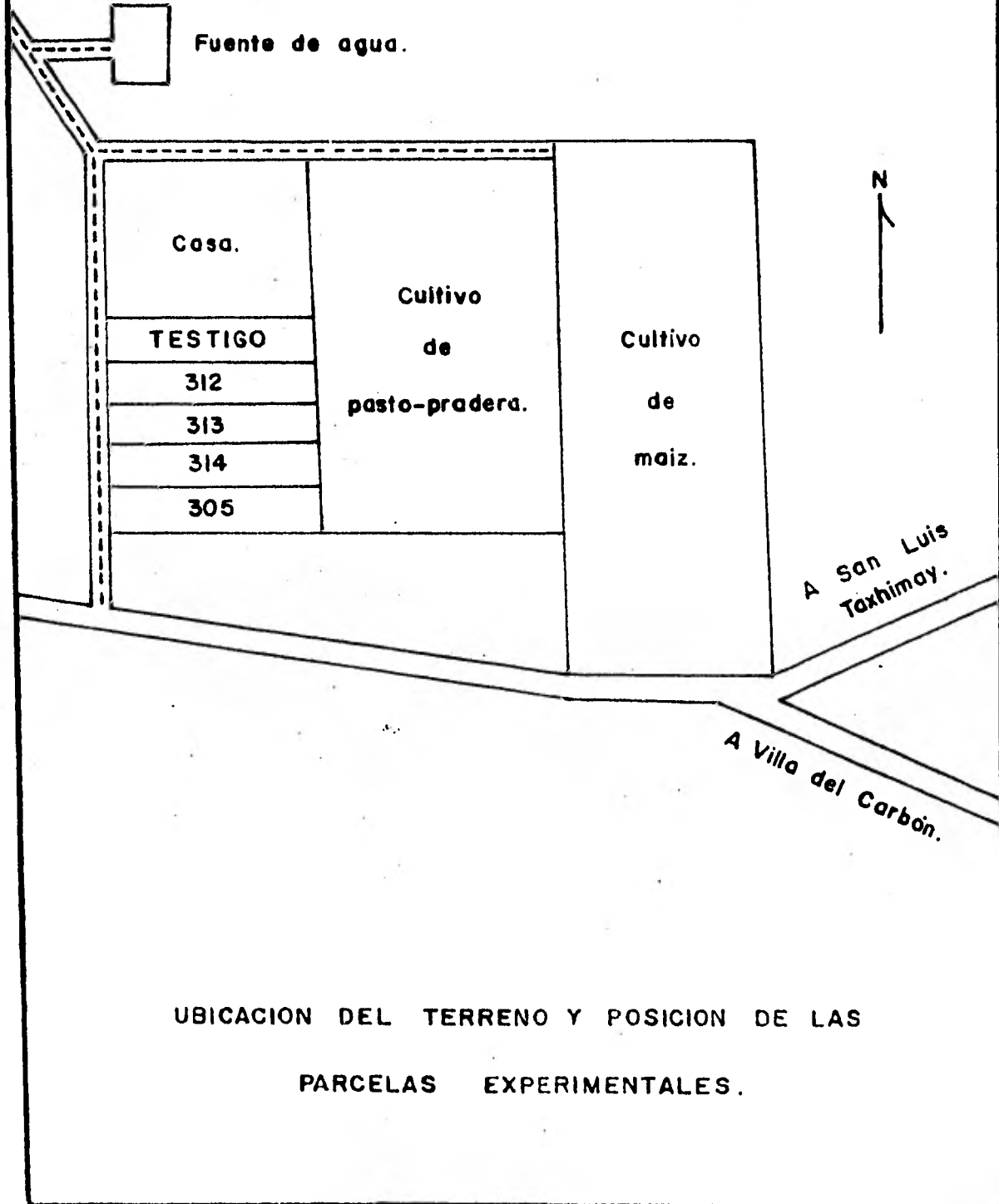
La parcela experimental fue cultivada los últimos años sembrando maíz primeramente , después avena y por último -- otra vez maíz . Durante estos cultivos la tierra ha sido -- barbechada con tractor usando arado de disco y cultivando con arado de bueyes . A principio de enero de 1980 , el -- terreno recibió un primer barbecho con tractor , con arado de disco y le acondicionaron después estiercol pulverizado -- el cual se dispersó en el terreno . A fines de enero del -- mismo año , se efectuó el muestreo que consistió en hacer --

dos perfiles . En esta misma fecha el terreno recibió un -
segundo barbecho con arado de bueyes , eliminando toda la -
vegetación . El 23 de febrero el terreno fue nivelado , se
abrieron los surcos de riego , mismos que dividieron el te-
rreno en 5 parcelas experimentales de aproximadamente 4x6 -
mt. que fueron marcadas como : Parcela Testigo , Parcela --
312 , P. 313 , P. 314 , P. 305 , (numeración que correspon-
de al tipo de bacteria utilizado , para facilitar su nome--
clatura); y se conectaron con la afluencia permanente de a-
gua. (Ver fig.2) .

El terreno es utilizado fuera de temporal dado que pre-
senta una pendiente favorable para el riego por gravedad .
Ver fig. 3 - .

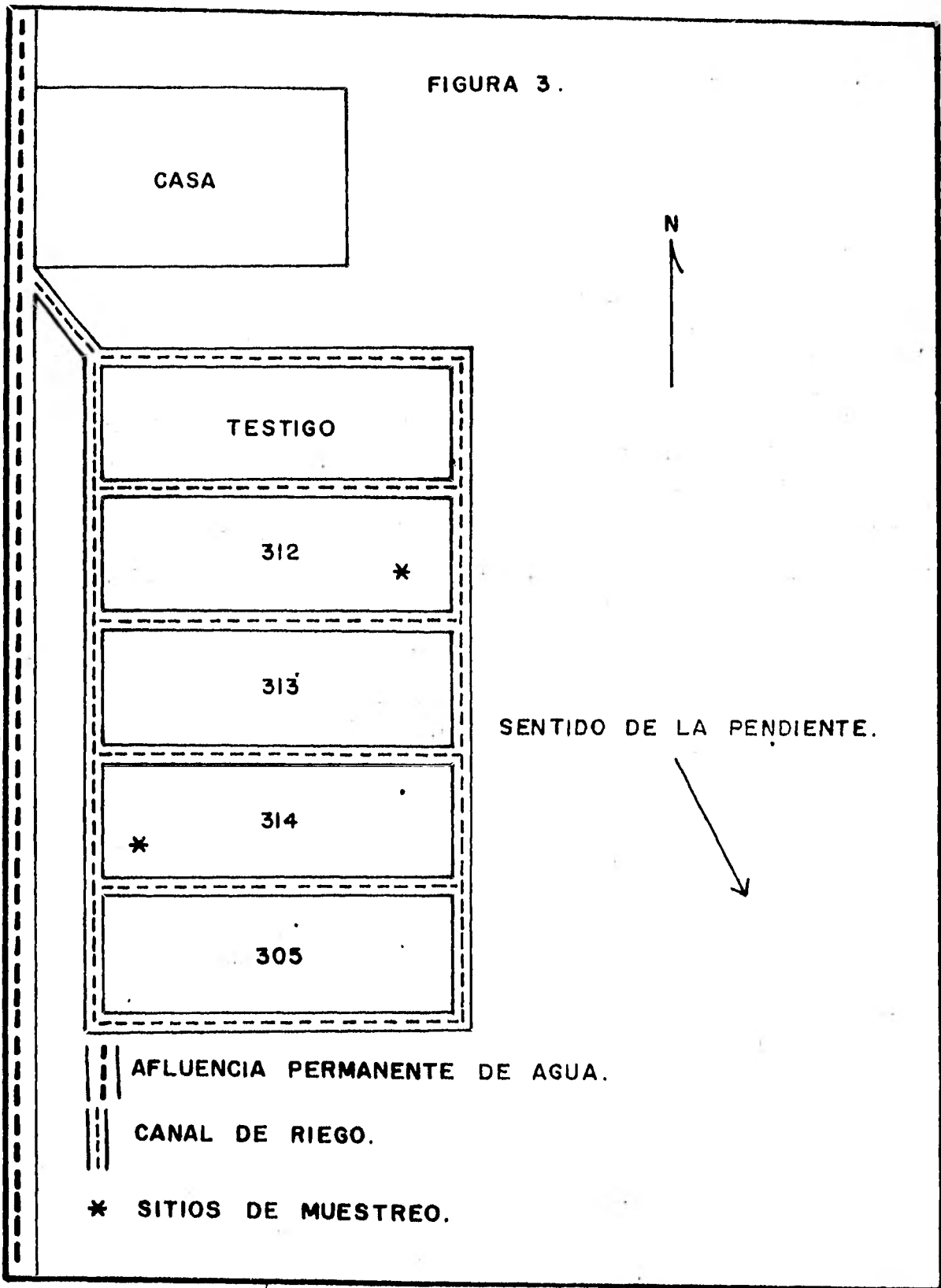
Todos los antecedentes anteriores fueron proporciona-
dos por el dueño de la parcela experimental .

FIGURA 2.



UBICACION DEL TERRENO Y POSICION DE LAS
PARCELAS EXPERIMENTALES.

FIGURA 3.



M A T E R I A L Y M E T O D O

- 1.- Realización y descripción de perfiles del suelo del --
área de estudio .
- 2.- Determinación de parámetros físicos y químicos del sue-
lo , tales como : Textura , Color , PH , Densidad Apa--
rente , Densidad Real , Materia Orgánica , Capacidad de
intercambio catiónico total , Calcio , Magnesio , Fósfo
ro , Potasio y Nitrógeno .
- 3.- Propagación de bacterias Rhizobium meliloti, tanto en -
medio líquido como en sólido .
- 4.- Inoculación de las cepas de bacterias a las semillas de
alfalfa , arreglo del terreno y siembra de las semillas
en el campo e invernadero .
- 5.- Inoculación de las cepas de bacterias a conejos , para-
obtener antisueros , los cuales servirán para comprobar
la existencia de las bacterias en los nódulos de las -
raíces de la alfalfa .
- 6.- Propagación del hongo endomicorrízico Glomus fascicula-
tus, en tres hospederos vegetales (cebolla, cebada y -
alfalfa) .

- 7.- Recuperación e identificación de las esporas del hongo-
Glomus fasciculatus .
- 8.- Inoculación de las semillas de alfalfa con esporas a -
nivel de campo y de invernadero .
- 9.- Cuantificación de la nodulación en las raíces de la al-
falfa e identificación de la simbiosis que se llevó a -
cabo .
- 10.- Interpretación estadística de los datos obtenidos de --
los resultados del cultivo de la alfalfa .

Para la determinación de parámetros físicos y químicos del suelo se realizaron dos perfiles , uno se hizo a la mitad del terreno experimental y otro entre las parcelas 305- y 314 , esto se hizo para ver si no hay alguna variación de las condiciones del suelo dentro del terreno . Ver fig. 3.

En el primer perfil se encontró la roca madre a los 69 cm de profundidad ; la primera capa u horizonte tiene de 0- a 15 cm , la segunda capa de 15 a 32 cm , la tercera de 32- a 49 cm y la cuarta de 49 a 69 cm .

En general se presenta una transición muy marcada , -- textura arcillosa hasta los 20 cm superficiales y cambia a arenosa hasta los 69 cm , su consistencia es pegajosa prime ramente y después arenosa . El color varia de pardo oscuro a pardo amarillento (color en húmedo) .

En el segundo perfil encontramos la roca madre a los - 72 cm de profundidad , la primera capa u horizonte fué de - 0 a 15 cm , la segunda de 15 a 35 cm , la tercera de 35 a - 50 cm y la cuarta de 50 a 72 cm .

También encontramos una transición muy marcada y una - textura arcillosa en la capa superficial y la segunda capa- después hay una variación brusca dado que la textura se --

vuelve arenosa hasta la roca madre . In cuanto a su consis
tencia se presentó pegajosa de los 0 a 35 cm, después se -
vuelve arenosa hasta los 72 cm ; el color fué en la capa su
perificial hasta los 35 cm pardo claro , y de ahí hasta la -
roca madre se presentó pardo amarillento (color en húmedo).

Se tomaron muestras de los dos perfiles del suelo para
realizar los parámetros físicos y químicos anteriormente se
ñalados . Esto se hizo con el objeto de determinar si es -
factible llevar a cabo la doble simbiosis en ese tipo de --
suelo , ya que se sabe por un lado que la bacteria fijadora
de nitrógeno Rhizobium meliloti requiere para su desarrollo
óptimo de un PH de 6 a 7 y una temperatura de 30 a 35 °C -
(Vincent J.M., 1975) . Siendo más resistente a la alcalinidi
dad que a la acidez .

En cuanto al hongo endomicorrízico vesículo-arbuscular
Glomus fasciculatus solo requiere para su desarrollo óptimo
un PH entre 7 y 7.5 y una temperatura de 23 a 25 °C . Ade-
más de un suelo pobre en fósforo preferentemente , así como
un hospedero vegetal que le proporcione hidratos de carbono
para su nutrición ya que se trata de un hongo simbiote --
obligado (Nicolson , T.H., 1967) .

Con respecto al hospedero , se escogió a la alfalfa , Medicago sativa (Variedad Astro) ; es una Leguminosa que requiere para su crecimiento de un suelo profundo , con niveles altos de potasio y fósforo , así como de un buen drenaje y baja salinidad . Requiere además de un PH en el rango de 6.8-7.2 .

Se experimentó con esta Leguminosa , por considerarla como la más adecuada para nuestro trabajo ; dado que es una especie herbácea , perenne, la cual se puede observar por tiempo indefinido ; y en virtud de que en la zona no existe producción de forraje para el ganado (Hanson , C.H., 1972)

DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA :

Se usó el método de Vía-Húmeda de Walkey y Black , por ser un método rápido y eficaz , se basa en la titulación - del exceso de agente oxidante sobre la materia orgánica ; - este oxidante suele ser dicromato de potasio , únicamente - se utilizan 0.5 g de suelo . Este proceso tiene como venta ja la poca preparación de la muestra (Jackson , M.L., 1976; Chapman , H.D., y Pratt , P.F., 1976) .

DETERMINACION DE PH :

Se emplearon dos métodos para tener una relación más - confiable , el colorimétrico y el electrométrico .

