



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MICORRIZACION POR
ENDOFITOS VA Y NODULACION POR Rhizobium QUE
SE ASOCIAN AL HUAJE ROJO (Leucaena esculenta)
EN SUELOS DEL ESTADO DE OAXACA

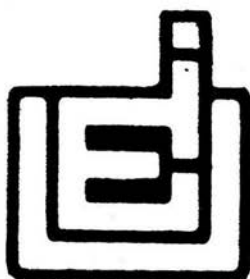
T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Beatriz Cuenca Aguilar



Los Reyes Iztacala

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



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 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO
BAJO LA DIRECCION DE LA DRA.
MARIA VALDES EN EL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA DE
LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLOGICAS DEL INSTITUTO POLI-
TECNICO NACIONAL.

A Manuel, Manuelito y Pepito:

Porque forman parte de mi vida y son mi
mayor aliciente . **LOS AMO**

A mis padres:

Concepción y Demetrio con mucho amor

A Guille:

Porque sin su ayuda y comprensión esto no
hubiera sido posible. GRACIAS.

A mis hermanos:

Guille, Rodolfo, Daniel, Pablo, Ramón, Guillermo
y Lupe, por su cariño.

A mis familiares, maestros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. María Valdés por haberme dirigido la tesis.
- A mis sinodales: MenCPedro Ramirez, MenC Victor Rivera, MenC Daniel Muñoz y Biol. Arturo Estrada por las acertadas observaciones y sugerencias para mejorar el manuscrito.
- A mis amigos: Lucia Varela, Enriqueta Amora, Miguel Velasquez y Alejandro Peñaloza por todos sus consejos y ayuda.
- A Marthā Piñón por la ayuda mecanográfica.
- Al personal del Laboratorio de Microbiología Agrícola.
- Al Dr Ronald Ferrera por haberme iniciado en esta área de estudio durante mi estancia en Matehuala.
- A todos los profesores que ayudaron a formarme como profesionista.

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 4 |
| MACROSIMBIONTE..... | 4 |
| Usos de <u>Leucaena</u> | 5 |
| Forraje..... | 5 |
| Producción de madera..... | 6 |
| Mejoramiento del suelo..... | 6 |
| Otros usos..... | 7 |
| MICROSIMBIONTES..... | 8 |
| <u>Rhizobium</u> | 8 |
| Infección nodular..... | 8 |
| Fijación simbiótica de nitrógeno..... | 10 |
| Factores que afectan la nodulación y fijación de nitrógeno..... | 11 |
| Temperatura..... | 11 |
| Humedad..... | 12 |
| Nutrimentos..... | 12 |
| Micorriza..... | 13 |
| Hongos micorrícicos VA..... | 13 |
| Infección micorrícica..... | 14 |
| Fisiología de la micorriza..... | 16 |
| Otros beneficios..... | 17 |
| Factores que afectan a la micorriza VA..... | 18 |
| Especie vegetal..... | 18 |
| Especie de endofitos..... | 18 |
| Luz..... | 18 |

| | |
|---|----|
| Temperatura..... | 19 |
| Niveles de fertilidad del suelo..... | 19 |
| O B J E T I V O S..... | 20 |
| M A T E R I A L E S Y M E T O D O S..... | 21 |
| Area de estudio..... | 21 |
| Características fisicoquímicas de los suelos..... | 26 |
| Textura..... | 26 |
| pH..... | 26 |
| Materia orgánica..... | 26 |
| Capacidad de intercambio catiónico..... | 26 |
| Nivel de fosfato..... | 26 |
| Material biológico..... | 27 |
| Soportes..... | 27 |
| Inóculo..... | 27 |
| Macetas..... | 27 |
| Establecimiento del cultivo..... | 27 |
| Estimación del NMP de hongos micorrízicos..... | 28 |
| Cálculo del número de esporas..... | 28 |
| Tipo de esporas..... | 29 |
| Estimación del NMP de <u>Rhizobium</u> | 29 |
| Aislamiento de <u>Rhizobium</u> | 29 |
| Capacidad de fijación de nitrógeno..... | 30 |
| R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N..... | 31 |
| Características fisicoquímicas de los suelos..... | 31 |
| Número más probable de hongos VA..... | 33 |
| Número de esporas..... | 33 |
| Tipo de esporas..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Número más probable de <u>Rhizobium</u> | 35 |
| Capacidad de fijación de nitrógeno..... | 37 |
| C O N C L U S I O N E S..... | 44 |
| A P E N D I C E..... | 45 |
| B I B L I O G R A F I A..... | 60 |

INTRODUCCION

En la actualidad existen grandes problemas a los cuales debe enfrentarse la humanidad, como son: la falta de alimentos, la escasez de energéticos y la contaminación, los que se originan por un mal manejo de los recursos naturales. En lo referente a la falta de alimento se debe considerar entre otras cosas, a la disminución de la superficie cultivable y a la baja producción por unidad de terreno (Zelitch, 1979)

La pérdida de terreno a su vez es consecuencia de la desertificación por envenenamiento químico, erosión y salinidad del suelo, registrándose una tasa de pérdida de 5 a 7 millones de hectáreas al año. Lo anterior ha originado que cada día se tomen más suelos de bosques como terrenos de cultivo, siendo la tasa de eliminación de aproximadamente 20 hectáreas por minuto, calculándose que en 20 años se habrán perdido entre 100 y 140 millones de hectáreas (Roldán y Trueba, 1978; Marx y Schenk, 1982; FAO, 1984).

Además se sabe que más del 80 % de toda la madera cortada anualmente en el mundo se usa como combustible (FAO, 1985), de ahí la importancia de tener plantaciones que además de reforestar sitios submarginados sean utilizadas para producir madera combustible, previniendo así la escasez de combustibles fósiles.

Por otro lado, para eliminar la baja productividad de los cultivos se agregan grandes cantidades de fertilizantes químicos que no son aprovechados sino en un 40-50% por las plantas, lo que hace que se acumulen en el suelo contaminándolo y empobreciéndolo gradualmente amén de contaminar las aguas subterráneas.

La producción de fertilizantes químicos a nivel industrial implica la utilización de hidrocarburos, por ejemplo el metano, como fuente de energía, esto hace que el proceso de fabricación sea caro y por consiguiente los fertilizantes también (Roughley, 1970).

Lo anterior obliga a buscar nuevos procesos de fertilización que requieran menos energía e inversión de capital de tal forma que sea más accesible para la agricultura.

El nitrógeno y el fósforo son elementos esenciales para el crecimiento de las plantas y la demanda de estos va en aumento estimándose que para el año 2000 será de 145 millones de toneladas métricas por año, lo que hace necesario mejorar la eficiencia de las plantas en la absorción y captación de los mismos por las plantas (Etchevers, 1987; Cajuste, 1987)

Se sabe que la mayoría de las leguminosas arbóreas pueden ser la herramienta biológica a utilizar para aminorar los problemas antes mencionados, ya que en forma natural se encuentran asociados a bacterias del género Rhizobium (fijadoras de nitrógeno) y hongos micorrízicos vesículo arbusculares, lo que les permite ser más eficientes en la absorción de dichos nutrimentos, además de tener un gran potencial como productores de madera combustible, rescate de terreno, forraje, etc. (NAS, 1979).

En México existen una gran variedad de estas leguminosas distribuidas en todo el territorio. Entre las que encontramos a Leucaena, Prosopis y Acacia.

El estado de Oaxaca es una de las regiones que han sido fuertemente afectados por la desertificación y la escasez de alimento, acentuándose en la Mixteca y en el Valle de Oaxaca. La pobreza de los suelos ha obligado a la población a emigrar (Roldan y Trueba, 1978).

Por las razones antes mencionadas, se considera importante estudiar los diversos factores ecológicos que influyen en el crecimiento de las plantas, entre ellos la micorrización por hongos Va y la nodulación por Rhizobium, utilizando una leguminosa nativa de la región (Leucaena esculenta Moss and Sesse). De esta forma se trata de contribuir al desarrollo de técnicas biológicas adecuadas, encaminadas a resolver el problema de la productividad vegetal, rescate de suelos erosionados y producción de madera combustible.

ANTECEDENTES

MACROSIMBIONTE

Las leguminosas son un grupo de plantas que abarca aproximadamente 13, 000 especies de las cuales sólo unas pocas han sido estudiadas en cuanto a su relación con microorganismos simbióticos. La familia Leguminosae se divide en tres subfamilias: Papilionidae, Caesalpinidae y Mimosoidae, (Date, 1976). La subfamilia Papilionidae es la más ampliamente distribuída y tiene miembros tanto en el trópico como en las zonas templadas y frías; incluye especies como Lupinus(lupino), Medicago(alfalfa), Phaseolus(frijol) y Trifolium(trébol) entre otros. Es importante resaltar que los géneros Trifolium y Vicia se consideran de los más evolucionados. Los miembros de la subfamilia Caesalpinidae son en su mayoría tropicales y subtropicales. Se considera el grupo más primitivo, incluye especies como Tamarindus, Cassia y Bauhinia.(Date, 1976). Por último, la subfamilia Mimosidae se encuentra principalmente en los trópicos. Agrupa especies como Inga, Acacia, Prosopis y Leucaena (Brewbaker, 1978).

El género Leucaena es originario de México y Centroamérica. Se han reportado 51 especies pero sólo 10 tienen validéz taxonómica; Leucaena diversifolia, L. macrophylla, L. pulverulenta, L. lanceolata, L. retusa, L. shannoni, L. collinsi, L. leucocephala, L. esculenta y L. tricoide .

Los miembros del género Leucaena se caracterizan por ser árboles o arbustos sin espinas con una altura de 5 a 20 metros. Poseen flores en cabezuelas blancas o amarillas. El fruto es una vaina que contiene varias semillas las que pueden ser redondas u ovaladas, no contienen endospermo y son ricas en proteínas. Las ho-

jas son bipinnadas. La madera es dura (NAS, 1984).

En México Leucaena leucocephala y Leucaena esculenta han sido las más estudiadas y se consideran las especies más representativas dentro de la subfamilia Mimosoidae (Brewbaker, 1978).