En el primero se usan colorantes adecuados o indicado- res ácido-base , cuyo color cambia con la actividad del ión hidrógeno, se usa más en el campo , proporciona resultados- que están dentro de 0.3 de error ; dichas variaciones son - causadas por interferencias y errores de manejo de los indi- cadores . El segundo método está basado en un potencial - con electrodos indicativos del ión , se lee contra un elec- trodo de referencia , y el PH es más exacto (opus cit.) .

DETERMINACION DE TEXTURA :

Se usó el método del Densímetro de Bouyoucus, por considerarlo eficiente; consiste propiamente en la dispersión de las partículas del suelo (arena, limo, arcilla) eliminando los factores que determinan su agregación para realizar después un análisis granulométrico que consiste en la sedimentación diferencial de los distintos lotes o clases de partículas de suelo . Todo esto presupone el cumplimiento de la Ley de Stokes, que nos indica la velocidad de caída de las partículas en función de su radio ; debido a esta sedimentación diferencial ocurre un cambio de la concentración y de la densidad de la suspensión , hecho que se registra con la ayuda del densímetro (opus cit.) .

DENSIDAD APARENTE :

Se determinó por el método de la probeta, sabiendo que la densidad aparente es la relación que existe entre el peso de la masa del suelo y su volúmen total, tomando en cuenta el aire y el agua de sus poros . La determinación en el campo se hizo de la siguiente manera: se removió un volúmen conocido de suelo en su estado natural y posteriormente se determinó en el laboratorio su peso seco, para conocer la -

densidad en g/cc. (opus cit.) .

DENSIDAD REAL :

Se determinó por el método del picnómetro, pesando - las partículas en suspensión del suelo, dentro de un volú - men conocido . En este caso se considera únicamente a las partículas del suelo (opus cit.) .

COLOR DEL SUELO :

Se determinó con las Cartas de Colores Estándar Mun - sell, Co. Inc. (1958), estas tablas están constituidas - por 175 o 177 colores diferentes y montados sistemáticamen - te de acuerdo a las tres propiedades esenciales del color - (matiz, pureza, intensidad) .

CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO TOTAL :

Para la determinación del parámetro anterior, se usó - el método de saturación del suelo por un catión , por ser - recomendable para suelos ácidos (Método del Versenato) .

Esta técnica se basa en la saturación del suelo por - un catión índice como el NH_4 , Na , Ba , Ca, etc., lavado - del exceso de sales y determinación de la cantidad de cati - ón índice retenido (opus cit.) .

DETERMINACION DE NUTRIENTES (AMONIO , NITRATOS , FOSFORO
NITROGENO , POTASIO , CALCIO , MAGNESIO) .

La determinación de estos elementos en el suelo es esencial ya que es sabido que son constituyentes del tejido vegetal, además de que actúan como catalizadores o estimulantes . Son importantes porque ayudan a regular el contenido de ácido de las plantas , pueden afectar la presión osmótica , así como la entrada de otros elementos a la planta; o bien puede ayudar al crecimiento de la planta .

Los nutrientes señalados anteriormente se determinaron todos por el método de Morgan y otros métodos ; los cuales se describirán a continuación .

El Nitrógeno , fué determinado por el método del Macro Kjeldahl. (Vincent , J.M., 1975) .

El Fósforo , se determinó por el método de Bray y Kurtz (1945) .

El Potasio , fué determinado por el método de Fotolorimetría (Navarro , C.A., 1957) .

El Calcio y Magnesio , se realizaron por el método de Versenato por Centrifugación (Jackson , M.L., 1976) .

PROPAGACION DE BACTERIAS DE Rhizobium meliloti

Las bacterias fijadoras de nitrógeno con las cuales se llevó a cabo la simbiosis, fueron proporcionadas por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (I.P.N.), se nos dió 4 cepas bacterianas marcadas como 305, 314, 313, 312, para su propagación empleamos el medio de cultivo de Levadura-Manitol propuesto por Freed y Waskman (1975) .

La propagación se llevó a cabo, tanto en medio líquido como en sólido .

SIMBIOSIS DE LA BACTERIA - ALFALFA (EN EL CAMPO)

Se propagaron las bacterias en medio líquido dejándolas reproducir durante cuatro días a 28°C . Inmediatamente después se centrifugan las soluciones bacterianas a 3000 rev/min durante 10 min. Las células así concentradas se mantienen con una solución salina fisiológica estéril.

La operación siguiente consistió en la preparación de la semilla para la siembra (preparación del inóculo) .

Las semillas se impregnan de goma arábiga, se les adiciona turba comercial libre de microorganismos(se esterilizó con calor húmedo a 120 °C durante 15 min.) esta

turba sirve como soporte para las bacterias . Dicha operación se realizó un día anterior a la siembra .

En cuanto al terreno, se llevó a cabo la elaboración de cajetes para que haya una mayor retención de agua , se removió el suelo y se regó . Después de esto, la semilla previamente preparada con su inóculo se sembró al boleó , usando 200g por cada parcela . Esto nos da 83 Kg por Ha.

SIMBIOSIS DE LAS BACTERIAS-ALFALFA (INVERNADERO)

En el invernadero se inoculó la semilla de alfalfa con la bacteria . Se prepararon 6 macetas por cada cepa bacteriana y 4 macetas testigo ; sus dimensiones son de 20 cm de diametro por 24 cm de largo (profundidad) .

Las macetas fueron llenadas con aproximadamente 7 Kg de suelo, colectado de la parcela experimental, el cual se utilizó sin esterilizar. La inoculación se realizó de la misma manera que en el campo. Se agregó por cada maceta 40 semillas , se hizo un aclareo después, dejando 10 plantas por maceta , dado que el espacio era pequeño para 40 plantas , se procuró dejar un número adecuado de ellas para que su crecimiento fuera más favorable .

OBTENCION DE LOS SUEROS PARA LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS EN LOS NODULOS DE LAS PLANTAS .

Se sabe que la superficie de las células bacterianas son portadoras de antígenos que pueden reconocerse por su capacidad para producir anticuerpos en mamíferos . En este conocimiento se basa la técnica empleada para la identificación de bacterias que se encuentran en los nódulos de las raíces de las plantas . Esto es debido a la especificidad que presenta el anticuerpo para cada tipo de cepa bacteriana , que provocó su producción .

Para la preparación del inóculo se propagaron las bacterias en medio sólido, con diluciones muy bajas de bacterias . Con el asa bacteriológica estéril se toman las bacterias, se diluyen con 10 ml de solución salina al 0.85 % estéril en un tubo de ensaye, se tomó 1 ml de la solución , previamente homogeneizada y se agrega a otro tubo de ensaye que contiene 9 ml de solución salina(Vincent , 1975) .

Se repitieron los pasos anteriores con las colonias obtenidas . Este cultivo fué hecho para tener colonias completamente aisladas y con una alta probabilidad de que la colonia formada derivara de una sola célula ; con esto -

se obtiene una mayor confiabilidad en el clonado .

Así, la colonia aislada , que se obtiene por cada cepa fué propagada en tubos de ensaye con el tipo de medio sólido , durante 48 horas , incubadas a 28 °C y puestas después a 4 °C para ser usadas como "stock" .

Con los tubos usados como "stock" , se realizó la - propagación de las bacterias de Rhizobium meliloti de las 4 cepas en medio líquido, sembrando 5 frascos para cada cepa con la finalidad de asegurar la cantidad de antígeno necesaria y prevenir la posible pérdida por contaminación .

Teniendo un desarrollo poblacional alto después de 4 - días, la solución bacteriana se centrifuga a 6000 rev/min , durante 10 min para concentrar las células , y después son resuspendidas con una solución salina fisiológica estéril.

Esta suspensión fué calentada a baño maria hasta el - punto de ebullición durante 30 min con el fin de destruir - los antígenos flagelares dado que se obtiene mayor especificidad por parte de antígenos somáticos para la identificación de cepas (Vincent, 1975 ; Dudman , 1964) .

Se vuelve a centrifugar la solución para eliminar los - flagelos, quedando en el fondo las partes de las células -

(la membrana celular) a las cuales se les agrega solución salina estéril para poder recogerlas y ser inyectadas después de que se hayan contado .

Las bacterias fueron contadas por el método de Mc. Farland (1976), que se fundamenta en la medición de la turbidez producida por la reacción de las soluciones de ácido sulfúrico y cloruro de bario en diferentes concentraciones y comparandolas con la turbidez de la suspensión que contiene las bacterias . (Fig. 4) .

A los conejos inoculados se les aplicó las siguientes concentraciones bacterianas en 4 días sucesivos .

1er. día	cepa	305	4.875×10^9	bacterias / ml	
	cepa	314	4.830×10^9	"	"
	cepa	313	4.890×10^9	"	"
	cepa	312	4.800×10^9	"	"
2do. día	cepa	305	15.378×10^9	"	"
	cepa	314	14.94×10^9	"	"
	cepa	313	14.84×10^9	"	"
	cepa	312	14.95×10^9	"	"
3er. día	cepa	305	30.00×10^9	"	"
	cepa	314	30.22×10^9	"	"

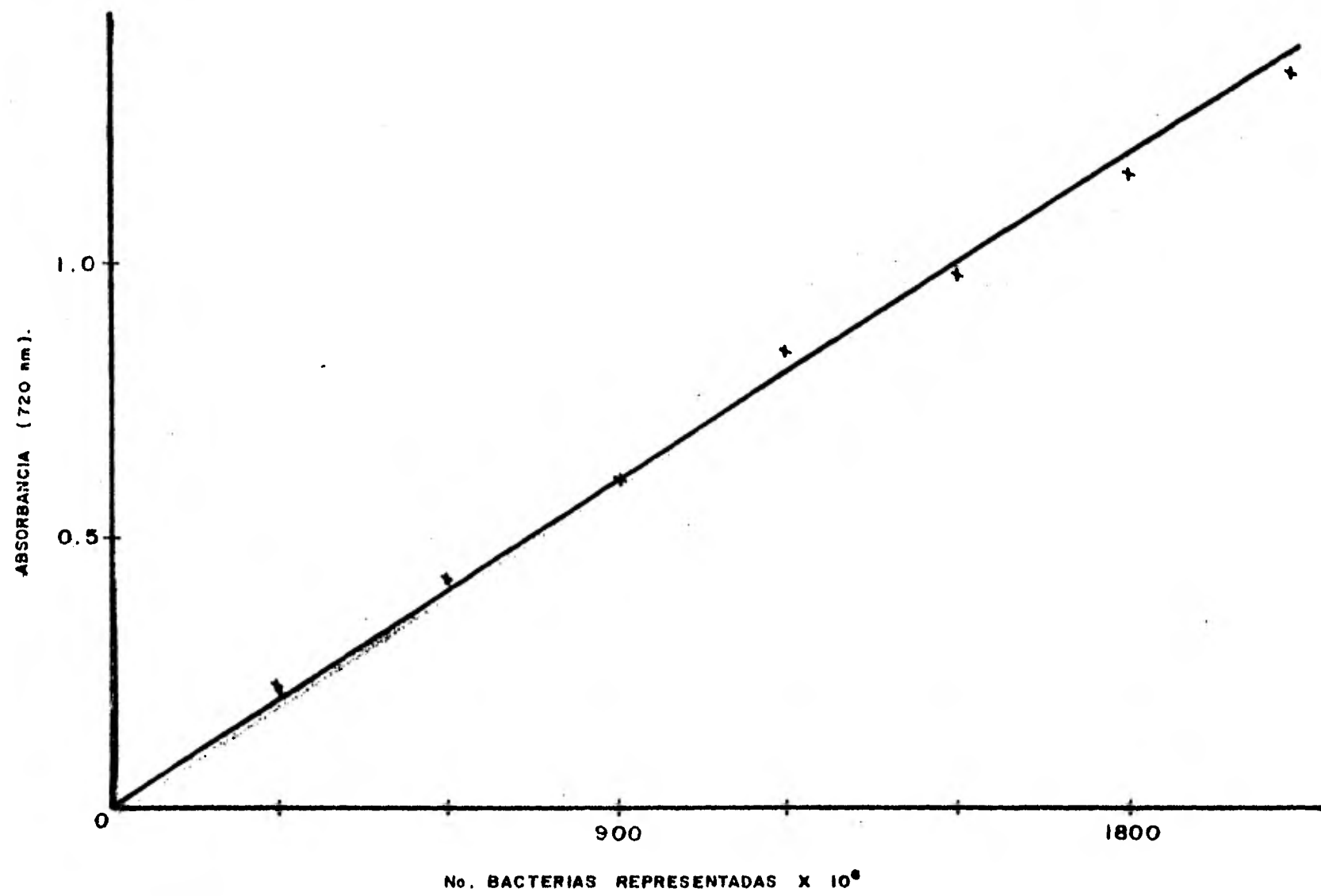


FIG. 4. CURVA ESTANDAR DE SUSPENSIONES BACTERIALES POR EL METODO DE Mc FARLAND.

	cepa	313	30.27 x10 ⁹	bacterias / ml		
	cepa	312	30.04 x10 ⁹	"	"	
4to. día	cepa	305	40.5 x10 ⁹	"	"	
	cepa	314	48.75 x10 ⁹	"	"	
	cepa	313	47.25 x10 ⁹	"	"	
	cepa	312	40.95 x10 ⁹	"	"	

La inoculación de los conejos se hizo vía endovenosa - (en la vena marginal de la oreja) se utilizó cloroformo como vaso dilatador. El inóculo se preparó diariamente .

Diez días después de la última inyección se aplicó una dosis de activación cuya solución bacteriana era de 3 cc.

A la semana de lo hecho anteriormente se mata el animal y se recoge toda la sangre . Para la extracción de la sangre se mata al conejo asfixiándolo en un recipiente grande con cloroformo (algodón empapado) enseguida se hace un corte para abrir cerca de la cavidad torácica , se cortó la vena cava inferior y se recogió la sangre rápidamente para evitar la coagulación en el interior del conejo o en la jeringa . La sangre se colocó en tubos estériles y se pusieron en baño maría a 37 °C durante 1 hora para facilitar la coagulación de la sangre . Se fracciona el coágulo y se in

cuba a 20 °C durante media hora, para facilitar la exuda -
ción del suero . Después de esto, se separa el coágulo -
por centrifugación a 3000 rev/min durante 5 min . El suero
limpio se conservó en una solución concentrada de 0.05 % de
fenol a una temperatura de 4 °C .

PROPAGACION DEL HONGO Glomus fasciculatus

Dicho hongo fué proporcionado por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del (I.P.N.), en la siguiente forma.

Se nos proporcionó 1 Kg de suelo con esporas del hongo , para su propagación se utilizaron como hospederos vegetales (alfalfa, cebolla y cebada), con la finalidad de comparar cual es más apto para desarrollar la infección , y obtener esporas para la inoculación de alfalfa ; y la alfalfa como hospedero para determinar si se da la asociación con el hongo y así proseguir con el trabajo . Para ello usamos dos dispositivos : el primero llamado Botella invertida , y el segundo llamado Jarra - Botella de Leonard , el cual lleva una solución nutritiva.. - Ver fig. 5 y 6 (Vincent , -- J.M., 1975) .

En cuanto al sembrado de los hospederos vegetales se llevó a cabo de la siguiente forma :

Se usaron 10 envases de cerveza tamaño familiar color-
ambar y sin fondo . Se les tapó la parte superior con algodón para usarse como macetas, se añadió arena de río a estas y se taparon con papel aluminio, después se esteriliza-

FIGURA 5.

DISPOSITIVO DE LA BOTELLA INVERTIDA.

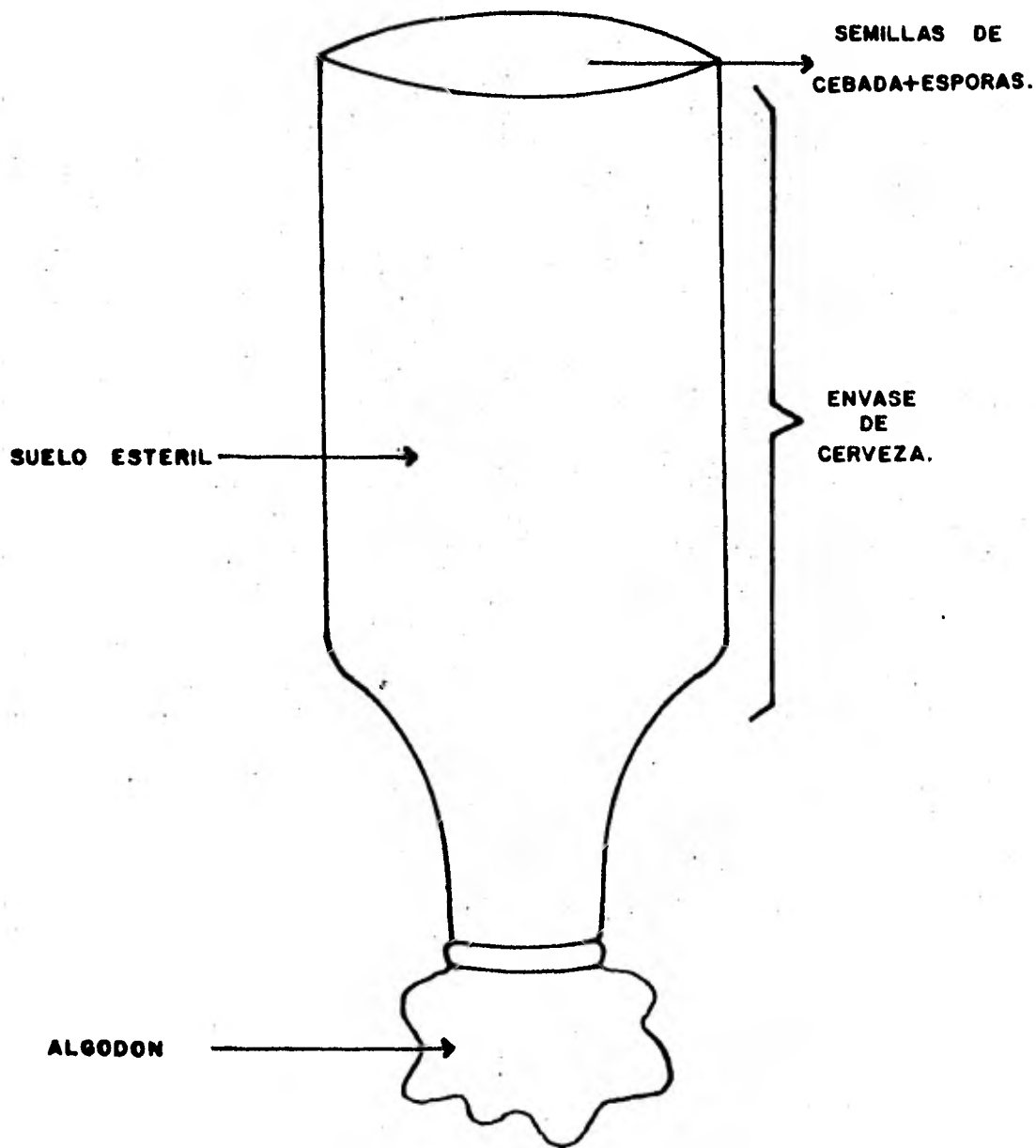
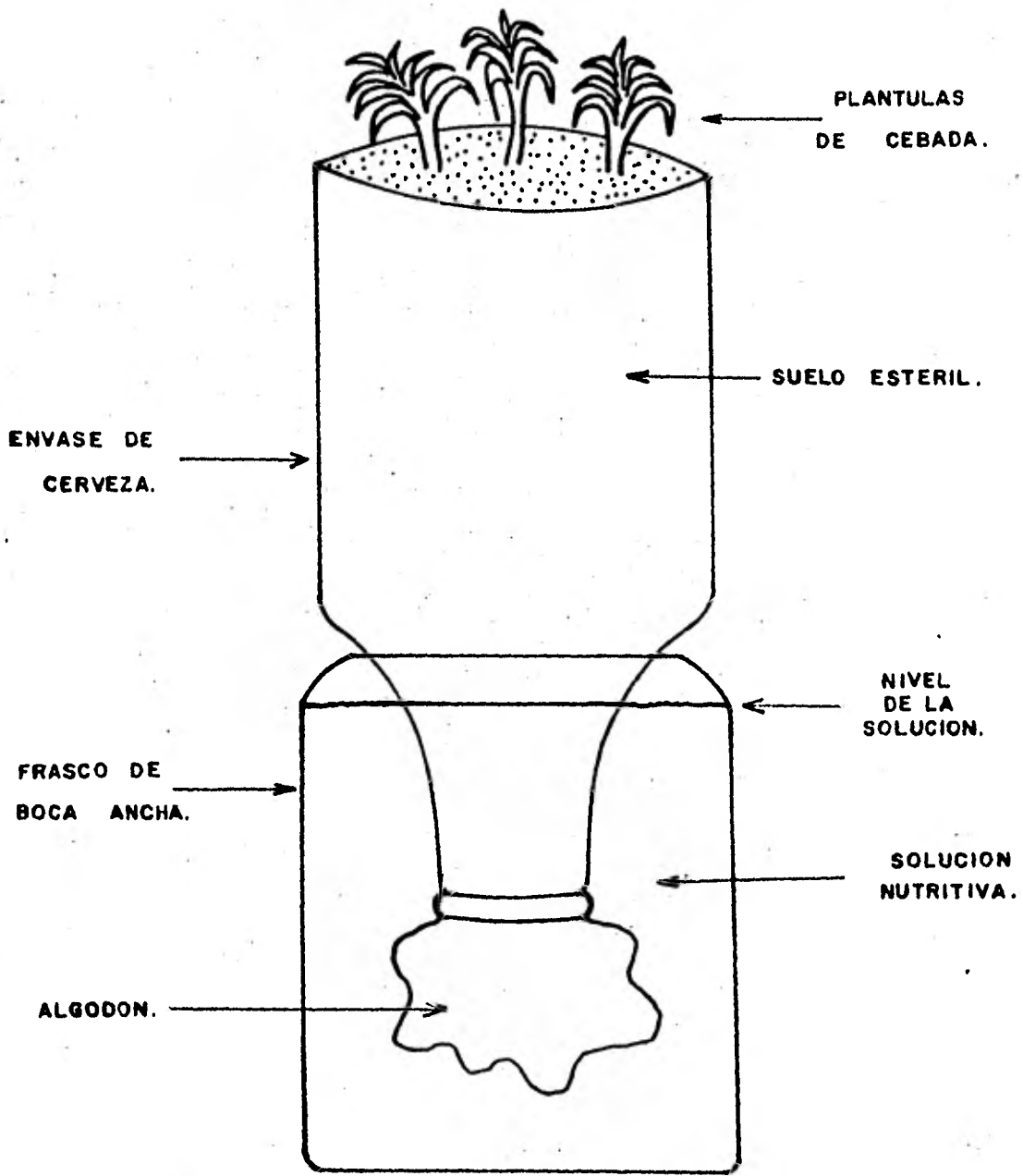


FIGURA 6.

DISPOSITIVO DE LA JARRA BOTELLA DE LEONARD.



ron . Ya frío el suelo (arena de río) se siembran las semillas de cebolla y cebada previamente desinfectadas con cloruro de mercurio al 10 % . Se colocaron 10 semillas por cada envase, posteriormente se riegan con agua destilada estéril y se dejan germinar tapadas con papel aluminio para evitar la entrada de otros microorganismos .

A los 10 días se añaden las esporas del hongo y medio de Jensen para plántulas (Vincent , J.M., 1975) .

Una vez germinadas las semillas, los dispositivos de Botella invertida, se trasladan a una pecera de vidrio (50 cm de ancho y 120 cm de profundidad) con la finalidad de que tenga luz . La pecera fue esterilizada previamente con alcohol y calor para evitar la contaminación por otros microorganismos ; dicha pecera se tapó muy bien con un plástico estéril . En estas condiciones las plántulas se dejan crecer durante un mes .

Los dispositivos de la Jarra - Botella de Leonard se mantuvieron a medio ambiente , sin utilizar la pecera .

EXTRACCION DE ESPORAS POR EL METODO DE TAMIZADO HUMEDO

En condiciones estériles se hace una suspensión de -
aproximadamente 200 ml de suelo en 500 ml de agua destilada
se agita constantemente hasta la disolución completa de par-
tículas más grandes y se dejan sedimentar , posteriormente-
esto es pasado a un tamiz de 841 micras, donde se retienen-
las partículas de mayor tamaño y el filtrado se recoge en -
un recipiente estéril . Este líquido es pasado nuevamente-
por otro tamiz de malla más fina de 44 micras, el líquido -
filtrado es eliminado, dado que las esporas quedan reteni -
das en el tamiz ; a este se le hace un lavado de manera --
que no se pierdan las esporas , dejando aproximadamente -
unos 25 ml de agua para que las esporas en solución sean re-
cogidas en un vaso de precipitados (Sutton , 1972) .

CONTEO DE ESPORAS

Una vez que las esporas han sido obtenidas por el mé -
todo de tamizado húmedo, la solución en que se encuentran -
se agita vigorosamente hasta homogenizarla, luego se toma -
1 ml de la muestra y se coloca en una caja de Petri para -

ser observadas al microscopio . Así pues , el número de -
esporas observadas en 1 ml se toman como referencia para -
agregárselas a las macetas con las plántulas . De esta ma-
nera fué como se determinó la cantidad de esporas añadidas-
a cada una de las macetas .

TINCIÓN DE LAS RAICES POR LA TÉCNICA DE PHILLIPS Y HAYMAN - (1970) .

Las raíces de las plantas se sacaron de los dispositi-
vos para ver el grado de infección por el hongo , el proce-
dimiento consistió en lo siguiente :

Se colectó suelo de alrededor de las raíces de las -
plantas hospederas . Se tomaron 200 ml de suelo y se disol-
vieron en 300 ml de agua , el material radicular se lava -
dentro de la suspensión para dejar ahí las posibles esporas
que queden adheridas , la solución del suelo se agita vigo-
rosamente para permitir que las partículas gruesas sedimen-
ten bien, después se pasó a un tamiz de 841 micras . Este-
proceso se repite una vez más , la suspensión es colectada-
y pasada a otro tamiz de 44 micras , las partículas ahí re-
tenidas se lavan con agua destilada y se recogen en un vaso.

En cuanto a la tinción, se usaron segmentos o raíces - completas frescas o fijadas en (F.A.A.)[&], se calentaron a 90 °C en KOH al 10 % durante una hora, esto es para remover el citoplasma del hospedero y la mayor parte de los núcleos ya que las raíces se clarifican y el cilindro vascular se - hace distintivamente más visible .

Las raíces se sumergieron luego en agua y se acidificaron con HCl al 1 % durante unos segundos, después se tife - ron con azul de tripano al 0.05 % en lactofenol y luego se - le retiró el exceso de colorante con lactofenol .

Enseguida del paso anterior , los segmentos radícula - res se montaron en portaobjetos temporalmente en lactofenol y se presionaron ligeramente (squash) con el cubreobjeto , - se hicieron observaciones al microscopio .

& = formol - ácido acético - etanol .

IDENTIFICACION DE ESPORAS

Como ya se mencionó anteriormente el hongo Glomus fasciculatus, pertenece a la familia Endogonáceae , por lo que para su identificación se utilizó una clave correspondiente a dicha familia .

- a) Con un gotero se tomó una muestra de 1 ml y se colocó - en una caja de Petri, se observó al microscopio .
- b) La observación de las esporas consistió en ver sus características tales como la forma del cuerpo; si es grande, es férica o irregular, sus hifas de sostén, contenidos vacuolares , su color (que va desde el hialino a café rojizo) .