USOS DE Leucaena

Forraje

Leucaena produce regularmente grandes cantidades de follaje el cual es muy apreciado como alimento por el ganado, siendo nutritivo y de fácil digestión por lo que se le considera como el candidato más propicio para incrementar la producción de leche y carne en el trópico y zonas templadas (FIRA, 1984). No obstante su uso como forraje se ve limitado por la presencia de un aminoácido tóxico llamado mimosina que se localiza en la fracción soluble de la planta y cuyo contenido cambia según la especie, variedad, parte de la planta y estado fisiológico de la misma. La mayor concentración se encuentra en las partes tiernas de las hojas y semillas. En animales monogástricos se ha manifestado caída de pelo, retardo en el crecimiento, cataratas, bocio, disminución de la fertilidad, dermatitis ulcerativa y escoriación de la piel (Perez, 1977). En ruminantes estos síntomas disminuyen debido a la presencia de ciertos microorganismos en el rúmen que degradan la mimosina (NAS, 1984).

Para disminuir los efectos tóxicos se recomienda una ración de 20 a 30 % de Leucaena más algún otro forraje (pasto, caña de azúcar), establecimiento de un control de pastoreo de dos horas diarias, tratamiento térmico del follaje o adición de sulfato ferroso al 1% (Whiteman, 1976; Enriquez, 1986).

Leucaena es probablemente una de las leguminosas forrajeras más importante para el trópico mexicano por su alto contenido

proteico y porque su utilización no se limita a ganado vacuno, sino que se extiende a porcinos, aves, conejos, peces y equinos, en estos últimos se observan altos grados de toxicidad(FIRA,1984).

Producción de madera

La madera de Leucaena es fuerte y densa y con propiedades mecánicas que la hacen competir con otros árboles de madera dura. En México y otras regiones del mundo se utiliza para construir muebles, casas, pisos y bardas.

En el trópico un plantío de Lëucaena produce anualmente grandes cantidades de madera, reportándose entre 40 y 50 m³ para varios sitios (NAS, 1984).

La pulpa contiene un alto contenido de holocelulosa y bajo en sílice, cenizas, lignina, benceno y agua.

El valor calorimétrico de la madera de árboles de 3 a 4 años de edad se estima en 16,438.4 Kj y se incrementa con la edad, lo que significa que 2.75 Kg de leña de Leucaena equivalen a 1 Kg de gas licuado de petróleo (NAS, 1984). Por otro lado existe la posibilidad de hidrolizar la madera para fermentarla y transformarla en alcohol para ser utilizada como combustible sola o mezclada con gasolina (Oakes, 1968).

Mejoramiento del suelo y reforestación

Los beneficios que Leucaena proporciona al suelo son, entre otros, un incremento en el contenido de humus y nitrógeno(por la presencia de Rhizobium en sus raíces), mejoramiento de la textura del suelo, mayor aereación, aumento de la población microbiana del suelo, reducción del lavado del suelo y la erosión (NAS, 1984).

El follaje contiene aproximadamente el 4% del nitrógeno total de la planta de tal forma que una hectárea de la planta pue-

de proporcionar de 500 a 600 Kg de nitrógeno por año. El proceso de abono verde se presenta en forma natural con la caída de las hojas. De un plantío de 10,000 árboles por hectárea caen aproximadamente 8.5 toneladas en peso seco de hojarasca, equivalente a 100 Kg de nitrógeno (NAS, 1984).

En regiones tropicales contribuye a disminuir la tasa de evaporación, conservando así una humedad adecuada.

Puede actuar como especie pionera, permitiendo el posterior establecimiento de especies forestales de mayor valor como el pino, cedro y caoba (Pérez, 1979).

Otros usos

Leucaena cumple con los requisitos necesarios para ser un buen árbol de sombra debido a que posee copa amplia y larga, sistema radicular profundo, resistencia a enfermedades e insectos y capacidad de regular el sombreado, por lo que se utiliza para cultivos anuales y perennes como té, cafeto, vainilla y frutales (Oakes 1968).

En México y países de Centroamérica y Asia, las hojas, flores, tallos jóvenes y semillas verdes tienen gran aceptación como alimento humano (FIRA, 1977).

Las vainas hervidas producen un tinte rojo que se utiliza para colorear sarapes y vestidos. La semilla remojada produce goma o mucílago el cual se usa como agente emulsificante. Existen datos de que inhibe el crecimiento de amibas, Escherichia coli y Salmonella typhimurium (Oakes, 1968).

Las semillas maduras pueden servir como sustituto del café y en la fabricación de collares, aretes y pulseras. En muchos países es la principal planta de ornato en jardines y avenidas (Pérez,

1979; FIRA, 1984). Debido a la gran variedad de usos e importancia de Leucaena se cree necesaria la formación de Centros de Germoplasma especializados en los diversos aspectos de la producción bajo condiciones ecológicas diferentes (NAS, 1984). Por otro lado, el mejor entendimiento de la simbiosis de Leucaena con Rhizobium y hongos micorrízicos VA podría en un momento dado permitir la optimización del recurso.

MICROSIMBIOTES

Rhizobium

Las bacterias del género Rhizobium son microorganismos que se asocian a raíces de plantas de la familia Leguminosae formando nódulos en los que se fija el nitrógeno atmosférico que es aprovechado por la planta en la construcción de aminoácidos y proteínas (Brill, 1977).

Infección nodular

La presencia del nódulo en las raíces de leguminosas es el resultado de un proceso de reconocimiento entre la raíz de la planta y las bacterias (Nutmans, 1970).

a) Preinfección. Esta fase se caracteriza por la colonización y proliferación de las bacterias en la raíz como resultado de la estimulación e inhibición ocasionados por los exudados radiculares, así como por el genotipo del huésped. Posteriormente las bacterias se adhieren al pelo radicular por un reconocimiento íntimo entre las lectinas producidas por el huésped y los polisacáridos de la pared bacteriana. Como resultado de esta interacción los pelos radiculares se ramifican por efecto del ácido indol acético. Esta respuesta puede ocurrir tanto en leguminosas homólogas (específicas para una cepa de Rhizobium), como heterólogas (no específicas para una

cepa de Rhizobium). El último paso de la preinfección es el enroscamiento de los pelos radiculares y sólo se lleva a cabo en leguminosas homólogas.

b) Infección y desarrollo nodular. En este paso las células de la pared celular del pelo radicular se invaginan y forman un hilo de infección a través del cual las bacterias viajan hasta las células tetraploides. En este sitio el ápice del hilo de infección se rompe y libera las bacterias dentro de las células corticales, estimulando una repetida división celular y formando una masa de tejido que dará lugar a un nódulo joven. Simultáneamente, las bacterias se transforman en bacteroides adoptando formas irregulares de X o Y. Los bacteroides se encuentran rodeados por membranas del huésped. Concomitantemente con la formación de bacteroides, se produce el pigmento leghemoglobina y es en este momento cuando se inicia la fijación de nitrógeno (Nutmann, 1970; Dazzo, 1984).

Los estudios relacionados con el proceso de nodulación han demostrado que ciertas plantas tienen preferencia por ciertas especies de Rhizobium y viceversa. Las especies de leguminosas mutuamente susceptibles a la nodulación por un tipo especial de Rhizobium constituyen un grupo de inoculación cruzada. Las cepas de Rhizobium capaces de nodular las plantas de algunos de estos grupos se consideran especies efectivas en la fijación de nitrógeno (FAO, 1983).

De acuerdo con Date (1976) la nodulación no garantiza ningún beneficio para el huésped, es decir que una leguminosa sólo tiene utilidad práctica en la agricultura cuando existe una asociación simbiótica efectiva con Rhizobium.

Fijación simbiótica de nitrógeno

El proceso de fijación de nitrógeno implica primero la ruptura del triple enlace de la molécula de nitrógeno atmosférico (N_2). Esto se realiza por la transferencia de tres átomos de hidrógeno los que se extraen de los carbohidratos producidos durante la fotosíntesis. La molécula responsable de la transferencia es la enzima nitrogenasa, proteína compleja que consta de dos componentes principales. El componente II posee dos subunidades y cuatro átomos de hierro. El componente I consta de cuatro moléculas de proteína y 24 átomos de hierro; posee también un pequeño cofactor con dos átomos de molibdeno.

Para transferir los átomos de hidrógeno se requiere del transporte activo de electrones. Los protones se capturan libremente a través del medio acuoso de la célula. Los electrones son donados primero al componente II y después al componente I, en donde ocurre la verdadera reducción del nitrógeno. El funcionamiento de ambos componentes requiere de energía, que se proporciona en forma de adenosin trifosfato (ATP), el cual es producto del metabolismo de la glucosa estimándose que la producción de dos moléculas de amoníaco a partir de nitrógeno molecular requiere de 12 a 24 moléculas de ATP. El amoníaco producido entra en la ruta de biosíntesis de aminoácidos al reaccionar con el glutamato para formar la glutamina, esta reacción esta catalizada por la enzima glutamín sintetasa (GS). La glutamina se une al α -cetoglutarico dando dos moléculas de glutamato siendo catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT). Los restantes aminoácidos son formados por diversas reacciones.

La regulación de la fijación de nitrógeno se da principal-

mente a nivel de la enzima nitrogenasa, de tal forma que altas concentraciones de amoníaco detienen la síntesis enzimática (inhibición por producto final). Por otro lado, la actividad de la nitrogenasa es inhibida por altas tensiones de oxígeno, por lo que en el nódulo la leghemoglobina atrapa al oxígeno antes de que llegue a la enzima, manteniendo de esta forma los niveles apropiados para el desarrollo del proceso. La relación entre el ATP y el ADP también es importante. Siendo igual a diez para un óptimo funcionamiento de la enzima (Brill, 1980).

Factores que afectan la nodulación y fijación de nitrógeno.

La sobrevivencia de Rhizobium en el suelo y en el nódulo, así como el funcionamiento del mismo está influenciado por diversos factores entre los que encontramos la temperatura, humedad, pH y nutrimentos (Alexander, 1977).

Temperatura

La temperatura superficial del suelo sin cobertura vegetal puede alcanzar los 50°C en regiones tropicales y subtropicales lo que puede ocasionar efectos adversos sobre las poblaciones de microorganismos que habitan en el suelo (Day, 1976).