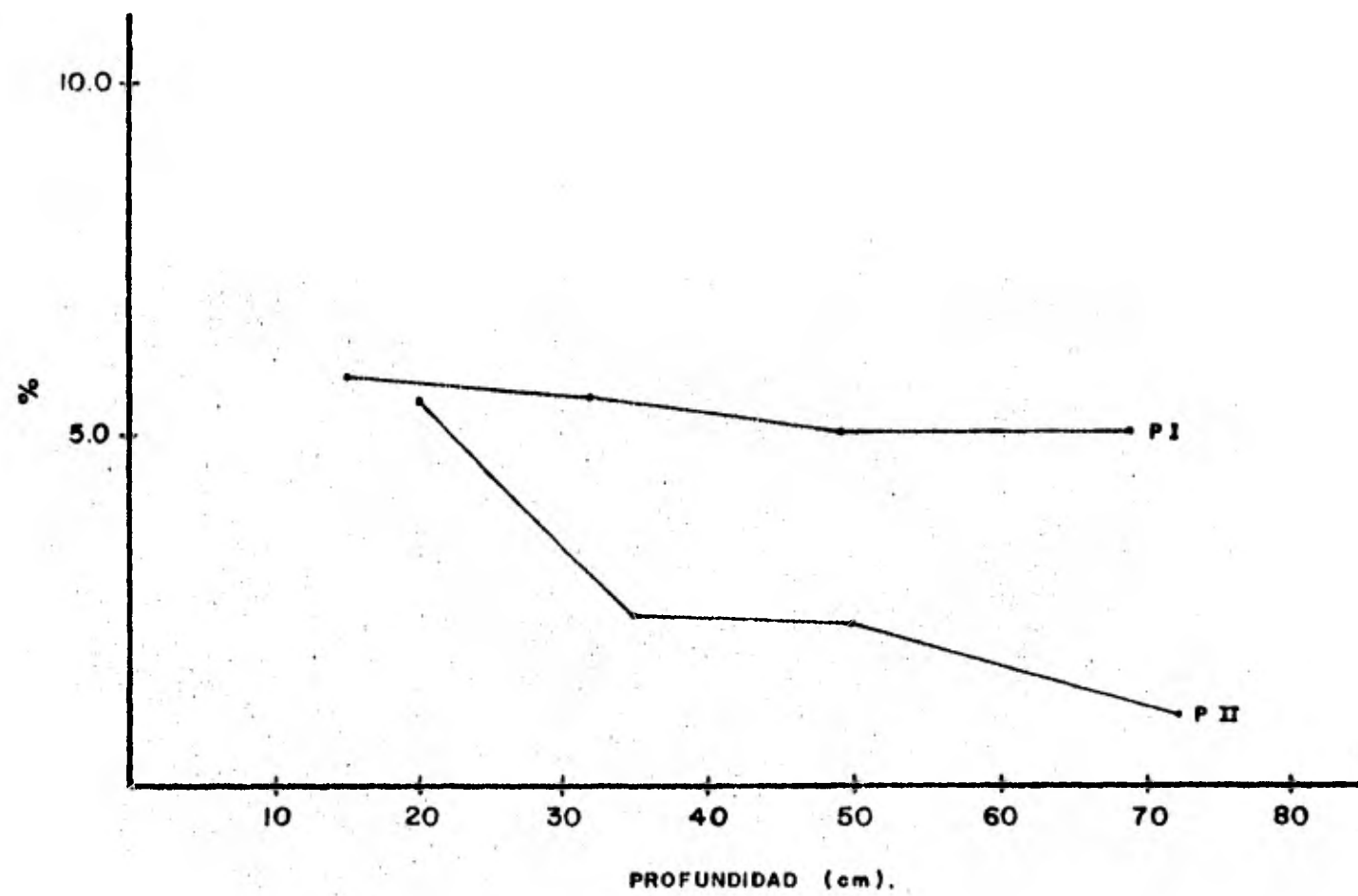
Después de la primera observación, se realizó otra, - las esporas de la caja de Petri se pasaron a un vidrio de - reloj para verse a una mayor amplificación y corroborar las características mencionadas .

Se analizaron las siguientes características :

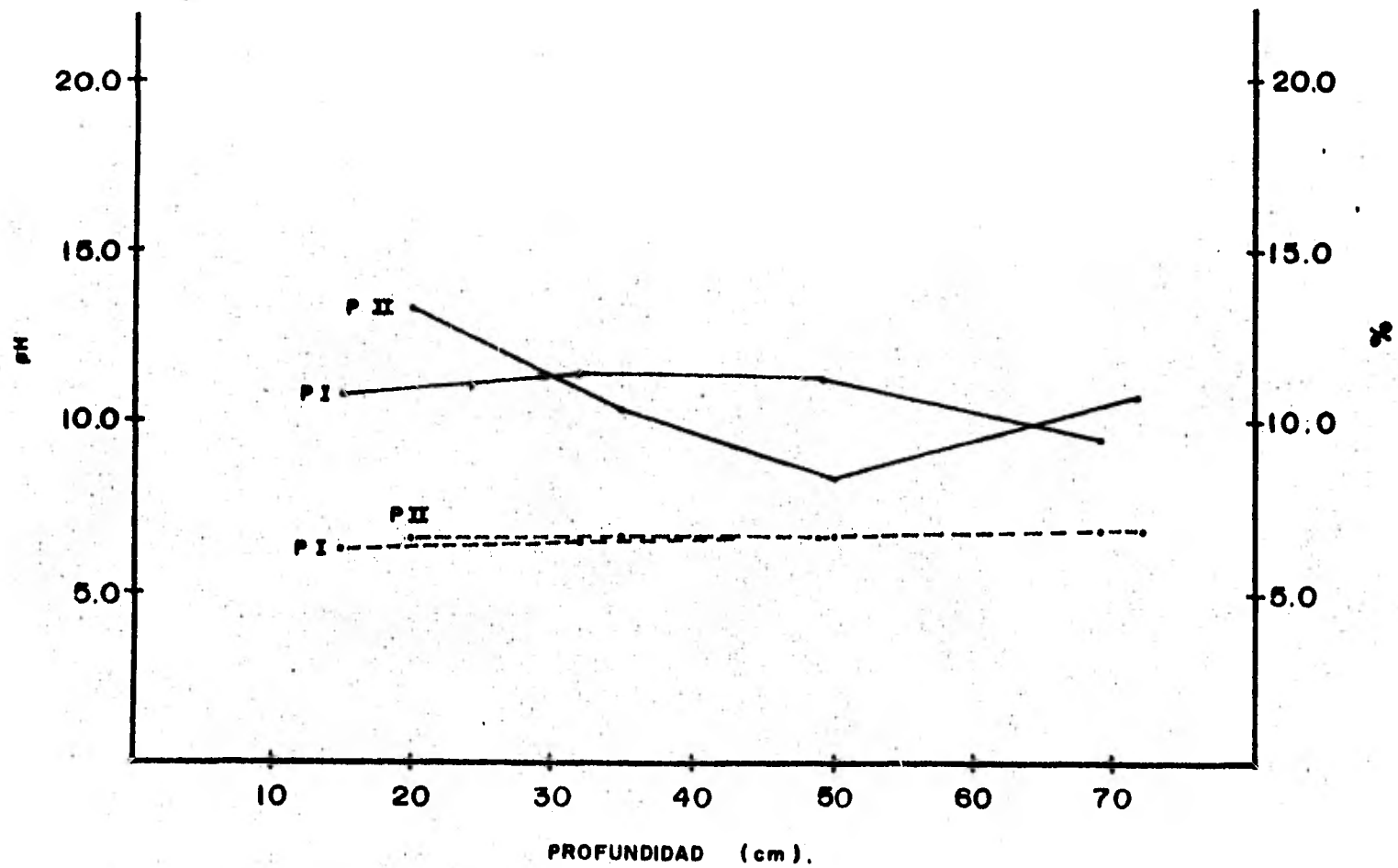
Forma del cuerpo, tamaño, color, número y naturaleza - de sus paredes que pueden ser gruesas, lisas, delgadas o - adornadas; la naturaleza de las hifas de sostén y base de - la espora (simple, hinchada, bulbosa) el tipo de poro (si - es ocluido o no) .

RESULTADOS DE PARAMETROS FISICOS Y QUIMICOS DEL SUELO.

PERFIL I	PROFUNDIDAD	COLOR EN SECO	COLOR EN HUMEDO	DENSIDAD APARENTE g/cc	DENSIDAD REAL g/cc	HUMEDAD %	pH	MATERIA ORGANICA %	ARENA %	LIMO %	ARCILLA %	TEXTURA	CALCIO meq/100 g	MAGNESIO meq/100 g	C.I.C.T. meq/100g	NITROGENO %	FOSFORO %	POTASIO %
1.1	0-15	10 YR 4/1 GRIS OSCURO	10 YR 3/1 GRIS MUY OSCURO	1.14	2.25	10.92	6.3	5.8	38	18	44	ARCILLA	19.6	4.6	31.4	MEDIO 0.038	MUY ALTO 0.05	MEDIO ALTO 0.180
1.2	15-32	10 YR 5/1 GRIS	10 YR 3/1 GRIS MUY OSCURO	1.16	2.27	11.41	6.4	5.5	26	72	2	MISAJON LIMOSO	30.0	2.6	33.2	MEDIO 0.035	MUY ALTO 0.05	MEDIO ALTO 0.180
1.3	32-49	10 YR 4/2 CAFE GRIS OSCURO	10 YR 4/3 CAFE OSCURO	1.08	2.37	11.30	6.5	5.0	62	44	4	MISAJON LIMOSO	16.6	13.9	30.9	MEDIO 0.035	MUY ALTO 0.05	MEDIO ALTO 0.180
1.4	49-69	10 YR 4/3 CAFE OSCURO	10 YR 4/4 CAFE ANARILLO OSCURO	0.98	2.16	9.36	6.7	6.0	50	48	2	MISAJON LIMOSO	16.5	12.6	29.2	MEDIO 0.035	MUY ALTO 0.05	MEDIO ALTO 0.180
PERFIL II	PROFUNDIDAD	COLOR EN SECO	COLOR EN HUMEDO	DENSIDAD APARENTE g/cc	DENSIDAD REAL g/cc	HUMEDAD %	pH	MATERIA ORGANICA %	ARENA %	LIMO %	ARCILLA %	TEXTURA	CALCIO meq/100 g	MAGNESIO meq/100 g	C.I.C.T. meq/100g	NITROGENO %	FOSFORO %	POTASIO %
2.1	0-20	10 YR 5/1 GRIS	10 YR 3/1 GRIS MUY OSCURO	1.28	2.21	13.19	6.4	5.24	64	6	10	MISAJON ARENOSO	6.2	0.2	60.6	0.0371	0.0044	1.10
2.2	20-35	10 YR 5/1 GRIS	10 YR 3/1 GRIS MUY OSCURO	1.15	2.26	10.30	6.5	2.48	66	6	6	MISAJON ARENOSO	4.8	4.0	31.6	0.0114	0.0000	0.97
2.3	35-50	10 YR 5/2 CAFE BRNACEO	10 YR 4/2 CAFE GRIS OSCURO	1.11	2.35	6.12	6.5	2.28	26	66	6	MISAJON LIMOSO	5.6	3.2	36.9	0.0164	0.0000	1.12
2.4	50-72	10 YR 4/2 CAFE GRIS OSCURO	10 YR 4/3 CAFE OSCURO	1.05	2.31	10.7	6.7	1.0	42	54	4	MISAJON LIMOSO	5.6	3.2	40.8	0.0042	0.0000	1.07



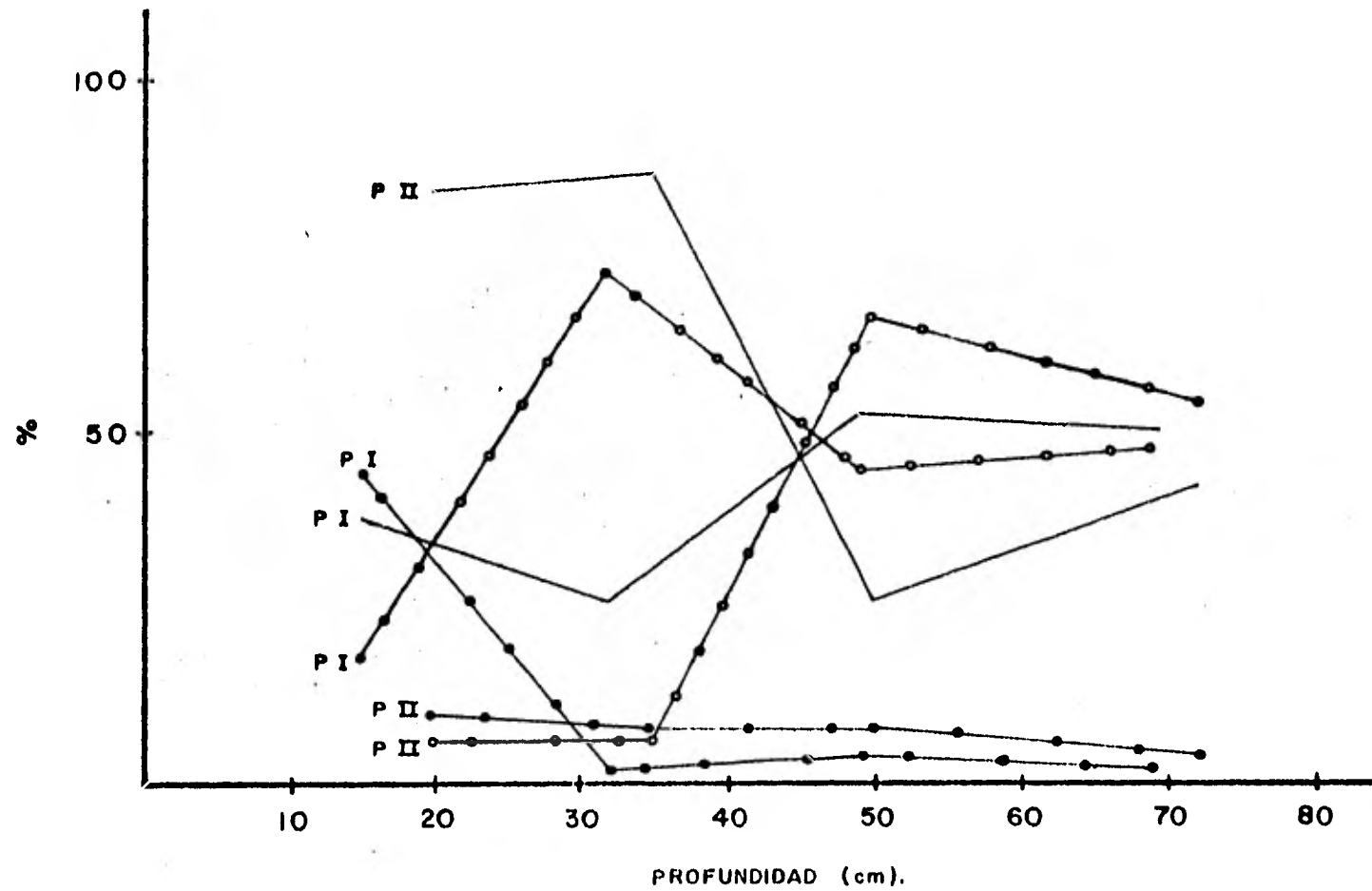
% DE MATERIA ORGANICA.