En forma general se puede decir que las temperaturas extremas disminuyen el proceso de infección y formación del nódulo así como el funcionamiento del mismo (Vincent, 1974). No obstante, se sabe que los rizobios de crecimiento rápido son más sensibles a altas temperaturas que los rizobios de crecimiento lento (Day, 1976).

En condiciones de laboratorio, la temperatura óptima para el crecimiento de Rhizobium es de 28 a 32 °C pero estos valores varían de acuerdo con la especie (Vincent, 1975).

Humedad

El agua en el suelo ejerce un efecto directo no sólo a las poblaciones de microorganismos sino también a la planta y a la simbiosis (Nutmann, 1970).

La escasez de agua es mucho más drástica que un período de exceso particularmente cuando se combinan altas temperaturas y el suelo carece de coloides (Marshall, 1961 citado por Vincent 1974).

La falta de agua afecta el número, la distribución y la estructura de los pelos absorbentes infectados y el número de nódulos formados (Date, 1976).

Nutrimientos

Diversos nutrimentos influyen específicamente en el crecimiento de la planta y en la fijación de nitrógeno. En general las mayores exigencias se presentan a nivel de función nodular (Franco, 1976).

El fósforo es importante porque participa en la fijación de nitrógeno en forma de ATP y por lo tanto una deficiencia de este compuesto puede causar alteraciones en el proceso (Brill, 1980).

En suelos ácidos el fósforo es un factor limitante ya que forma complejos con óxidos de aluminio y fierro y no puede ser utilizado por la planta (Nuñez, 1985). Como una alternativa se ha propuesto aumentar la utilización de hongos micorrícicos (Franco, 1976).

El nitrógeno afecta de diversas formas; como nitrito inhibe la formación de ácido indolacético necesario para la iniciación de la infección nodular (Nutmann, 1970). Concentraciones altas de amoníaco inhiben la síntesis de la enzima nitrogenasa (Brill, 1980). Sin embargo, se necesitan pequeñas cantidades de nitrógeno

para el crecimiento de la planta, formación y funcionamiento del nódulo (Franco, 1976).

El calcio es importante en el proceso de infección de los pelos absorbentes y formación del nódulo (Nutmann, 1970). El carbonato de calcio se usa para cubrir las semillas inoculadas con Rhizobium protegiéndola mientras se inicia la infección (Vincent, 1975).

Los micronutrientes son importantes porque la mayoría son necesarios para la estructura y funcionamiento de las enzimas que participan en la simbiosis (Franco, 1976).

Micorriza

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualísticas que se establecen entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo (Gerdemann, 1975).

Los hongos micorrícicos se encuentran en equilibrio con las raíces de las plantas, estableciéndose una serie de interrelaciones biotróficas en las que la planta suministra sustratos energéticos al hongo y éste por medio de las hifas capta y transfiere nutrientes a la planta huésped (Nicolson, 1967; Mosse, 1973).

Se conocen varios tipos de micorriza; a) ectomicorrizas, en el que el hongo forma un manto compacto sobre la superficie de las raíces; b) ectoendomicorriza, similar a la ectomicorriza pero también produce hilos intercelulares; y c) endomicorriza en las que se forma una vasta red de hifas en el suelo y un crecimiento extensivo dentro de la corteza (Gerdemann, 1975).

Hongos micorrícicos VA

Las micorrizas vesículo arbusculares se encuentran ampliamente distribuidas en la mayoría de los habitats de las plantas,

desde los trópicos, zonas templadas y aún en las regiones árticas (Haymann, 1982). Una explicación de este fenómeno se remonta al estudio de la evolución de la simbiosis mutualista entre la micorriza ancestral y las plantas terrestres (Pirozenski, 1981). La simbiosis siguió el curso de la evolución como un componente de la planta lo que permite suponer que juegan un papel importante en la ecología, crecimiento y nutrición de las plantas terrestres. Por esta razón es que encontramos micorriza VA en Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas, incluyendo la mayoría de las plantas de importancia económica.

La micorriza vesículo arbuscular está formada por hongos que pertenecen a la clase Zigomicetos, orden Endogonales, familia Endogonaceae. Se conocen al menos seis géneros capaces de formar micorriza VA; Acaulospora con 22 especies, Entrophospora con 3 especies, Gigaspora con 5 especies, Glomus con 67 especies, Sclerocystis con 9 especies y Scutellospora con 19 especies (Morton, 1988).

La taxonomía de las Endogonaceae es muy compleja debido a que son simbioses obligados y no pueden ser cultivados en medios sintéticos. Para poder estudiarlos en el laboratorio con relación a su ciclo de vida y morfología (Gerdemann, 1975).

Infección micorrícica

El establecimiento de la micorriza implica una serie de fases en las que interactúan el huésped, el hongo y el medio ambiente: (Barea et al, 1984).

a) Germinación y desarrollo de propágulos (esporas, hifas y fragmentos de raíz del hongo en las cercanías de la raíz). Cuando se trata de esporas, éstas pueden persistir por largos períodos de tiempo.

po en el suelo aún bajo condiciones adversas, germinando cuando las condiciones son favorables. Lo anterior es posible debido a la interacción de la superficie de la espora con las arcillas del suelo. En el caso de raíces, la infección es más rápida debido a que ésta ya posee estructuras fúngicas que pueden infectar a la planta. La viabilidad depende de la edad y capacidad metabólica del fragmento de raíz.

b)Crecimiento del hongo hacia la raíz y estimulación micorrícica. El huésped produce sustancias que estimulan a los probables microsimbiontes. Las hifas se agregan alrededor de la raíz y establecen contacto entre el hongo y los pelos radiculares. Se forma una estructura de preinfección que consiste de hifas cortas que forman el primer punto de infección. En el caso de fragmentos de raíz, no se forman estructuras de preinfección. Parece que los exudados radiculares alteran la permeabilidad de las membranas, permitiendo así la penetración del hongo a la raíz.

c)Penetración de la raíz. La hifa forma un apresorio sobre las células de la epidermis y penetra por el primer punto de entrada. este hecho estimula la formación de nuevos puntos de infección.

d)Una vez que el hongo ha penetrado, coloniza las células de la corteza de la raíz mediante hifas que se distribuyen intra e intercelularmente. Posteriormente las hifas se dividen dicotómicamente formando arbusculos. La función de éstos es el intercambio bidireccional de nutrimentos. Los arbusculos tienen una vida media de cuatro a catorce días. Las hifas internas pueden formar vesículas que tienen función de almacenamiento.

e)Crecimiento del micelio externo. Simultáneamente al desarrollo interno del hongo, las hifas se ramifican exteriormente y dan lu-

gar a una red tridimensional de micelio sobre el que se forman esporas de resistencia.

Fisiología de la micorriza VA

El principal efecto de las micorrizas VA se refiere al incremento del crecimiento vegetal por una mejoría en la nutrición fosfatada (Mosse, 1973).

En el proceso de transporte de fósforo de la solución del suelo a la planta se distinguen tres fases principales en las que participa la micorriza VA (Barea *et al*, 1984).

a) Captación de fosfato por el micelio externo. En la mayoría de los suelos los iones fosfato se encuentran en concentraciones muy bajas. Por otro lado, estos iones tienen un desplazamiento muy lento y tienden a ser retenidos por las partículas del suelo, o se precipitan con calcio, fierro y aluminio dependiendo del pH del suelo, por lo que para que sea absorbido por la planta debe encontrarse cerca de las raíces. Al llegar el fosfato a la rizosfera las raíces lo captan a una velocidad mayor que la del ión al desplazarse por lo que se forman zonas de deficiencia de fósforo alrededor de la raíz. Las hifas de las raíces micorrizadas crecen y se ramifican más allá de la zona de agotamiento. En este caso las hifas actúan mecánicamente al proporcionar un mayor número de sitios de absorción de fósforo.

Creso (1979) demostró que en raíces micorrizadas la constante de Michaelis (K_m) y la captación de fosfato son más bajas que en raíces no micorrizadas, lo que sugiere una mayor afinidad de las hifas por el ión.

b) Translocación de fosfato en las micorrizas. Existen evidencias experimentales de que el fosfato se transloca hacia las estructu-

ras intraradiculares del hongo como gránulos de polifosfato que se transportan a través de la luz de las hifas hacia los ar-
búsculos. Los gránulos de polifosfato son formados por mediación
de fosfatasas situadas en las hifas externas. La degradación la
realizan las fosfatasas alcalinas específicas de hongos VA situa-
das en las vacuolas de los ar-
búsculos.

c) Transferencia de fosfato. El principal sitio de transferencia
de fosfato del hongo a la planta es el ar-
búsculo. El proceso se
basa en un mecanismo activo de transferencia a través de membra-
nas mediadas por la acción del sistema ATPasa unido a plasmalemas
dobles (hongo-raíz) que son los ar-
búsculos. Entre los cuatro y
los catorce días los ar-
búsculos degeneran liberando su contenido
en la célula huésped.

Otros beneficios

La micorriza VA puede estimular el crecimiento de las
plantas por mecanismos no relacionados con la nutrición vegetal.
Entre los que podemos mencionar a los debidos a la producción de
hormonas como giberelinas y citoquininas (Barea et al, 1984). En
plantas inculadas tanto con micorriza como con Rhizobium , se
observa que la producción de hormonas promueve la colonización
y penetración de la bacteria a través de los pelos radiculares me-
jorando de esta forma la simbiosis y la respuesta de la planta
(Barea y Azcón, 1983).

Los inducidos mediante una mejora en la estructura del
suelo por la formación de agregados más estables por la acción
cementante entre los polisacáridos bacteriales y las hifas de
hongos micorrícicos (Haymann, 1985). Otros debidos a la prote-
cción de la planta contra patógenos, resistencia a fungicidas,

metales pesados, salinidad o desechos industriales (Barea y Azcón, 1983).

Factores que afectan a la micorriza VA

Entre los principales factores que afectan a la micorriza VA encontramos a la especie vegetal, especie de endofitos, luz, y niveles de fertilidad del suelo.