% HUMEDAD ———

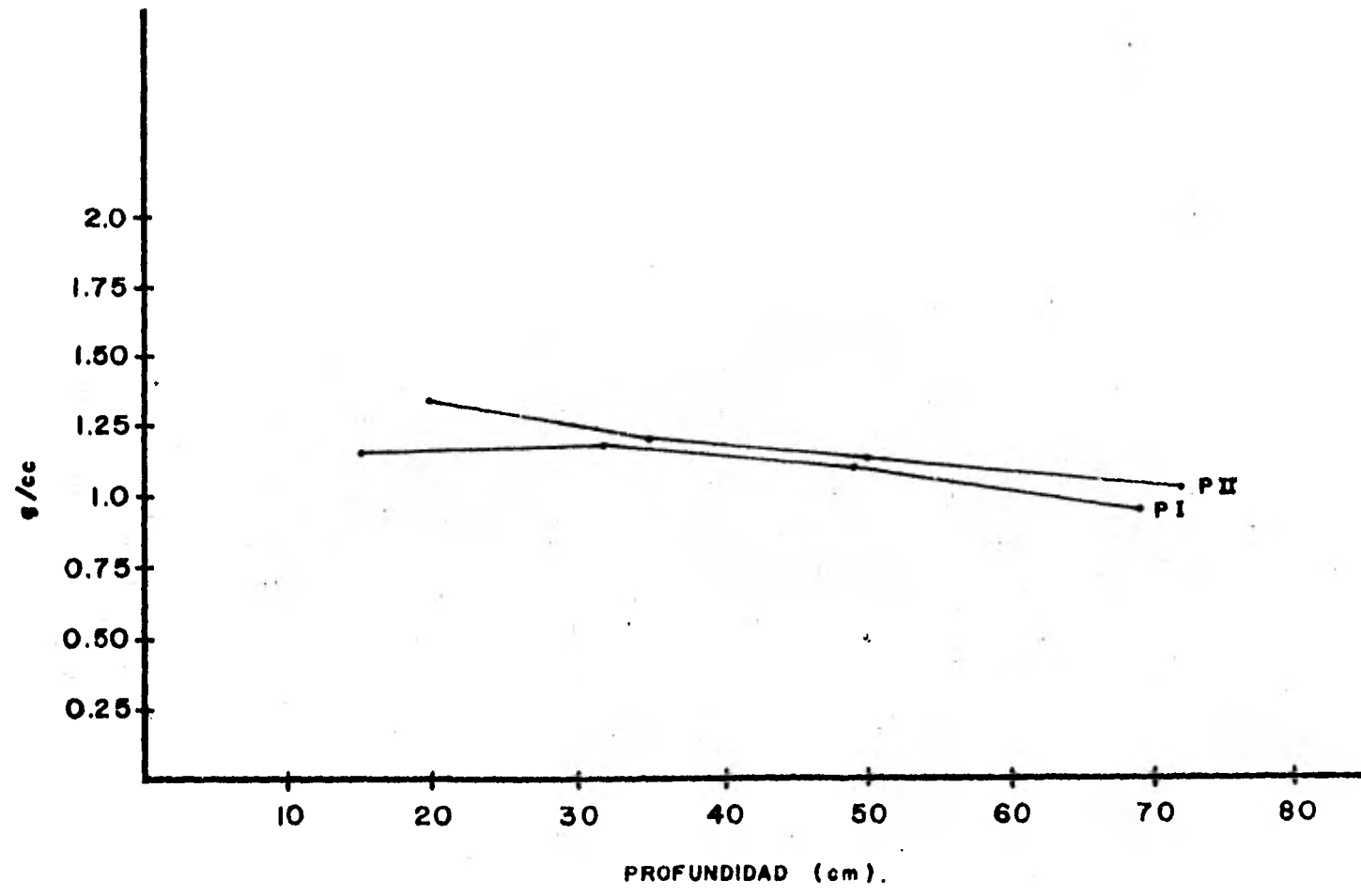
pH - - - - -

RELACION DEL pH CON % DE HUMEDAD.

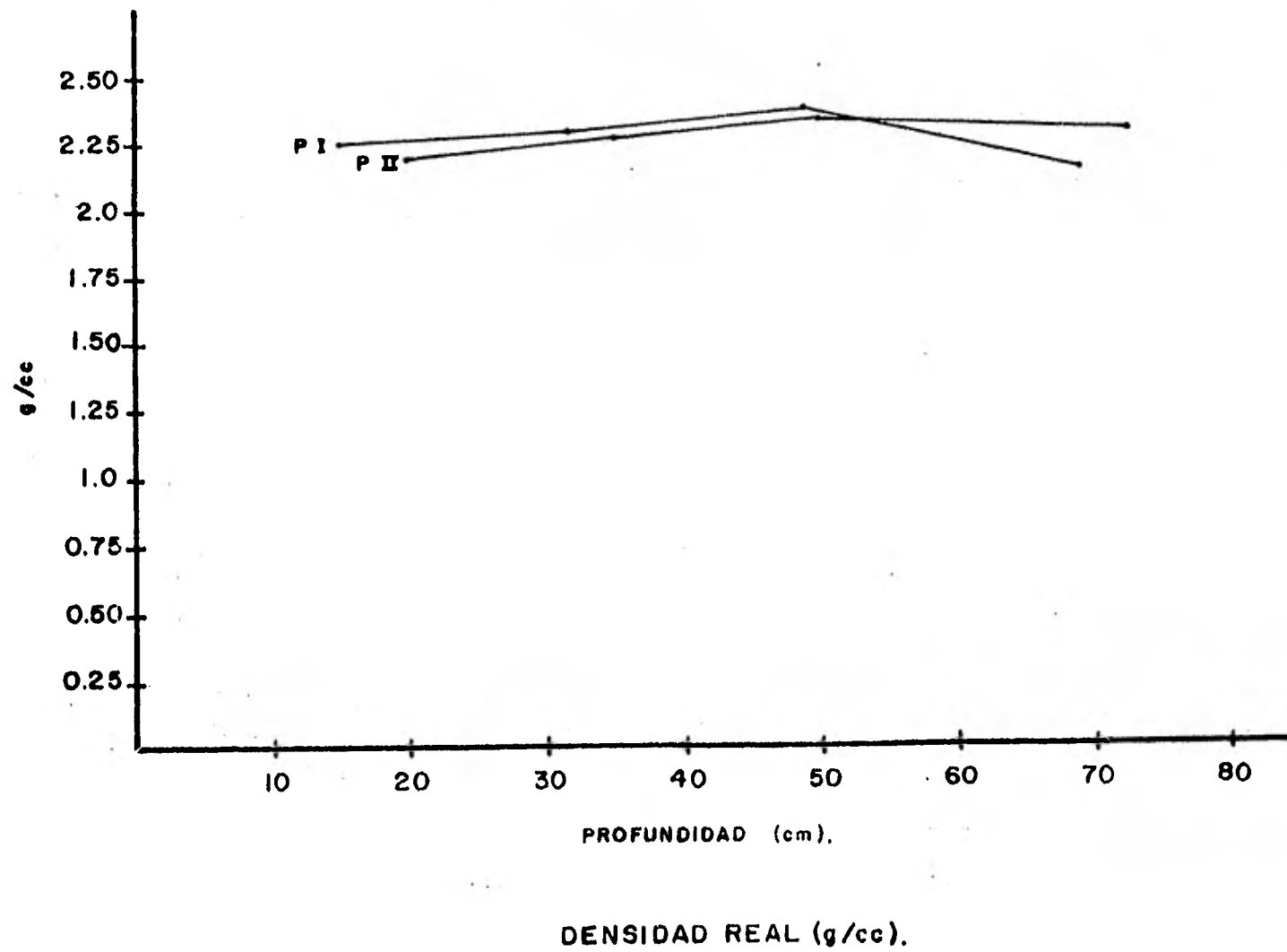


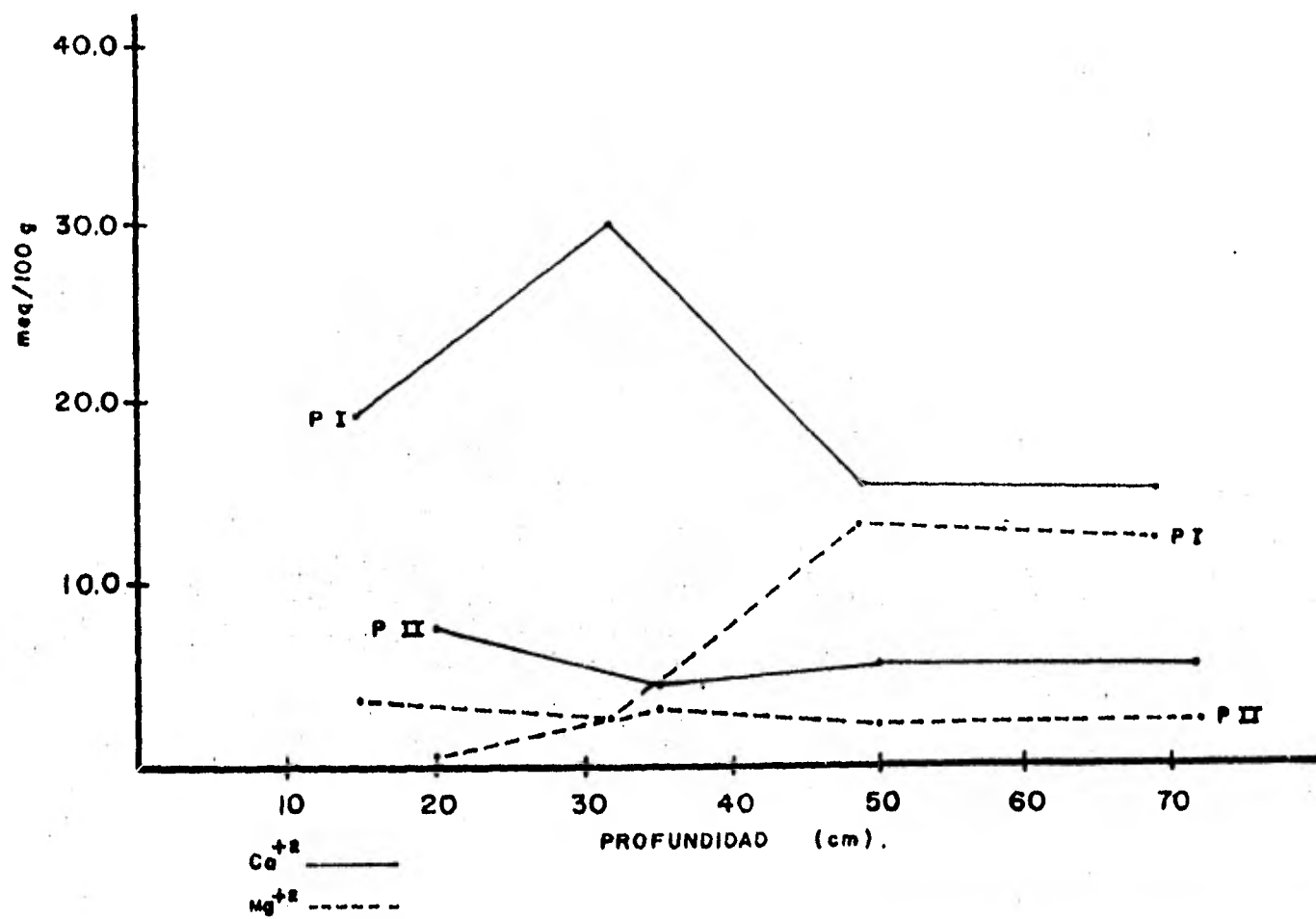
% LIMO ○—○
 % ARENA ———
 % ARCILLA ●—●

TEXTURA.

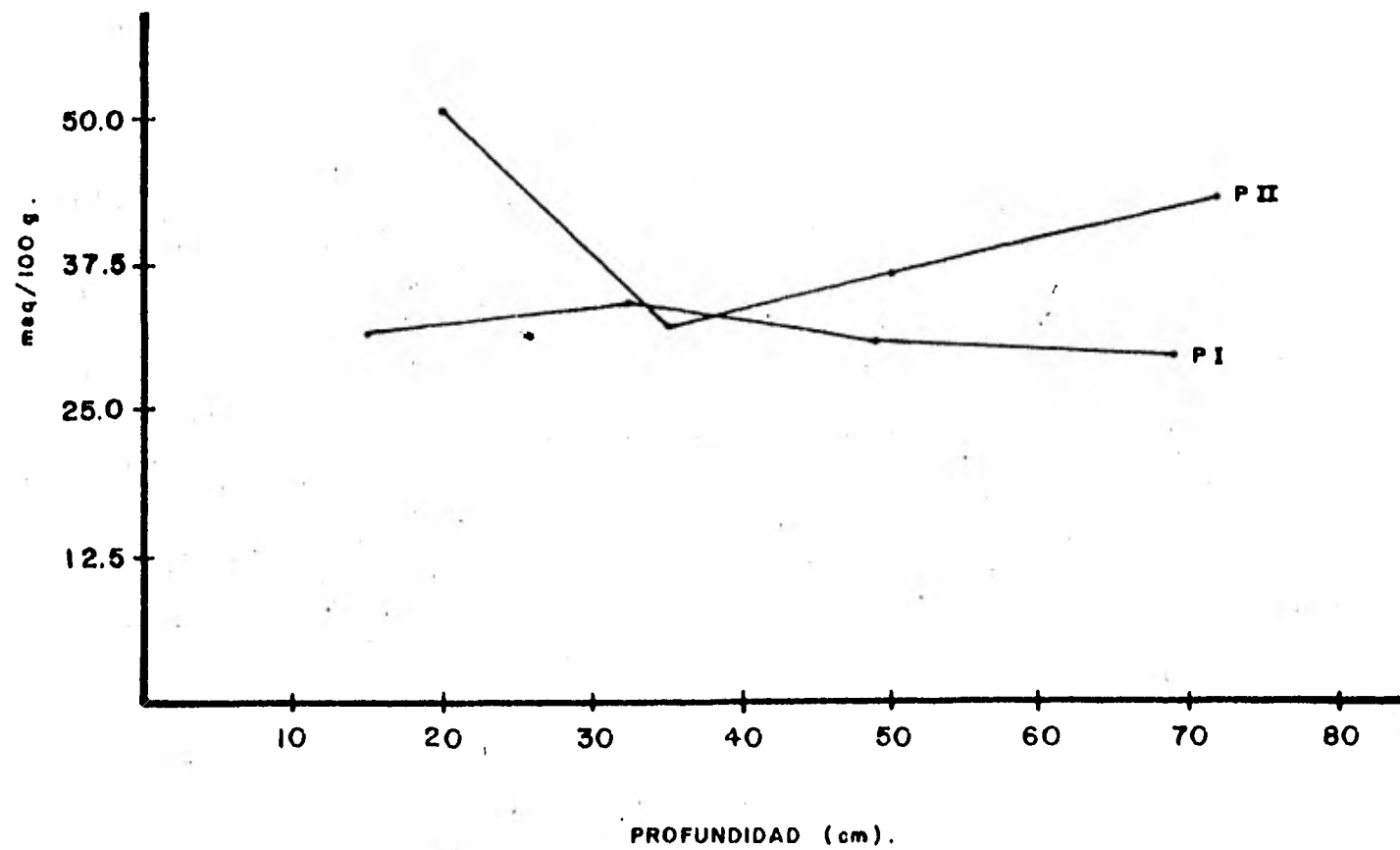


DENSIDAD APARENTE (g/cc).