Especie vegetal

Las diversas especies de plantas poseen diferentes requerimientos hacia la formación de micorriza, a esta característica se le denomina usualmente "dependencia micorrícica" y se refiere al grado al cual una planta es dependiente de la micorriza para producir un máximo crecimiento y producción en un nivel dado de fertilidad (Gerdemann, 1975).

En este sentido se sabe que Leucaena es micotropa obligada (Barea y Azcón, 1983)

Especie de endofito

En general los hongos VA presentan poca o ninguna especificidad hacia el huésped (Mosse, 1973; Haymann, 1982). Sin embargo, un factor determinante en el aumento del crecimiento vegetal es la capacidad del hongo para desarrollar una gran cantidad de micelio externo, característica que es determinada por el hongo (Mosse, 1973). Se ha encontrado una correlación entre la efectividad de las especies fúngicas y el porcentaje de longitud de raíz infectadas en los primeros estadios de crecimiento (Abbott y Robson, 1981).

Luz

Ya que los carbohidratos suministrados al hongo son proporcionados por el huésped como productos de la fotosíntesis,

cualquier factor que modifique la producción y distribución de los fotosintatos alterará también el establecimiento y función de la simbiosis micorrícica (Haymann, 1984). De tal forma que altas intensidades luminosas parecen aumentar la producción de arbusculos y esporas (Furlan y Fortin, 1975).

Temperatura

Se considera importante tomar en cuenta la temperatura óptima de la planta huésped y la región donde se aíslan los endofitos para ensayos experimentales (Haymann, 1984).

Niveles de fertilidad del suelo

El nivel y tipo de nutrimentos afecta la formación y la respuesta micorrícica. En general, bajos o moderados niveles de fertilidad del suelo mejoran el grado de desarrollo de las micorrizas y la respuesta de la planta (Barea y Azcón, 1984). El principal elemento que afecta la formación y función de la micorriza es el fósforo, por lo que se requieren bajos niveles de fosfato en el suelo (Mosse, 1973).

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar el potencial de micorrización por endofitos vesículo arbúsculares en suelos de Oaxaca tanto en período de lluvia como de sequía utilizando a Leucaena esculenta como planta huésped.

- 2.- Evaluar el potencial de nodulación por Rhizobium en los mismos suelos y bajo las mismas condiciones.

MATERIALES Y METODOS

Area de estudio

El estado de Oaxaca está situado al sureste de la República Mexicana. Limita al norte con los estados de Veracruz y Puebla, al este con el de Chiapas, al oeste con el de Guerrero y al sur con el Océano Pacífico. Su territorio tiene una extensión de 95364 Km². La capital es la ciudad de Oaxaca localizada a 516 Km de la ciudad de México. El nombre del estado y de la capital proviene del náhuatl Huaxyacac que significa en la nariz o punta de los huajes. El sistema hidrográfico de esta entidad se halla dividido en dos grupos; Por una parte el río Papaloapan y el Coatzacoalcos. Por otra, en la vertiente del sur, los ríos Tehuantepec, Copalita y Atoyac o Verde, como los de mayor importancia. La región es, en general, de un clima seco. Las sierras orientales forman una barrera que impide el paso de los vientos alíseos del Atlántico por lo que la región queda en la sombra eólica y a sus estrechos valles no llegan los vientos lluviosos del Golfo. La zona esta formada por rocas sedimentarias y metamórficas. Los suelos son rendzinas, luvisoles, acrisoles y litosoles. En las zonas intermontañas hay suelos aluviales y lacustres. El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas afirma que los suelos de la región son bastante heterogéneos; sin embargo, es común en todos ellos la pobreza de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo; tienen alto contenido de calcio, carbonatos, deficiencia de materia orgánica y texturas de pesadas a medias. (López, 1987).

El estado se divide en siete regiones principales: Valles Centrales, La Costa, La Sierra, La Cañada, El Istmo, La Mixteca y El Papaloapan.

De estas regiones se eligieron para su estudio a la Mixteca (altamente erosionada) y Valles Centrales (actividad agrícola intensa y suelo poco fértil).

Los Valles Centrales se dividen a su vez, en ; Valle de Tlacolula, Valle de Etna, Valle de Ocotlán-Ejutla, Valle de Záchila-Zimatlán. El área tiene una superficie laborable de aproximadamente 138 281 hectáreas. Existen un gran número de pequeñas corrientes , siendo la más importante la del río Atoyac que atraviesa los Valles de Etna y Zimatlán. El manto freático se localiza entre los dos y los diez metros de profundidad lo que permite que en general la disponibilidad de agua sea buena. En los Valles Centrales se presentan dos tipos de climas; seco semicálido con lluvias en verano y el semicálido subhúmedo con lluvias en verano según la clasificación de Koppen modificado por García. La temperatura media anual es de 20.8 °C. La precipitación media anual es de 623mm distribuída de mayo a octubre (INIA, 1983).

La Mixteca Oaxaqueña se divide en Mixteca Alta y Mixteca baja por la formación de una depresión que origina variaciones en el clima. La Mixteca tiene 163 515 hectáreas laborables. La Mixteca Alta abarca los distritos de Tlaxiaco, Nochixtlán, Teposcolula y Coixtlahuaca, con alturas que van desde 1800 a 3000 msnm. En esta región predomina el clima

templado subhúmedo , con temperaturas medias anuales entre 12 y 18 °C. Se presentan heladas de octubre a marzo y las temperaturas más bajas se presentan en diciembre y enero .Los suelos estan áltamente erosionados y con pocos nutrientes. La Mixteca Baja ocupa los distritos de Silacayoapan, Juxtla-huaca y parte de Huajuapán. Posee en general un clima semi-cálido y la mayor parte del suelo es montañoso, con alturas entre los 1000 y 2500 msnm.La precipitación pluvial es variada entre 685 y 740 mm.Los suelos son poco profundos y con poca acumulación de materia orgánica.(INIA, 1984).

Se realizaron dos muestreos, uno en época de sequía (mayo-junio), y otro en época de lluvia (agosto-septiembre) con el objeto de conocer las poblaciones de Rhizobium y hongos micorrícicos en ambas condiciones. Se tomaron muestras de suelo de cinco localidades , una de la Mixteca (Nochixtlan) y cuatro de Valles Centrales (San Dionisio, Ocotlan; Etla; Reyes, Mantecón y San Pablo, Huixtepec.). Las muestras se tomaron entre los 5 y 40 cm de profundidad y se colocaron en bolsas de polietileno para transportarlo. Una vez en el laboratorio el suelo se seco al aire y se tamizó (malla de 2mm) para eliminar terrones y piedras. Se volvieron a colocar en bolsas de polietileno hasta su utilización. Se realizaron análisis fisicoquímicos de los suelos y ensayos de inoculación.

Tabla No. 1. Características generales de los suelos estudiados en la región de Valles Centrales y la Mixteca Oaxaqueña.

| Localidad | cubierta vegetal | prácticas de cultivo |
|--|---|---|
| Distrito de Etla | maíz y alfalfa | rutinarias(arado y aplicación de estiércol. |
| San Pablo, Huixtepec | maíz | rutinarias(idem) |
| Reyes Mantecón | garbanzo | rutinarias (idem) |
| San Dionisio, Ocotlan | maíz | rutinarias (idem) |
| Nochixtlan | | |
| a)terrazas, parte sin vegetación acompañante | comunidad de Leucaena esculenta | ninguna |
| b)huajal, en el borde de las terrazas | comunidad formada por huaje, nopal, huizache, maguey y chamizo. | ninguna |
| c) hacia los lados de la carretera | sin vegetación, pérdida de la capa arable. | ninguna |



Figura No. 1 Mapa que muestra la localización de los sitios de muestreo.

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS SUELOS

Textura

Se determinó por el método de Bouyucos. Este método se basa en medir la diferencia en la velocidad de sedimentación de las partículas del suelo en una suspensión acuosa.

pH

El pH se determinó utilizando un potenciómetro con electrodo de vidrio.

La medición del pH se realizó utilizando una suspensión de suelo y agua en una relación de 1:3.

Se considera a un suelo ácido cuando presenta valores de pH entre 4 y 6. Valores arriba de 7 indican alcalinidad. (Valdés, 1986).

Materia Orgánica

El contenido de materia orgánica se determinó por el método de Walkley y Black con ácido crómico (Valdés, 1986).

Capacidad de Intercambio Cationico

Se determinó por el método del Versenato. Esta propiedad se define como la cantidad de cationes intercambiables que un suelo puede absorber y varía de acuerdo a la cantidad, tipo de arcilla y materia orgánica presente en el suelo.

Nivel de fosfato en los suelos

Se determinó por el método de Bray I .

MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron semillas de Leucaena esculenta Mocc and Sesse (huaje rojo), recolectadas en San Dionisio Ocotlán, Oaxaca y en una prueba semillas de Leucaena leucocephala Lam de Wit (huaje).

SOPORTES

Para las pruebas con hongos VA se utilizó el suelo muestreado esterilizado a 180 °C por dos horas durante tres días . Para Rhizobium arena de río esterilizada de la misma forma que el suelo. En ambos casos la esterilización se hizo con calor seco en una estufa microbiológica.

INOCULO

Para Rhizobium se hicieron mezclas del suelo a examinar con agua destilada estéril y se prepararon diluciones decimales para usarse como inóculo. En el caso de los hongos VA se mezcló el suelo a examinar con suelo esterilizado y se prepararon diluciones por cuadruplicado. En ambos casos las diluciones se hicieron desde x^0 hasta x^{-8} .

MACETAS

Para el cálculo del número más probable se usaron vasos de plástico de 200ml de capacidad y para la prueba de nodulación por Rhizobium se usaron vasos de 500 ml de capacidad.

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO

Debido a que la semilla de Leucaena tiene una cubierta dura impermeable al agua, se escarificó con ácido sulfúrico concentrado por 20 minutos y se enjuagó con agua desti-

lada estéril por diez veces. Se dejó remojar en el agua del último enjuague hasta su completa imbibición. Posteriormente se colocaron las semillas en charolas con arena estéril a 28°C para su germinación. Cuando la radícula alcanzó los dos centímetros se transplantaron asépticamente tres plántulas por maceta regándose alternadamente con agua destilada y solución de Norris sin nitrógeno.