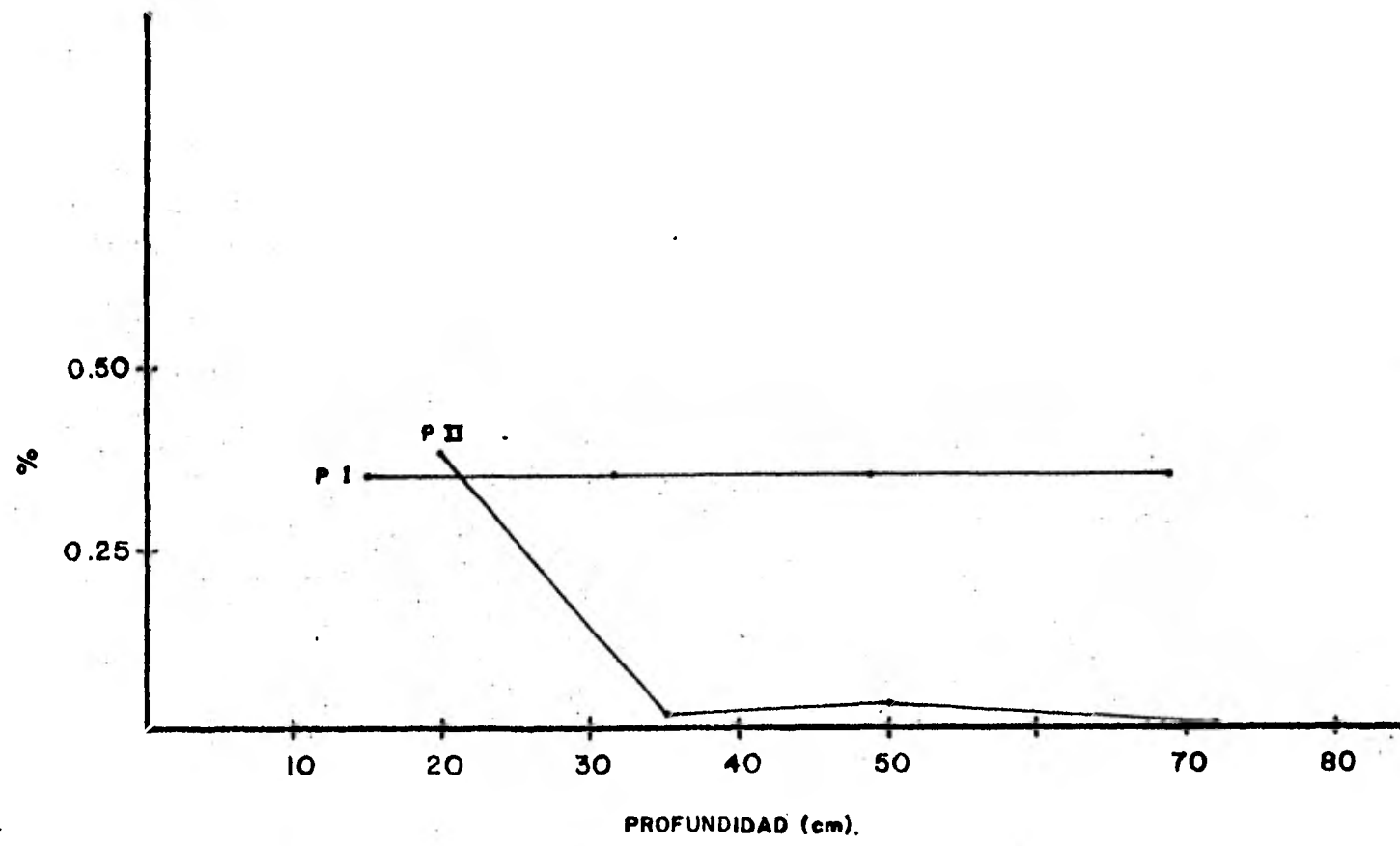




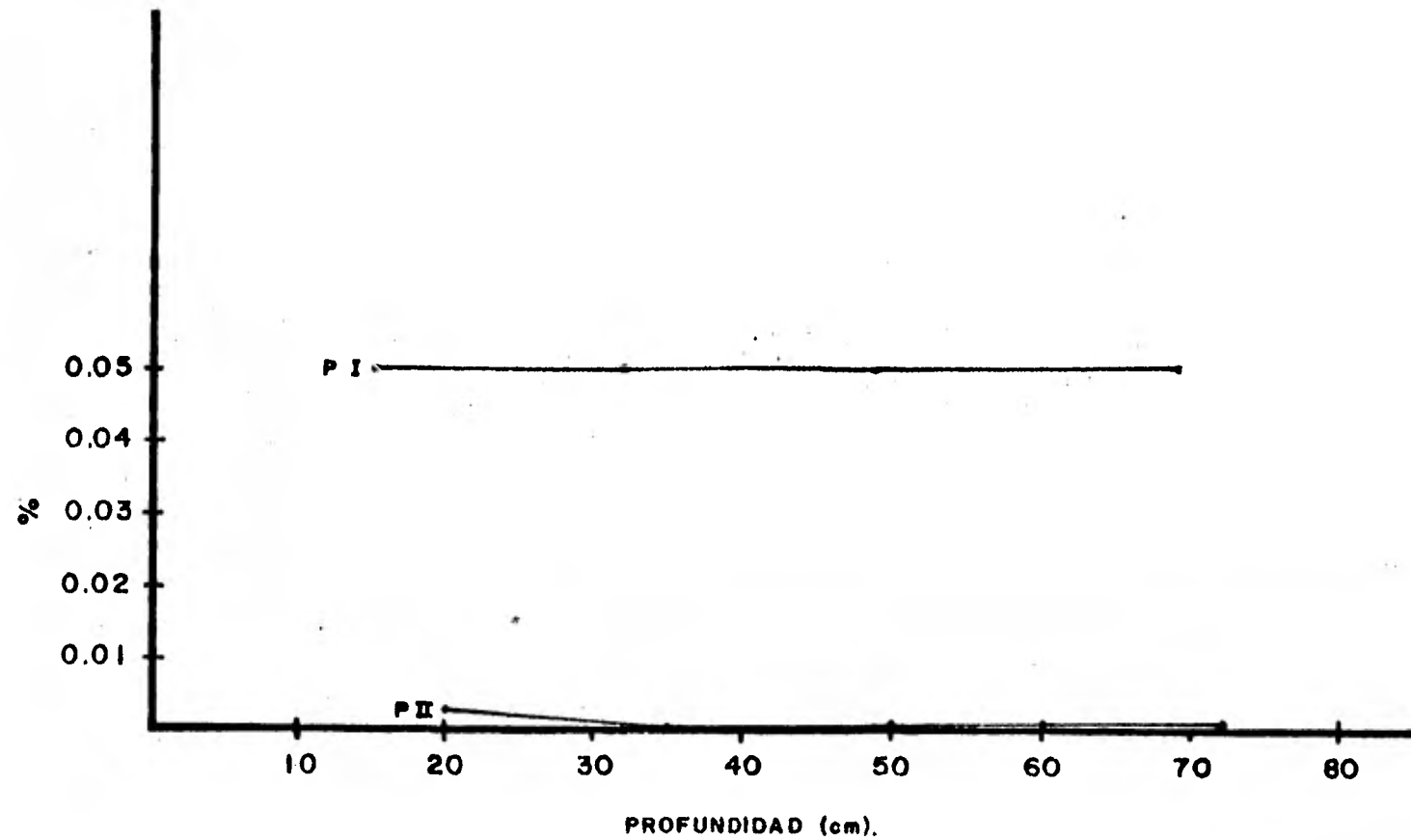
CALCIO Y MAGNESIO (meq/100g de suelo).



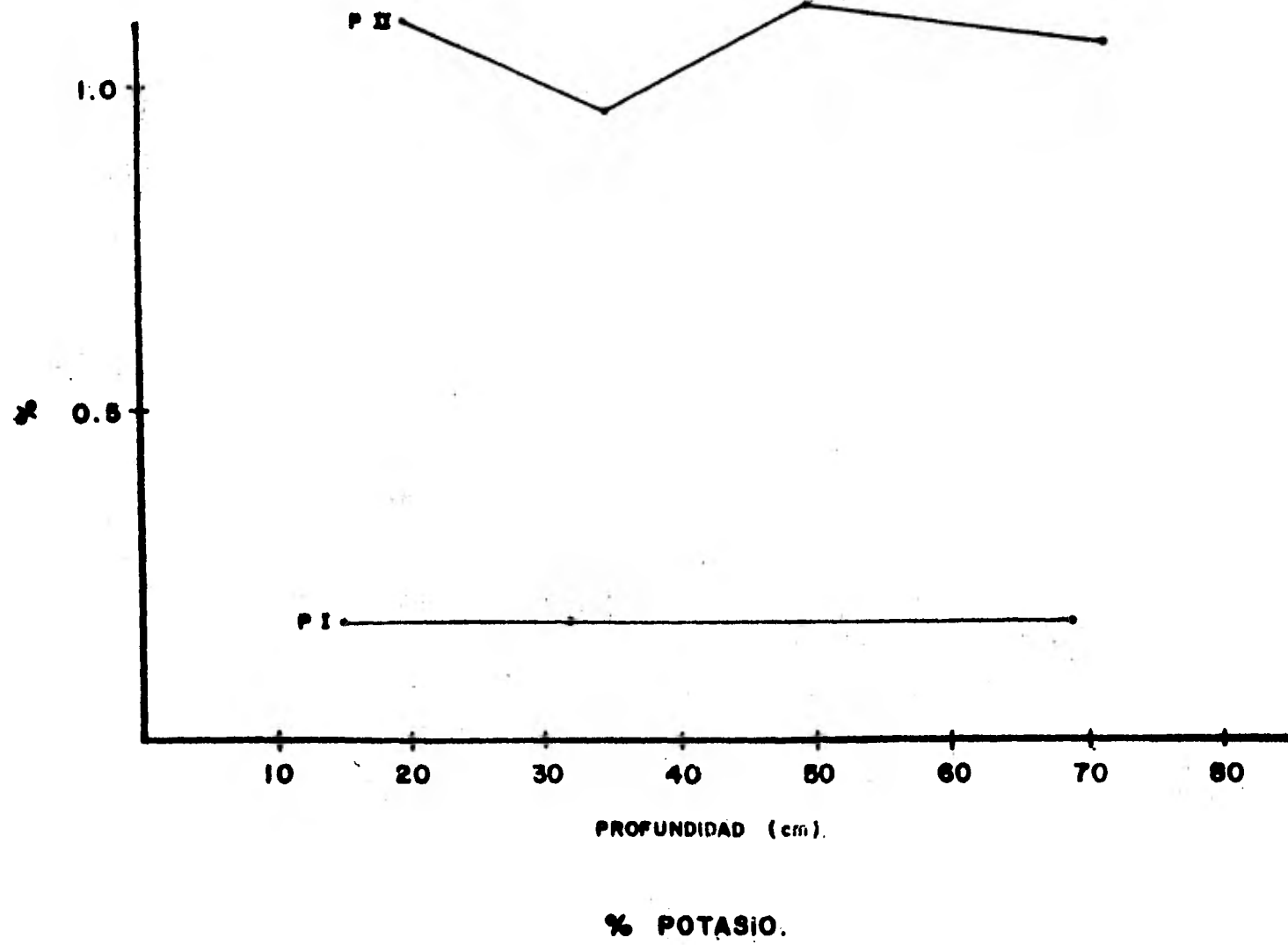
C. I. C. T. (meq/100 de suelo).



% DE NITROGENO.



% FOSFORO.



RESULTADOS DE LA SIMBIOSIS BACTERIANA .

Se midió la talla de las plantas de alfalfa en las 5 parcelas en el campo y todas las macetas en el invernadero . Se contaron los nódulos de cada una de las plantas que se muestrearon en el campo y en el invernadero.

Para la medición de la talla se consideró de la corona de la planta hasta las puntas de las ramas .

En cuanto al conteo de nódulos se hizo de la siguiente forma para el campo : se extraen 50 plantas al azar en diferentes puntos de la parcela, el área considerada por cada extracción es el de la pala (20 x 20 cm), solo se cuentan los nódulos de una sola planta de cada extracción , Esto se repite para cada una de las 5 parcelas .

En el caso del invernadero se muestrearon todas las plantas de las macetas, contando el total de plantas pertenecientes a cada cepa , lo mismo se hizo con las plantas testigo .

Con respecto al peso de las plantas, solo consideramos adecuado pesar las del invernadero; puesto que aquí -

no hubo alteraciones de los factores climáticos , ya que - las condiciones de estos fueron constantes ; de tal manera que no se vió afectado el crecimiento por este aspecto.

Sin embargo en el campo, la variación de estos factores fue muy extremosa , dado que el cultivo recibió dos - temporadas totalmente diferentes, una de sequía y otra de lluvia abundante, con lo cual se alteró mucho el crecimiento de las plantas . Por tanto el peso de las plantas en - el campo no se obtuvo.

El resultado en peso seco de las plantas en el inver-

nadero son :	cultivo	No. de plantas	peso seco(g)
	Testigo	26	47.122
	305	24	51.694
	312	20	152.629

El conteo de nódulos se hizo para cada planta, considerando únicamente los nódulos adheridos a las raíces .

Ver los datos de nodulación y talla en el Apéndice A.

A los resultados obtenidos se les dió una interpretación estadística , utilizando contraste de hipótesis para-diferencia de medias (Erwin, K. , 1976) entre las plan-

tas testigo y las problema ; además se aplicó el análisis-estadístico de T de student (opus cit.), para obtener un grado de aceptación o de rechazo de las hipótesis anteriormente mencionadas para las medias poblacionales .

Ver fórmulas y planteamiento de las hipótesis en el -
Apéndice B .

PROPAGACION Y SIMBIOSIS MICOTICA

En cuanto a la propagación del hongo con el dispositivo de la botella invertida se obtuvieron resultados positivos con un solo hospedero (cebada) .

Con el dispositivo de la jarra botella de Leonard la propagación fue nula .

Con respecto a la simbiosis del hongo con la alfalfa y la bacteria no se llevó a cabo debido a la pérdida de muchas esporas del hongo Glomus fasciculatus , cuando se experimentó con el dispositivo de la jarra botella de Leonard .

IDENTIFICACION DE ESPORAS DE Glomus fasciculatus

Se encontraron los siguientes tipos de esporas :

1.- Tipo de espora de Endogonáceae con accesorios .

a) simple b) hinchada c) bulbosa

2.- Tipo de esporas con accesorios con conductos .

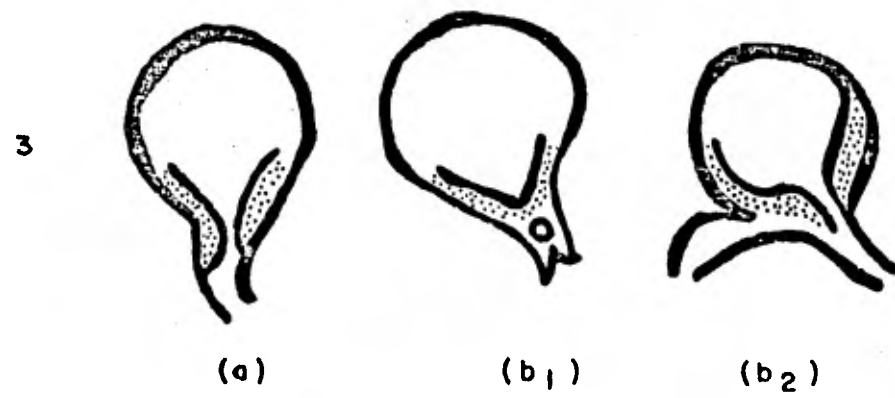
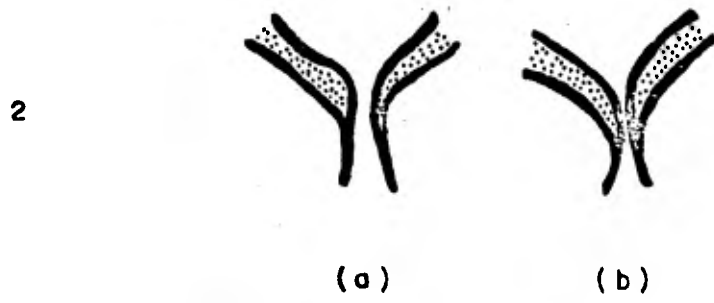
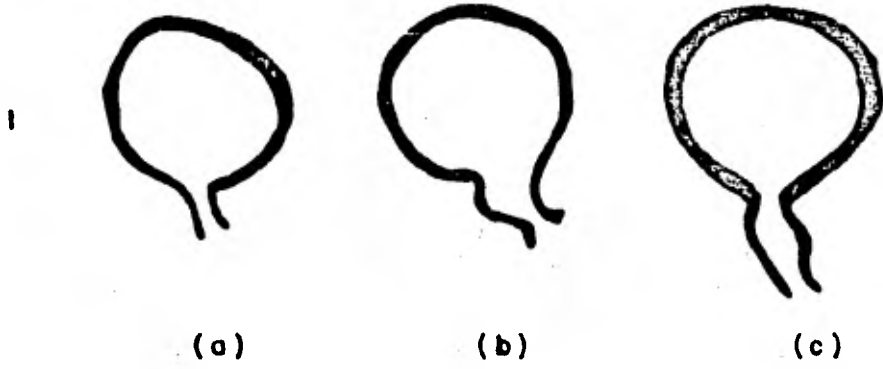
a) abierto b) cerrado con membrana

3.- Esporas de Endogonáceae con pedúnculo .

a) abierto b₁) y b₂) con tapón

Ver la fig. 7 .

FIGURA 7.



INTERPRETACION DE RESULTADOS

El suelo con el cual se trabajó , fue reportado por-
(CETENAL, 1976) como Vertisol (7a. aproximación) , -
presentando las características anteriormente señaladas -
en los resultados .

Este suelo tiene ventajas y desventajas agrícolas :

Las ventajas que presenta este Vertisol son ; alto -
porcentaje de arcillas 2:1 que permite que halla una ele-
vada capacidad de intercambio catiónico, presenta alta -
concentración de calcio, magnesio y potasio; además posee
un elevado porcentaje de materia orgánica y una densidad-
real característica , así como una densidad aparente baja.

Las desventajas son; gran cantidad de arcilla que va
desde el 30 - 40 % , con lo que se hace difícil la germi-
nación de las semillas, ya que este suelo se encuentra en
climas que presentan dos temporadas extremosas, una de se-
quía y otra de humedad excesiva . En el caso de sequía
la semilla puesta a germinar no emerge debido a la dureza
y agrietamiento del suelo. En el otro caso , en la época
de lluvia , el suelo presenta poca permeabilidad debido a

que las arcillas se expanden porque existe un exceso de agua , y la semilla puesta a germinar se ahoga . Sin embargo según los resultados obtenidos , nuestro suelo presenta las siguientes características:

La densidad real y aparente nos dan en forma indirecta el % de porosidad y este a su vez se relaciona con el % de humedad que determina la cantidad de agua disponible para las plantas . En este caso las densidades nos indican que el agua disponible es baja , aunando a esto el % de arcilla que es muy alto; por lo que se necesita riego constante pero sin inundación. Por tanto las plantas no se afectan , puesto que el terreno se somete a riego .

El PH encontrado en los dos perfiles es de 6.3 a 6.7 por lo que no es un limitante para el crecimiento de la alfalfa donde se desarrolla el Rhizobium , este a su vez está en su PH óptimo, en cambio el hongo endomicorrízico, está muy por abajo del óptimo .

El aplicar estiércol a la parcela experimental, hace que disminuya el PH , por lo que consideramos que esto , puede afectar el establecimiento de la simbiosis .

En cuanto a la materia orgánica, se tiene un porcenta

je muy alto, ya que se reporta que el 3% es un suelo -
muy rico en materia orgánica, el nuestro se encuentra -
por arriba de este nivel.

En cuanto al calcio y magnesio se tiene que para el perfil I , el nivel de calcio es muy elevado , va de 6 - 12 ton/Ha ; el nivel de magnesio es alto, va de 0.5 - 2.7 ton/Ha. En el perfil II, el calcio es bajo pero no es un limitante para el crecimiento de la alfalfa, va de 1.9 - 3 ton/Ha ; el magnesio es también bajo, va de 0.04 - 0.8 ton/Ha.

La capacidad de intercambio catiónico es alto, probablemente corresponde a los niveles altos de materia orgánica, que fueron elevados por el abono. adicionado antes de realizar los análisis físicos y químicos del suelo .

El nitrógeno para los dos perfiles, se encuentra en una cantidad considerada como media, lo que permite que el establecimiento de la simbiosis y el mismo crecimiento de las plantas.

El fósforo se determinó por dos métodos, uno cualitativo y otro cuantitativo .

El primer método fue determinado por el de (Morgan, 1970), solo se usó para el primer perfil , los resultados dieron muy elevados , los cuales no son confiables ya que el método por ser cualitativo tiene mucho error.

El segundo método fue determinado por el de (Bray - y Kurtz, 1945), y solo se usó para el segundo perfil, - los resultados dieron muy bajos , en estos hay mayor confiabilidad dado que el método por ser cuantitativo tiene menos error y es más aceptable; por tanto el fósforo es un limitante para el establecimiento de la doble simbiosis.

El potasio se le encuentra en cantidad elevada; por lo que no es un limitante para el desarrollo de la alfalfa .

De los resultados obtenidos del análisis físico y químico del suelo , se observa que el fósforo es bajo y el nitrógeno se encuentra en término medio ; siendo estas las condiciones que el suelo debía presentar , de acuerdo con el planteamiento del problema , en el cual se espera que con la influencia de la bacteria al fijar el nitrógeno

no y el hongo al traslocar el fósforo escaso de la rizósfera de la planta , compensen en cierta forma el déficit de esos macronutrientes en el suelo ; y beneficien de esa forma a las plantas.

Por tanto se determinó que el suelo era favorable para el cultivo de la alfalfa , siempre y cuando se le den las condiciones de humedad adecuadas (riego en época de estío, y en época de lluvias hacer canales de riego para evitar inundaciones , considerando además que el terreno debe estar constantemente regado pero no anegado .

Con respecto a la simbiosis se encontró lo siguiente para el caso del invernadero .

En este aspecto se trabajó con dos cepas bacterianas (312 y 305) debido a que las otras dos cepas se perdieron por contaminación . Se encontraron diferencias entre los cultivos inoculados y los testigo.

Las plantas inoculadas con cepas 312 tuvieron mayor rendimiento en cuanto a nodulación y talla , así como en el peso; esto se debe a una posible asociación de estas bacterias con las bacterias nativas del suelo , ya que -

este no fue esterilizado en la siembra. Se notó que estas bacterias tuvieron una mejor adaptación y que formaron una asociación simbiótica con las bacterias autóctonas. El rendimiento se midió en talla y peso seco (g), esto se comprobó al aplicar a los resultados una prueba de hipótesis para diferencia de medias poblacionales y el estadístico T student (Erwin, K., 1976).

En el caso de las plantas inoculadas con las cepas 305 y las testigo, no hubo diferencias, según el análisis estadístico (opus cit.) .

En el campo, se encontró que no hubo diferencias en la nodulación y en la talla de las plantas de alfalfa, ya que se encontró que todas tuvieron nódulos en las raíces, en los resultados analizados se detectó que nuevamente la cepa 312 tuvo mayor rendimiento en talla y nodulación.

Esto se debe a la afinidad que presentan las bacterias 312 con las nativas, que quizá no son tan específicas, y por tanto establecieron un mutualismo, favoreciendo al crecimiento de esas plantas.

Ahora con respecto a las plantas inoculadas con la cepa 305, 314, 313, no hubo diferencias con las testigo -

esto se debe a que las bacterias inoculadas son más específicas y no pudieron adaptarse al medio ambiente, o bien no presentaron afinidad con las bacterias autóctonas que son más resistentes en su medio, y entraron en competencia con ellas ; de tal forma que fueron eliminadas de una u otra manera de ese suelo. Por tanto no se vió ninguna diferencia en el rendimiento de las plantas problema con las testigo. Tampoco se manifestó alguna diferencia con el contraste de hipótesis (opus cit.); se hizo una combinación entre todos los resultados .

Cabe hacer la aclaración que el muestreo para analizar los nódulos, es poco confiable, debido a que se trata de un suelo arcilloso muy difícil de trabajar ; dando como resultado una gran pérdida de nódulos, ya que estos se encontraban muy adheridos al suelo y no se podían contar . Solamente se consideraron los que quedaban adheridos a la raíz de la planta.

Se hace incapie de que los nódulos se les encontraba en las raíces secundarias y pelos radicales, por tanto, dado lo delgado y fineza de estos, se perdieron muchos nódulos que quedaban atrapados en el suelo al extra

erse la planta .

Con respecto al hongo, no se hizo la inoculación en el campo; porque se requieren grandes cantidades de esporas para ello. Además porque en la propagación de este, se utilizó alfalfa como hospedero, teniendo como resultado que la infección es muy difícil de lograr (la propagación se debe hacer antes que la inoculación).

Debido a que el hongo es un huesped que requiere para su desarrollo de un hospedero vegetal que tenga un periodo de germinación y crecimiento rápido, características que la alfalfa no presenta, por lo que se rechazó dicha prueba.

En cuanto a la identificación de las bacterias que se encontraban en los nódulos de las raíces de las plantas inoculadas, se prepararon sueros específicos , para obtener una reacción característica , que indicara que dichas bacterias inoculadas se encontraban en realidad dentro de los nódulos . La reacción esperada se obtuvo pero no fue específica para la cepa que se trataba de probar . Es decir, el suero preparado para cada cepa, reaccionó con todas las soluciones de las otras cepas -

312, 313, 314, 305. Por lo que consideramos que ese mé todo no es factible para identificar las cepas bacteria- nas ; ya que se reporta que estas son difíciles de mante- nerlas en condiciones iniciales, debido a que sufren mu- taciones .

En la actualidad no hay información; y el desarro - llo experimental para este tipo de situación está muy po- co estudiado, por lo que no se logró identificar las bac- terias de los nódulos.

Se sabe bibliográficamente y experimentalmente que- cuando existe nodulación abundante, hay buenos resulta- dos en el cultivo de las Leguminosas .

D I S C U S I O N

Mientras que la obtención de inoculantes de Rhizobium, es ya actualmente un proceso industrializable ; el conseguir inóculos a gran escala de micorrizas, muestra actualmente muchas dificultades ya que el hongo es simbiote obligado, no crece en cultivo puro ; por lo que debe multiplicarse en las raíces de la planta hospedera ,

La producción de inóculo por este método, además de ser caro y lento para ser usado con fines comerciales, tiene el peligro de contaminación por hongos patógenos que pueden desarrollarse a la vez que el hongo de la micorriza .

Por lo tanto se debe estudiar en cada caso concreto diversos aspectos de la ecología de las micorrizas que permitan establecer más bases científicas sobre la inoculación .

Nuestro trabajo planteó la posibilidad de tratar de solucionar el problema de la escasez de forraje durante la época de estío (época de seca) , o bien que en un momento dado la alfalfa se utilizara como complemento de la dieta animal sin embargo, no se podía por nuestra parte pensar en un diseño experimental muy elaborado, ya que no se tiene

ningún antecedente del empleo de las técnicas simbióticas - en la producción en esta zona .

Se tiene el antecedente de que el Gobierno del Estado - estuvo interesado en establecer y promover pastizales o asociaciones pastos - leguminosas, que sería la base forrajera en la cría de ganado bovino ; para lo cual dió a los campesinos las facilidades necesarias para que se iniciaran estos cultivos (maquinaria , semilla y asesoría técnica) .

Los resultados obtenidos por el Gobierno del Estado - fueron nulos . Por lo que al llegar a trabajar a esa zona - encontramos este problema .