ESTIMACION DEL NMP DE MICORRIZAS VA

Para estimar el número más probable de hongos VA se realizó la técnica de Porter(1979) modificada por Sieverding (1983). El método consiste en mezclar el suelo a examinar con suelo esterilizado y realizar diluciones por cuadruplicado agitando varias veces para homogeneizar. El suelo así preparado se coloca en macetas y se siembran plántulas de Leucaena en cada dilución por triplicado. Se mantuvieron en el solarío por seis semanas regándolas cada tercer día con agua destilada. Después de este tiempo se cosecharon, lavaron y tñieron las raíces de acuerdo al método de Phillips y Haymann (1970). Para realizar el cálculo del número más probable se contó el número de macetas con raíces infectadas y se consultaron las tablas de Fisher y Yates(1963).

CALCULO DEL NUMERO DE ESPORAS POR GRAMO DE SUELO

Debido a que los hongos que forman micorriza VA están produciendo constantemente esporas en el suelo es importante que cualquier investigación sobre ecología o fisiología implique el aislamiento de esporas para estimar la población.

Para extraer las esporas del suelo se utilizó el método de separación por Flotación y Burbujeo de Furlan y Fortin, 1975. Una vez extraídas las esporas se calculó el número de esporas por gramo de suelo de acuerdo al método de Smith y Skipper(1979). Se analizaron las muestras al microscopio estereoscópico.

TIPO DE ESPORAS

Para conocer los géneros de esporas de hongos más frecuentemente encontrados se hicieron observaciones al microscopio óptico identificándolas con las claves de Trappe, (1982)

ESTIMACION DEL NMP DE Rhizobium

Se utilizó el método de Vincent(1975), el cual se basa en la capacidad de un Rhizobium específico para producir nódulos en una especie determinada de leguminosas y presupone que una sola célula de Rhizobium agregada a la planta huésped es suficiente para causar nodulación. El método consiste en realizar mezclas del suelo a examinar en agua destilada o solución salina, preparándose diluciones decimales. Se inoculan plántulas con 1 ml de la suspensión para cada dilución por triplicado. Se colocaron en solarío por ocho semanas y se regaron alternadamente con agua destilada y solución de Norris sin nitrógeno. Se cosecharon las plantas y se registró la presencia o ausencia de nódulos. El NMP se calculó de acuerdo a las tablas de Fisher y Yates(1963).

AISLAMIENTO DE Rhizobium

A partir de los nódulos formados en plantas de

Leucaena esculenta se aislaron cepas de Rhizobium siguiendo la técnica descrita por Vincent (1975). Una vez aisladas se purificaron por resiembras en medio levadura manitol.

CAPACIDAD DE FIJACION DE N₂

De las cepas aisladas se eligieron seis para probar su capacidad de fijación de nitrógeno. Las cepas fueron escogidas por ser las más frecuentemente encontradas en los suelos estudiados.

Para esta prueba se utilizó tanto Leucaena esculenta como Leucaena leucocephala para comparar el efecto de cada una de las cepas en ambas especies de plantas.

Se sembraron plántulas en macetas de 500 ml de capacidad conteniendo arena de río estéril como soporte. Cuando aparecieron las hojas cotiledonares se inocularon con 1 ml de una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 cel/ml. Se montaron también testigos positivos (con nitrógeno) y testigos negativos (sin nitrógeno). Se colocaron al azar en el solarío y se mantuvieron por ocho semanas, regándolas cada tercer día con solución de Norris con y sin nitrógeno según fuera el caso. Después de este tiempo se cosecharon las plantas y se contó el número de nódulos por planta, peso seco de nódulos, peso seco de la parte aérea y altura de las plantas. Los resultados se analizaron estadísticamente por una prueba ANDEVA y prueba de Duncan (Little, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSION

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS SUELOS

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Con relación a la clasificación textural en la zona de la Mixteca se encontró que el suelo es migajón arenoso. En Valles Centrales esta característica varió encontrándose migajón arcilloso en Etna y Reyes Mantecón; migajón arenoso en San Dionisio y arena migajosa en San Pablo.

Los valores de pH van desde 7 en San Pablo hasta 8.4 en Nochixtlán. En general el Ph de estos suelos se considera de neutro a alcalino. Lo anterior es importante ya que el desarrollo de Leucaena es adecuado a estos valores de pH por lo que se espera que el establecimiento de ensayos en campo no presente problemas en este sentido.

El contenido de materia orgánica fue diferente para cada uno de los suelo, de tal forma que San Pablo y Nochixtlán poseen un suelo pobre; San Dionisio un suelo mediano y Etna y Reyes Mantecón un suelo rico. La pobreza de materia orgánica en Nochixtlán se explica porque en esta zona hay una fuerte erosión y muy poca cubierta vegetal.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) está relacionada directamente con la textura y el contenido de materia orgánica. Por lo que en suelos arenosos como los de la Mixteca fue de entre 20 y 40 meq/100 g de suelo, valor considerado bajo. En tanto que en suelos arcillosos como Reyes Mantecón y Etna fue de 70 meq/100 g de suelo, un valor alto.

En la mayoría de los suelos el contenido de fós-

Tabla No. 2. Características fisicoquímicas de los suelos estudiados en la región de Valles Centrales y la Mixteca Oaxaqueña.

| Localidad | textura | pH | M.O. | CIC | P(ppm) | P(Kg/ha) |
|--|-------------------|-----|------|-----|--------|----------|
| Distrito de Etna | migajón arcilloso | 7.1 | 2.34 | 70 | 34.4 | 77.4 |
| San Pablo, Huixtepec | arena migajosa | 7.0 | 0.8 | 20 | 2.0 | 24.5 |
| Reyes Mantecón | migajón arcilloso | 8.1 | 2.68 | 70 | 12.8 | 28.8 |
| San Dionisio, Ocotlan | migajón arenoso | 7.1 | 1.4 | 39 | 2.4 | 5.4 |
| Nochixtlan | | | | | | |
| a)terrazas, parte sin vegetación acompañante. | migajón arenoso | 7.0 | 0.67 | 40 | 0.8 | 1.9 |
| b)huajal, en el borde de las terrazas | migajón arenoso | 8.4 | 0.67 | 24 | 0.8 | 1.9 |
| c)hacia los lados de la carretera. | migajón arenoso | 8.3 | 0.15 | 47 | 0.8 | 1.8 |

foro fue bajo desde 1.8 kg/ha en Nochixtlán hasta 77 kg/ha en Etna. Esta es una característica muy importante en caso de establecer ensayos en campo en estos sitios, ya que uno de los requisitos para esperar cierta respuesta de la planta a la infección por hongos endomicorrícicos es tener bajos niveles de fósforo disponible en el suelo. No obstante cabe mencionar que Leucaena es micótrofa obligada.

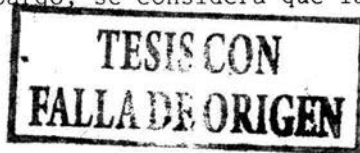
NUMERO MAS PROBABLE DE HONGOS VA

Para determinar el NMP de propágulos se consideró solamente la presencia o ausencia de hifas, esporas, vesículas, arbusculos, de acuerdo a lo descrito por Sieverding, (1983) . Los resultados se muestran en la tabla 3.

El NMP en época de sequía varió desde 50 propágulos por 100 gramos de suelo seco en Etna hasta 1350 en Reyes Mantecón . En tanto que en lluvia aumentó a 88 en Etna y 2200 en Reyes Mantecón. El bajo número de propágulos en Etna se debe a que en este sitio se observan los valores más altos de contenido de fósforo y no hay Leucaena . En contraste el suelo de Reyes Mantecón tiene bajo contenido de fósforo lo que proporciona mejores condiciones para el desarrollo de propágulos. El aumento en la época de lluvia puede deberse a que en estas condiciones algunas esporas pueden germinar y dar origen a nuevas estructuras fúngicas.

NUMERO DE ESPORAS

El número de esporas se puede observar en la tabla 3. Se registró una disminución del número de esporas en época de lluvia debido a la germinación de esporas que dan lugar a otras estructuras. Sin embargo, se considera que la



foro fue bajo desde 1.8 kg/ha en Nochixtlán hasta 77 kg/ha en Etna. Esta es una característica muy importante en caso de establecer ensayos en campo en estos sitios, ya que uno de los requisitos para esperar cierta respuesta de la planta a la infección por hongos endomicorrícicos es tener bajos niveles de fósforo disponible en el suelo. No obstante cabe mencionar que Leucaena es micótrofa obligada.

NUMERO MAS PROBABLE DE HONGOS VA

Para determinar el NMP de propágulos se consideró solamente la presencia o ausencia de hifas, esporas, vesículas, arbusculos, de acuerdo a lo descrito por Sieverding, (1983) . Los resultados se muestran en la tabla 3.

El NMP en época de sequía varió desde 50 propágulos por 100 gramos de suelo seco en Etna hasta 1350 en Reyes Mantecón . En tanto que en lluvia aumentó a 88 en Etna y 2200 en Reyes Mantecón. El bajo número de propágulos en Etna se debe a que en este sitio se observan los valores más altos de contenido de fósforo y no hay Leucaena . En contraste el suelo de Reyes Mantecón tiene bajo contenido de fósforo lo que proporciona mejores condiciones para el desarrollo de propágulos. El aumento en la época de lluvia puede deberse a que en estas condiciones algunas esporas pueden germinar y dar origen a nuevas estructuras fúngicas.