De esta manera decidimos abordarlo y tratar de solucionarlo a partir de propuestas generadas en el presente trabajo . Por otra parte se abordaron técnicas recientes en este campo, como son las de propagación del hongo y la identificación de las bacterianas simbiotes por medios inmunológicos. Aunque en intentos por cumplir con objetivos tan ambiciosos como los planteados, nos generó una serie de problemas experimentales ; el ensayo de estos nos indicó que - para lograrlo se requiere de varias pruebas y de mucho tiempo, quizá varios años de investigación .

C O N C L U S I O N

Los experimentos realizados en el invernadero, demuestran que los cultivos inoculados con las cepas bacterianas (312) se obtuvo mayor número de nódulos, en comparación -- con los cultivo de las cepas bacterianas(305) y los testigo (T) .

Lo anterior se comprobó mediante un análisis estadístico , se aplicaron pruebas de contraste de hipótesis para diferencia de medias poblacionales y el estadístico T de student. (Erwin, K. , 1976). De estas pruebas se observó que los cultivos de las cepas 312 , presentaron un mayor rendimiento en cuanto a nodulación, talla y peso; dado que hubo una mejor adaptación y asociación con las bacterias autóctonas del suelo, ya que este no se esterilizó para la siembra.

Los cultivos con las cepas 305 , al parecer no tuvieron alguna influencia sobre el rendimiento de la alfalfa , debido a que la apariencia de dicho cultivo indica una menor talla y peso ; así como un menor número de nódulos .

Esto se comprobó al tratar los resultados estadísti-

camente como en el caso anterior.

Los cultivos testigo , tuvieron resultados semejantes a los de las cepas 305, al encontrar nodulación en las -- plantas testigo; se detectó que en el terreno experimental también existen bacterias fijadoras de nitrógeno.

De los experimentos realizados en el campo, se en -- contró que no hubo diferencias significativas entre los - cultivos inoculados con las cepas bacterianas (305, 314,- 313, 312) y el cultivo testigo (T).

De acuerdo con el análisis estadístico utilizado (opus cit.) , las pruebas de hipótesis nos indican que si hay di- ferencias ; para el caso de las plantas cultivadas con ce - pas 312 , se apreció una mayor talla y un mayor número de - nódulos. Por tanto se concluye que esta cepa bacteriana - es menos específica que la cepa 305; y que por tanto presen- ta mayor afinidad con las bacterias nativas del suelo, for- mandose así una relación simbiótica entre ellas.

En cuanto al rendimiento de la talla y peso de las - plantas , en el invernadero se encontraron resultados más- favorables que en el campo.

Lo anterior se debe a que en el campo la influencia -

de los factores climáticos no son controlables, por un lado la variación de la temperatura es más frecuente ; y por otro, se presentaron dos estaciones anuales muy diferentes una de estío y otra de lluvia abundante, por lo que la absorción de agua no fue constante.

En cambio en el invernadero , los factores climáticos estuvieron controlados y fueron constantes, por lo que consideramos que estas condiciones tuvieron una influencia más favorable para el rendimiento de las plantas.

No se puede afirmar que la simbiosis bacteriana establecida fue efectiva, dado que los resultados de campo e invernadero fueron semejantes en la mayoría de los casos , esto se concluye al realizar un contraste de hipótesis para cada caso .

La doble simbiosis no dió resultado porque la alfalfa no fue el hospedero adecuado para el caso del hongo.

Se recomienda ensayar otras técnicas más perfeccionadas, así como identificar las cepas bacterianas nativas en el campo con claves adecuadas.

B I B L I O G R A F I A

- Azcon-G, C. y Miguel, B. J. Micorrizas . Investigación y Ciencia. Rev. No. 47, Agosto 1980. pag: 8-16.
- Barrow, N. J. et al (1977) A Direct Test of the ability of vesicular arbuscular mycorrhiza to help plant take up fixed soil phosphate. New Phytol. pag: 269-276.
- Buol, S. W. et al (1981) Génesis y Clasificación de Suelos. Ed. Trillas . México .pag: 262-269.
- Carta Edafológica. CETENAL. Escala 1:50000 . México. (1976).
- Carta Topográfica. CETENAL. Escala 1:50000. México. (1971).
- Chapman, H. D. y Pratt, P. F. (1976) Métodos de análisis para suelos y plantas . Ed. Trillas. México. p: 357.
- Crush, J. R. (1975). Ocurrence of endomicorrhizas in soils of the Mackenzie Basin. Canterbury. New Zeland. No. 2 .- Journal of Agricultural Research.
- Deft, M. J. y El-Guihami, A. A. (1974) Efect of Endogone micorrhiza on plant growht. New Phytol. No. 73 . p: 11 - 39, 45- 1147.

- Erwin, K. (1976) Estadística matemática. Ed. Trillas. - México. p: 219-245.
- Farland, J. Mc. (1976) The Nephelometer. An Instrumen for estimating the opsonic index and for Caccines . J. Am. me dic. Assoc. 49 . p: 49-1176.
- Fassbender, H. W. (1975). Química de suelos. Instituto - Interam. de Ciencias Agric. OEA . Tyrrialba, Costa Rica. pag: 398.
- Gerderman, J. W. (1955) . Relation of a large soil borre- spore to phycomycetous mycorrhizal infections mycologia.- No. 5 . pag: 619-633.
- González, V. E. y Reyes, R. G . (1977). Fijación de nitró geno entre Pisumsativum (chícharo) y Rhizobium legumino sarum . (Tesis). Univ. Nal. Aut. del Estado de Mex. Es- cuela de Química. Toluca, México. pag: 3-7, 31-35.
- Hackaylo, E. (1976). Woalland Biology. Interaction of hi gher plants and microorganims . Science Teacher. Vol. 38 No. 7.
- Hall, D. A. (1971). Estudio científico del suelo. Ed. Tri llas . Barcelona, España. pag: 16, 50.

- Hanson, C. H. (1972) . Ciencia y tecnología de la alfalfa.
ED. Agropecuaria. Uruguay. pag: 36-289 .
- Harley, J. L. (1952). Associations between microorganism
and higher plants (mycorrhiza). Ann . Rev. Microbiol. G.
pag:367- 386.
- Harley, J. L. (1959). The biology of mycorrhiza. Plant -
science monographs. Leonard Hill. London . Publications -
New York. pag: 223-250.
- Harley, J. L. (1974). Problems of micotrophy. Departament
of Forestry, University of Oxford. U.K.
- Jackson, M. L. (1976). Análisis químico del suelo. 3a. -
Ed. Omega . España. pag: 230-662.
- Millard, C. E. et al (1979). Fundamentos de la ciencia -
del suelo. 5a. CECOSA. México. pag: 233- 238.
- Mosse, B. (1972). The influence of soil type and Endogo -
ne strain on the growth of mycorrhizal plants phosphate -
deficients soils. Rev. Ecol. Biol. Sol. T. IX . 3 . pag :
529-532.
- Mosse, B. y Bower, G. D. (1968). A key to the recognition
of some Endogone spore types. Trans. Br. Micology. Soc. -
pag: 561-581.

- Nicolson, T. H. (1967). Fertilidad de suelos. Univ. Aut. de Chapingo. México. pag: 220.
- Nicolson, T. H. (1967). Vesicular-arbuscular mycorrhiza a universal plant symbiosis . Sci. PROG. Oxford. pag: 561--575.
- Ortiz-Villanueva, B. (1977). Fertilidad de suelos. Univ.-Aut. de Chapingo. México. pag: 20.
- Ramírez, L. M . (1966). El cultivo de la alfalfa en México D.G.E.A. pag: 18.
- Sanders, F. E. et al (1977). The development of endomycorrhizal root systems . New Phytol. pag: 257-268.
- Spiegel, R. M. (1970). Estadística matemática. Mc. Graw-Hill. México. pag: 69-88.
- Thompson, y Troeh .(1978). Soils and fertility. 4a. Mc. - Graw-Hill publications in the Agricultural Science. pag: 516.
- Tisdale, S. L. y Nelson, W. L. (1975). Soil fertility and fertilisers. 3a. Collier Mac. Millan Publishers.
- Velázquez-Monroy, M. L. (1980). Efectividad y competencia de algunas cepas de R. meliloti nativas del Valle de México. Tesis . I.P.N.

Vincent, J. M. (1975). Manuel práctico de rizobiología .
Ed. Hemisferio Sur. Argentina. pag: 200-550

Wallace, A. et al (1972). Influence of phosphorous on -
zinc, iron, manganese and copper uptake by plants . Soil-
Science . Vol. 126. No. 6 . pag: 336-341.

APENDICE A.
RANGO DE LA TALLA DE LAS PLANTAS.

CAMPO

PARCELA	No. DE PLANTAS	RANGO (cm)
TESTIGO	50	15 - 20
312	50	25 - 35
313	50	25 - 30
314	50	20 - 30
305	50	15 - 20

INVERNADERO

MACETA	No. DE PLANTAS	RANGO (cm)
TESTIGO	27	12 - 59
312	27	28 - 72
-	-	-
-	-	-
305	24	10 - 48

TALLA DE LAS PLANTAS EN EL INVERNADERO.

PLANTA	TESTIGO	PARCELA 305	PARCELA 312
	TALLA (cm)	TALLA (cm)	TALLA (cm)
1	59.0	48.5	47.0
2	26.2	18.7	57.5
3	50.5	31.0	42.0
4	36.5	26.0	59.0
5	45.5	36.0	34.2
6	40.8	32.0	31.5
7	15.0	12.8	40.0
8	29.0	21.0	38.5
9	33.0	23.0	57.5
10	31.5	24.8	31.5
11	28.0	29.5	28.0
12	14.5	26.0	44.0
13	16.0	17.0	46.0
14	49.5	21.0	34.0
15	36.0	31.0	42.2
16	21.0	9.0	55.0
17	47.0	14.0	35.5
18	57.5	16.5	50.5
19	42.0	31.8	45.6
20	39.0	35.5	24.0
21	17.0	40.0	29.0
22	13.0	36.0	42.5
23	35.0	35.0	47.5
24	21.0	16.0	72.5
25	39.2	35.5	46.5
26	18.6	48.0	23.2
27	12.0	10.5	70.0

NUMERO DE NODULOS POR PLANTA (CAMPO).

PLANTA.	PARCELA TESTIGO.	PARCELA 312	PARCELA 313	PARCELA 314	PARCELA 305
1	9	35	27	7	7
2	5	17	22	12	3
3	5	9	5	5	7
4	6	4	17	8	3
5	11	7	4	9	18
6	15	10	3	7	6
7	16	15	3	12	10
8	17	15	7	4	6
9	9	14	5	2	13
10	38	6	4	5	8
11	19	9	6	5	16
12	2	19	5	12	11
13	5	14	17	2	7
14	5	18	36	7	28
15	22	5	8	3	6
16	15	3	13	2	13
17	6	15	15	5	8
18	7	12	6	9	4
19	17	9	8	2	3
20	26	54	7	3	7
21	9	8	14	8	8
22	12	10	3	6	4
23	13	15	18	10	6
24	13	4	6	17	17
25	15	4	7	7	11
26	17	22	9	11	2
27	8	10	5	8	7
28	10	6	19	6	22
29	8	8	8	10	12
30	1	4	10	12	3
31	14	8	12	11	13
32	13	13	21	6	6
33	10	11	12	17	8
34	5	16	14	8	15
35	9	13	9	12	12
36	17	4	28	5	15
37	9	6	43	6	9
38	1	15	25	1	3
39	10	18	11	8	8
40	13	2	32	3	3
41	8	4	8	3	5
42	5	14	24	24	6
43	16	20	6	7	9
44	13	14	12	1	5
45	6	15	14	7	7
46	6	8	3	4	18
47	6	8	29	8	10
48	8	8	17	5	8
49	20	25	12	10	9
50	4	9	4	20	34

NUMERO DE NODULOS POR PLANTA (INVERNADERO).

TESTIGO		PARCELA 305		PARCELA 312	
PLANTA	NODULOS	PLANTA	NODULOS	PLANTA	NODULOS
1	23	1	3	1	31
2	20	2	14	2	26
3	8	3	11	3	11
4	7	4	4	4	32
5	5	5	5	5	21
6	3	6	2	6	12
7	7	7	5	7	23
8	4	8	62	8	19
9	2	9	27	9	14
10	18	10	7	10	16
11	14	11	39	11	12
12	9	12	35	12	17
13	5	13	9	13	17
14	6	14	7	14	16
15	2	15	32	15	21
16	18	16	5	16	26
17	3	17	6	17	32
18	2	18	17	18	14
19	21	19	30	19	19
20	6	20	7	20	12
21	13	21	10		
22	14	22	5		
23	10	23	8		
24	15	24	58		
25	18				
26	11				

APENDICE B.

CONTRASTE DE HIPOTESIS PLANTEADAS PARA
LOS CULTIVOS EN EL CAMPO.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_{305}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_{305}$$

$$H_0 : \mu_1 = \mu_{314}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_{314}$$

$$H_0 : \mu_1 = \mu_{312}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_{312}$$

$$H_0 : \mu_1 = \mu_{313}$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_{313}$$

$$H_0 : \mu_{305} = \mu_{314}$$

$$H_1 : \mu_{305} \neq \mu_{314}$$

$$H_0 : \mu_{305} = \mu_{312}$$

$$H_1 : \mu_{305} \neq \mu_{312}$$

$$H_0 : \mu_{305} = \mu_{313}$$

$$H_1 : \mu_{305} \neq \mu_{313}$$

$$H_0 : \mu_{314} = \mu_{312}$$

$$H_1 : \mu_{314} \neq \mu_{312}$$

$$H_0 : \mu_{314} = \mu_{313}$$

$$H_1 : \mu_{314} \neq \mu_{313}$$

$$H_0 : \mu_{312} = \mu_{313}$$

$$H_1 : \mu_{312} \neq \mu_{313}$$

NOTA: En el contraste de hipotesis planteadas, se hizo una combinacion de medias poblacionales entre los resultados de todas las parcelas entre si.

CONTRASTE DE HIPOTESIS PLANTEADAS PARA
LOS CULTIVOS EN EL INVERNADERO.

$$H_0 : \mu_{305} = \mu_{312}$$

$$H_1 : \mu_{305} \neq \mu_{312}$$

$$H_0 : \mu_{305} = \mu_1$$

$$H_1 : \mu_{305} \neq \mu_1$$

$$H_0 : \mu_{312} = \mu_1$$

$$H_1 : \mu_{312} \neq \mu_1$$

FORMULAS EMPLEADAS.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

$$T_{\text{student}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$