NUMERO DE ESPORAS

El número de esporas se puede observar en la tabla 3. Se registró una disminución del número de esporas en época de lluvia debido a la germinación de esporas que dan lugar a otras estructuras. Sin embargo, se considera que la

Tabla No. 3. Número más probable (NMP) de propágulos¹ y número de esporas de hongos micorrícicos VA asociados a Leucaena esculenta en temporada de sequía y lluvia

| Localidad | NMP de propágulos/100g de suelo | | No. de esporas/100g de suelo | |
|--|---------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| | sequía | lluvia | sequía | lluvia |
| Distrito de ETLA | 50 | 162. | 9250 | 14000 |
| San Pablo, Huixtepec | 50 | 162 | 10600 | 4900 |
| Reyes Mantecón | 1350 | 2200 | 13750 | 15800 |
| San Dionisio, Ocotlan | 50 | 55 | 7500 | 5200 |
| Nochixtlan | | | | |
| a) terrazas, parte sin vegetación acompañante. | 60 | 88 | 16900 | 11750 |
| b) huajal, en el borde de las terrazas | 100 | 88 | 21800 | 7750 |
| c) hacia los lados de la carretera | 300 | 320 | 3900 | 300 |

1 propágulos(esporas, hifas.etc.) capaces de producir infección

disminución no está en la misma proporción en que aumentó el NMP de propágulos debido probablemente a que gran parte de las esporas recolectadas no eran viables. Esto se constató por un análisis más detallado al microscopio óptico, lo que mostró gran cantidad de esporas rotas o vacías.

Tanto el NMP de propágulos como el número de esporas está influenciado por los niveles de fósforo disponible en el suelo, la textura y la presencia o ausencia de vegetación en los sitios estudiados.

TIPOS DE ESPORAS

El género más frecuentemente encontrado fue Glomus. Se enviaron muestras al Centro de Taxonomía y Sistemática en Canadá en donde se identificaron tres especies, Glomus mosseae, G. fasciculatum, G. constrictum y Glomus sp

NUMERO MAS PROBABLE DE Rhizobium

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. En estación de sequía el NMP fluctuó entre 8 bac/g de suelo seco en San Pablo hasta 1831 en Reyes Mantecón. En estación de lluvia el número de rizobias aumentó en todos los suelos, por ejemplo, en San Pablo aumentó a 39 y en Reyes Mantecón a 3500. Es importante hacer notar que en ambas estaciones el suelo de Reyes Mantecón presentó los valores más altos. Lo anterior se explica porque este suelo posee una textura arcillosa, lo que proporciona a la bacteria un microhabitat favorable en el cual tiene mayores posibilidades de sobrevivir. Además de que este sitio sostiene un cultivo de garbanzo,

Tabla No. 4. Número más probable (NMP) de Rhizobium loti asociado a Leucaena esculenta (Moc and Sesse) en época de sequía y lluvia.

| Localidad | <u>Rhizobium loti</u> por gramo de suelo | |
|---|---|--------|
| | sequía | lluvia |
| Distrito de Etna | 84 | 390 |
| San Pablo, Huixtepec | 8 | 39 |
| Reyes Mantecón | 1831 | 3500 |
| San Dionisio, Ocotlan | 18 | 90 |
| Nochixtlán | 38 | |
| a) terrazas, parte sin vegetación acompañante. | 40 | 46 |
| b) huajal, en el borde de las terrazas | 180 | 251 |
| c) hacia los lados de la carretera | 38 | 42 |

una leguminosa , la cual en un momento dado puede estimular el crecimiento y mantenimiento de las poblaciones bacterianas en el suelo, ya que se sabe que las leguminosas estimulan la proliferación de cualquier especie de Rhizobium.

Tomando en cuenta lo anterior podemos indicar que existe variación estacional de las poblaciones de Rhizobium en los sitios estudiados lo que debe considerarse en el momento de establecer ensayos en campo.

NODULACION Y EFECTIVIDAD DE Rhizobium

En plantas de Leucaena esculenta de las seis cepas probadas, la 39 produjo los mejores resultados para altura, peso seco de la parte aérea, número de nódulos y peso seco de nódulos como puede verse en la tabla 5. Los resultados obtenidos con el testigo positivo (con nitrógeno) fueron superiores a los de la cepa 39. Sin embargo, el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos. En relación a la cepa de referencia (NGR8) los resultados sugieren que ésta no es mejor que las cepas nativas estudiadas, esto puede deberse a que esta cepa se recomienda para Leucaena leucocephala.

Con L. leucocephala la cepa 39 también resultó ser la que dió mejores resultados para cada una de las características registradas. En este caso la cepa NGR8 dió mejor respuesta que con L. esculenta por lo anteriormente mencionado.

Debido a que los resultados cuantitativos entre las dos especies de plantas no parecen ser muy diferentes, se realizó un análisis de varianza entre las dos especies y los

diferentes tratamientos y se encontró que sí existe diferencia significativa entre la altura y el peso seco de nódulos a un nivel de 0.05%. Mientras que no hubo diferencia significativa en el peso seco de la parte aérea en ambas especies. A pesar de estos resultados es importante resaltar que la apariencia de las plantas sí era diferente ya que L. esculenta presentó abundante desarrollo del follaje y la raíz, el tamaño de los nódulos fue de 0.5 cm y gran número de nódulos formados. En contraste, en L. leucocephala la mayoría de las plantas presentó aspecto clorótico poco desarrollo del follaje y la raíz, bajo número de nódulos y tamaño de los mismos menor de 0.5cm. Lo anterior puede deberse a que las condiciones del ensayo no fueron favorables para el desarrollo de L. leucocephala ya que es trópica y de costa. Además de que las cepas se aislaron de L. esculenta y como se sabe Rhizobium es específico.

En vista de que las plantas testigo alimentadas con nitrógeno proporcionaron los resultados más altos en cuanto a peso seco de la parte aérea y altura, se considera que ninguna de las cepas probadas bajo nuestras condiciones de estudio sustituyen al fertilizante nitrogenado (80Kg/ha). No obstante estos resultados pueden variar en condiciones de campo.

Tabla no. 5. Nodulación y efectividad en solarío de algunas de las cepas de Rhizobium loti tanto en Leucaena esculenta como en L. leucocephala.

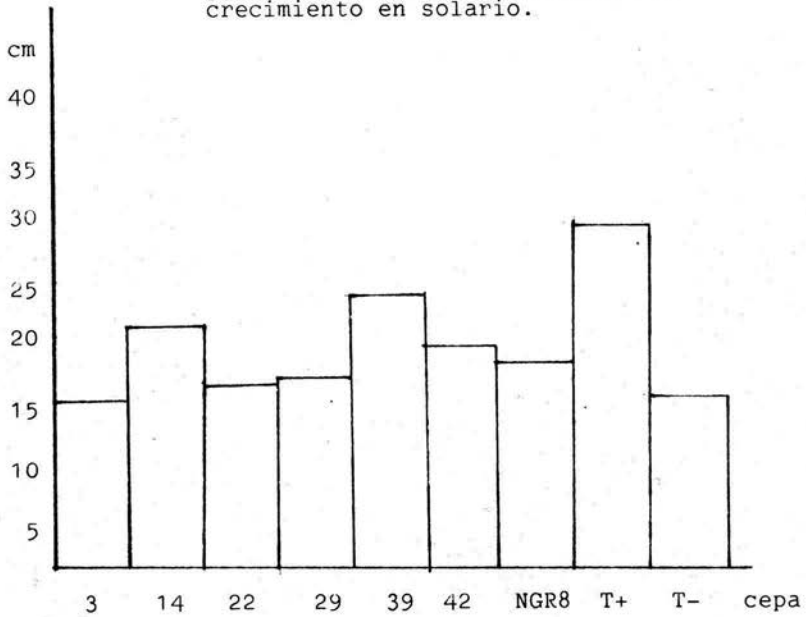
| Cepa de <u>R. loti</u> | altura en cm | peso seco parte aérea en mg | No. de nódulos | peso seco de nódulos en mg |
|------------------------------|--------------|-----------------------------|----------------|----------------------------|
| <u>Leucaena esculenta</u> | | | | |
| 3. | 14.6a | 286a | - | - |
| 14 | 21.0ac | 513b | 46 | 230 |
| 22 | 15.33a | 320a | 17 | 90a |
| 29 | 15.41a | 273a | - | - |
| 39 | 24.85bc | 723b | 119 | 480c |
| 42 | 19.08ac | 393a | 33 | 170ab |
| NGR8 | 17.25ac | 260a | 16 | 90a |
| T+ | 30.08b | 813b | - | - |
| T- | 14.83a | 286a | - | - |
| <u>Leucaena leucocephala</u> | | | | |
| 3 | 11.5a | 290a | 11 | 20a |
| 14 | 17.8ab | 420a | 23 | 130c |
| 22 | 16.5ab | 300a | - | - |
| 29 | 12.7a | 500 ^{bb} | 5 | 9a |
| 39 | 16.1ab | 600b | 47 | 190c |
| 42 | 16.8ab | 350a | 23 | 70b |
| NGR8 | 12.7a | 590b | 19 | 100bc |
| T+ | 23.3b | 520b | - | - |
| T- | 11.6a | 300a | - | - |

No existen diferencias significativas ($p=0.5$) entre los valores seguidos por la misma letra.

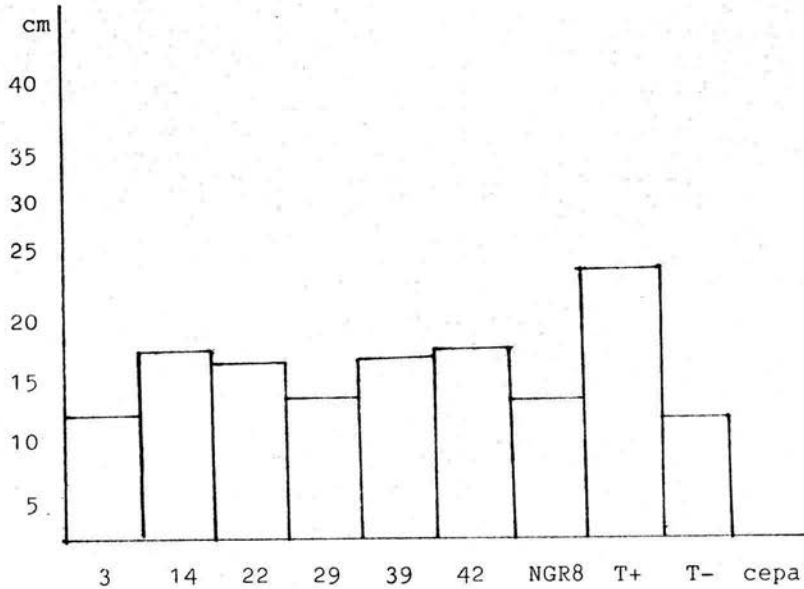
- significa no noduló

Los resultados son promedio de 3 plantas.

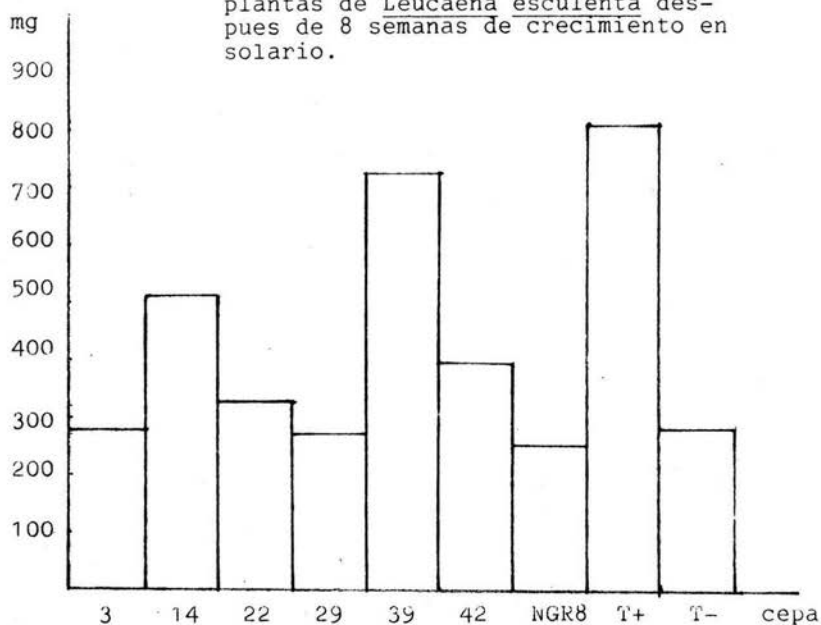
Grafica 1. Altura en cm de plantas de Leucaena esculenta despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



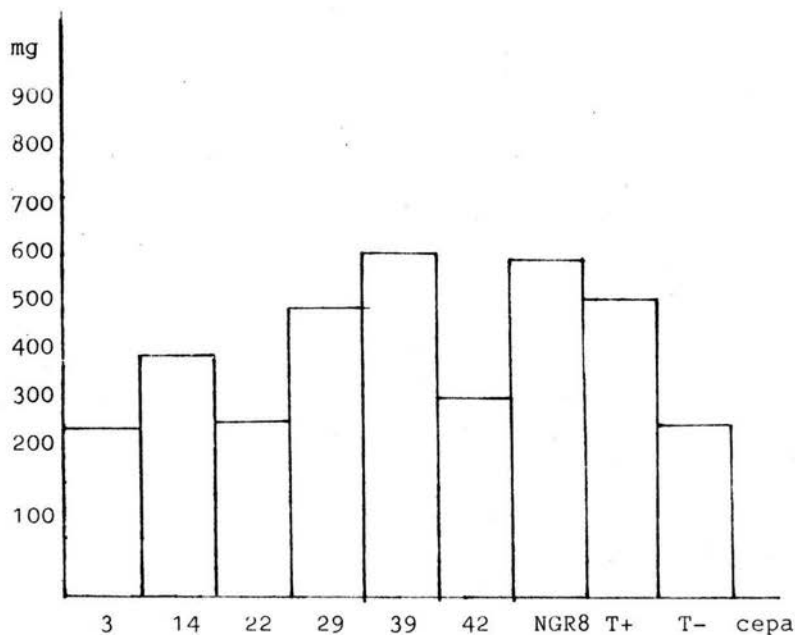
Grafica 2. Altura en cm de plantas de Leucaena leucocephala despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



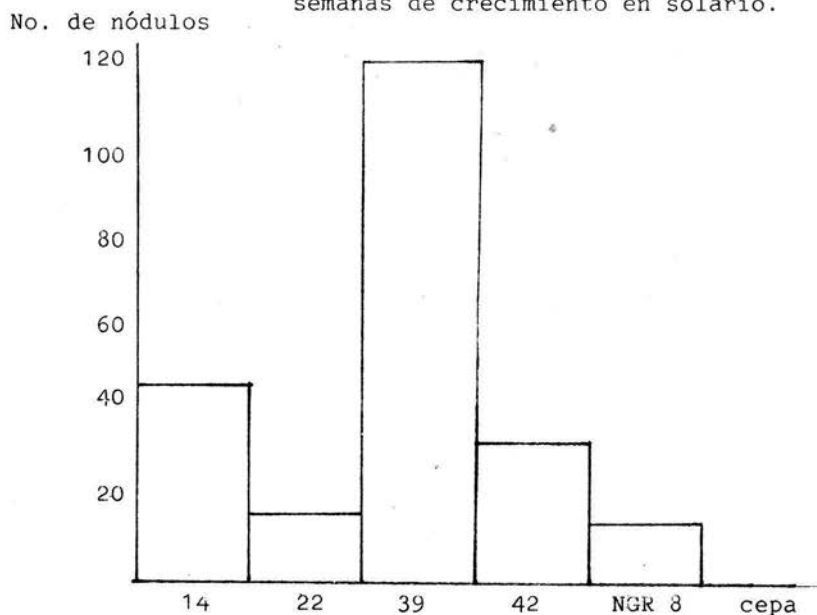
Grafica 3. Peso seco (mg) de la parte aerea de plantas de *Leucaena esculenta* despues de 8 semanas de crecimiento en solarario.



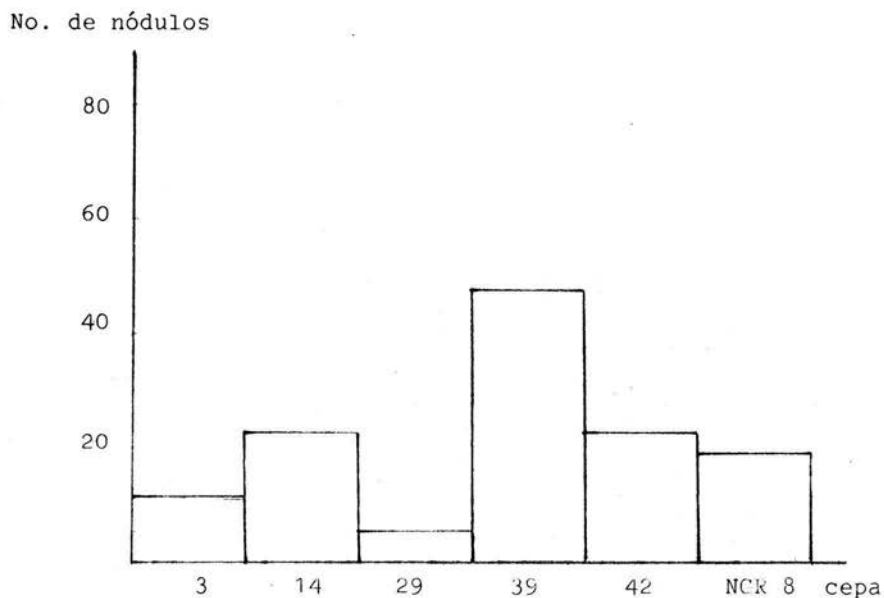
Grafica 4. Peso seco (mg) de la parte aerea de plantas de *Leucaena leucocephala* despues de 8 semanas de crecimiento en solarario.



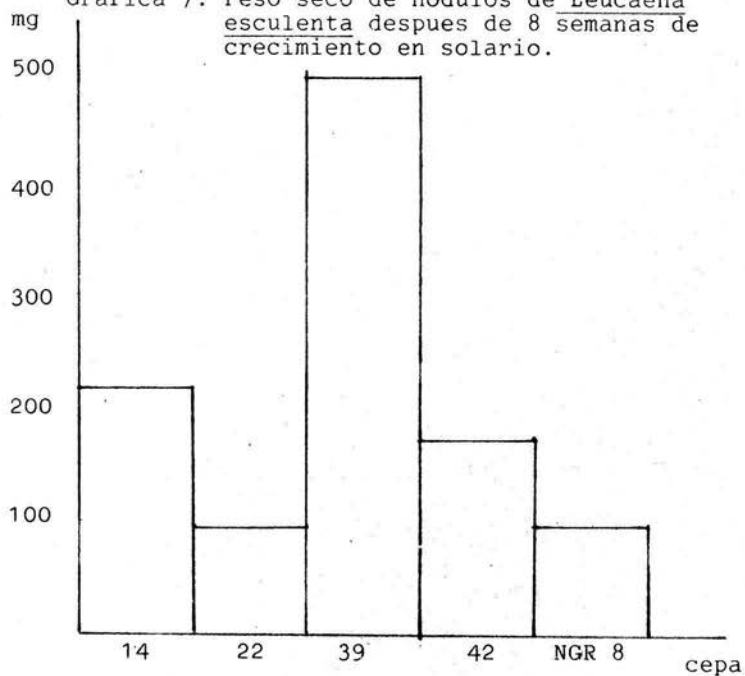
Grafica 5. Número de nódulos de plantas de Leucaena esculenta despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



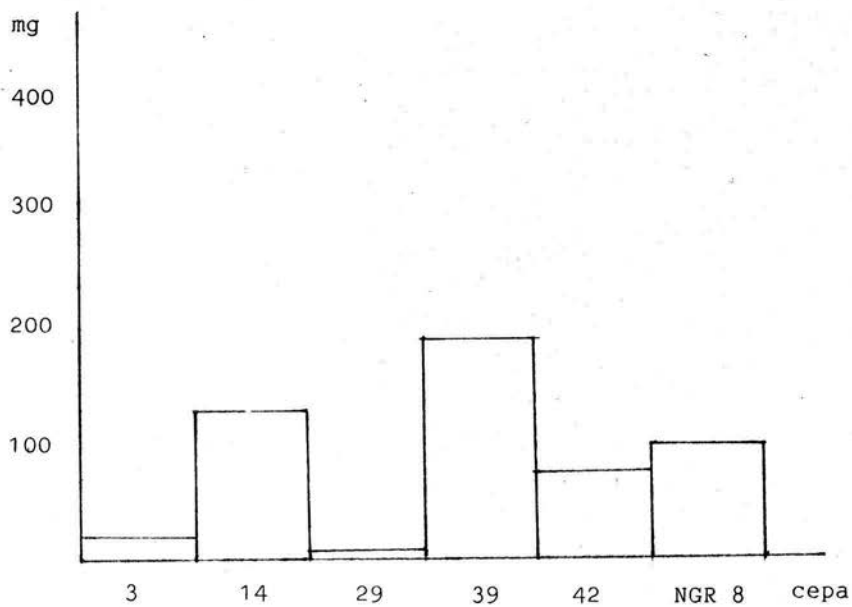
Grafica 6. Número de nódulos de plantas de Leucaena leucocephala despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



Grafica 7. Peso seco de nódulos de Leucaena esculenta despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



Grafica 8. Peso seco de nódulos de Leucaena leucocephala despues de 8 semanas de crecimiento en solarío.



CONCLUSIONES

- 1-. Los resultados de número más probable de propágulos de hongos VA indican que sí existe variación estacional de las poblaciones en las áreas estudiadas.
- 2-. Con respecto al número de esporas encontradas debe hacerse un estudio más detallado ya que en este caso se contabilizó el número total de esporas y sería conveniente establecer el porcentaje de esporas viables y no viables.
- 3-. Los resultados del tipo de esporas indican que el género Glomus fue predominante en estos sitios.
- 4-. Los puntos anteriores subrayan la importancia de la textura del suelo, el tipo de vegetación y los niveles de fósforo disponible, en la proliferación, establecimiento y fisiología de la simbiosis con hongos micorrícicos.
- 5-. Con relación a las poblaciones de Rhizobium también se observó variación estacional.
- 6-. En el ensayo de nodulación y efectividad de Rhizobium la cepa 39 resultó ser la más efectiva e infectiva.
- 7-. Pese a que los resultados estadísticos indican que no hay diferencias significativas entre especies de planta en relación al peso seco de la parte aérea la apariencia de las plantas era totalmente diferentes como ya se mencionó.

A P E N D I C E

DETERMINACION DE TEXTURA POR EL METODO DE BOUYUCOS

(Valdés, R.M., 1986)

- Pesar 50 g. (fina) ó 100 g. (arenosa) de suelo previamente tamizado (abertura de malla: 2 mm.)
- Eliminar la materia orgánica agregando peróxido de hidrógeno al 30 % (15 ml. por cada 50 g. de suelo)
- Dejar secar durante 24 horas a 80°C
- Agregar 10 ml. de hexametáfosfato de sodio y 250 ml. de agua destilada
- Dejar reposar 15 minutos
- Dispersar la suspensión por 15 a 20 minutos en una batidora
- Transferir la muestra a una probeta y aforar con el hidrómetro dentro hasta 1,130 ml. y 1250 con agua destilada
- Retirar el hidrómetro y mezclar la muestra
- Tomar la primera lectura a los 40 segundos
- Introducir el hidrómetro y registrar la temperatura
- Dejar en reposo la probeta durante dos horas
- Tomar la segunda lectura en forma similar a la primera

Cálculos

Por cada grado arriba de 19.4°C agregar a la lectura 0.36 unidades y por cada grado abajo de 19.4°C restar a la lectura 0.36 unidades.

Primera Lectura Corregida X 100 = % de limo + arcilla
 peso de la muestra

100 - % de limo + arcilla = % de arena

Segunda Lectura Corregida

peso de la muestra X 100 = % de arcilla

100 - % de arena + arcilla = % de limo

Leer los porcentajes obtenidos en el triángulo de textu-
ra.

DETERMINACION DE PH (Valdés, R.M., 1986)

- Pesar 50 g. del suelo a examinar
- Colocar en un vaso de precipitado de 250 ml.
- Agregar 150 ml. de agua destilada
- Agitar perfectamente
- Dejar reposar la muestra durante 30 minutos
- Hacer la lectura en el potenciómetro
- Registrar los valores obtenidos

METODO DE WALKLEY Y BLACK

DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA (Valdés, R.M., 1986)

- Colocar en un matr az erlenmeyer de 500 ml. 1 g. de suelo
- Añadir 10 ml. de K_2CrO_7 IN y mezclar con movimiento girato - rio
- Agregar 20 ml. de H_2SO_4 concentrado y seguir mezclando
- Dejar reposar durante 30 minutos
- Simultáneamente realizar lo mismo con un blanco de reactivo (sin suelo)
- Dilu ir la mezcla a 200 ml. con agua destilada
- Adicionar 10 ml. de H_3PO_4 al 85% y 30 gotas de difenilamina (indicador)
- Titular con una solución de $FeSO_4$ IN

Al principio la mezcla debe tener un color verde oscuro- debido a los iones cromato, después se desplaza hacia azul y- finalmente vira a amarillo.

C culos

Realizar los c culos por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de materia orgánica} = 10 \left(1 - \frac{P}{T} \right) \times 1.34$$

P = ml. de disolución de $FeSO_4$ IN gastado por el problema

T = ml. de disolución de $FeSO_4$ IN gastado por el blanco

METODO DEL VERSENATO PARA DETERMINACION DE CAPACIDAD
DE INTERCAMBIO CATIONICO (Valdés, R.M., 1986)

- Colocar 5 g. de suelo en un embudo de filtración que contenga un papel filtro
- Añadir 5 veces (10 ml. cada vez) CaCl_2 1N (desechar este filtrado)
- Añadir 5 veces (10 ml. cada vez) alcohol etílico de 96° (desechar este filtrado)
- Agregar 5 veces (10 ml. cada vez) NaCl 1N (guardar este filtrado)
- En el filtrado anterior se titula el Ca^{++} por el método del Versenato
- Agregar 10 ml. de solución amortiguadora de pH 10
- Agregar 5 gotas de solución de KCN
- Adicionar 5 gotas de solución de clorhidrato de hidroximolina
- Añadir 5 gotas del indicador negro de ericromo T
- Titular con solución de Verseno hasta que el color vare de púrpura a azul

Cálculos

$$\text{Normalidad de EDTA} = \frac{0.1N \times 10 \text{ ml.}}{\text{ml. de EDTA gastados}}$$

$$\text{CIC (meg. por 100)} = \frac{\text{ml. de EDTA} \times N \times 100}{\text{g. de suelo}}$$

AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM A PARTIR DE NODULO (VINCENT 1975)

- Utilizar nódulos de raíces frías o almacenadas en refrigeración (4°C)
- Cortar los nódulos dejando una porción de raíz adherida para manipularlas
- Lavar perfectamente el nódulo hasta que se elimine el suelo
- Colocar el nódulo (s) en etanol al 95% por 10 segundos
- Sumergir entonces el nódulo en Hg Cl₂ al 0.1% acidificado - por 1-30 mins. según el tamaño del nódulo
- Lavar vigorosamente por lo menos seis veces con agua estéril
- Se coloca el nódulo en un tubo de ensayo con 1ml. de agua - destilada estéril y se aplasta asépticamente
- Tomar una asada del jugo lechoso y sembrarlo sobre una placa de agar extracto levadura manitol
- Incubar a 28°C
- Después de 4 ó 5 días revisar
- Purificar -en caso de ser necesario- (muy contaminado)
- Sembrar entonces en tubos con agar inclinado*
- Registrar el aislamiento
- Identificar la autenticidad del aislamiento como Rhizobium- por prueba de infección en planta o por su caracterización

COLORACION DE GRAM

Soluciones Utilizadas

A. Solución Cristal Violeta

| | |
|-------------------|---------|
| Cristal Violeta | 10 g. |
| Oxalato de Amonio | 4 g. |
| Etanol | 100 ml. |
| Agua destilada | 400 ml. |

B. Solución de Yodo

| | |
|-------------------|---------|
| Yodo | 1 g. |
| Yoduro de Potasio | 2 g. |
| Etanol | 25 ml. |
| Agua destilada | 100 ml. |

C. Alcohol (Yodado)

| | |
|----------------------|--------|
| Solución de Yodo (B) | 5 ml. |
| Etanol | 95 ml. |

D. Colorante de Contraste

| | |
|---|---------|
| Solución al 2.5% safranina en etanol | 10 ml. |
| Agua destilada | 100 ml. |

Procedimiento

- Preparar y fijar el frotis en la forma habitual
- Teñir con la solución A durante un minuto
- Enjuagar con agua y escurrir el exceso

- Cubrir con solución B, durante un minuto escurrir la solución
- Decolorar con solución C el tiempo suficiente para quitar el exceso de colorante
- Lavar con agua y escurrir
- Teñir con solución D durante cinco minutos
- Lavar con agua, eliminar el exceso y secar
- Examinar directamente el objetivo de inmersión

Las células Gram positivas toman un color violeta y las Gram negativas un color rojo claro.

COMPOSICION DEL MEDIO LEVADURA MANITOL DE FREED Y WASKMAN
(Valdés, R.M., 1986)

| | |
|-------------------------------------|---------|
| KHPO ₄ | 0.5 g. |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.2 g. |
| NaCl | 0.1 g. |
| Manitol | 10.0 g. |
| Extracto de levadura | 0.5 g. |
| Agar | 18.0 g. |
| Rojo Congo diluído 1:400 | 10 ml. |
| Agua destilada | 1.000 |

Ajustar el pH a 6.5 a 7.0 y esterilizar en autoclave a -
121°C durante 15 minutos.

SOLUCION NUTRITIVA DE NORRIS (Valdés, R.M., 19 86)

| | |
|---------------------------------------|----------|
| KCl | 0.149 g. |
| K_2HPO_4 | 0.348 g. |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.493 g. |
| Micronutrientes | |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0.157 g. |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.440 g. |
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 4.060 g. |
| H_3SO_3 | 2.860 g. |
| $(NH_4)_2MO_7 \cdot 0.24 \cdot 4H_2O$ | 0.020 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Utilizar 0.5 ml. de esta solución por litro de solución nutritiva.

| | | |
|--|----------|---|
| $FeSO_4$ | 0.5% | } tomar 0.5 ml. de cada una por litro de solución |
| Acido cítrico | 0.5% | |
| $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.688 g. | |
| Agua destilada | 1000 ml. | |
| pH final 6.5 ajustar con NaOH 10% o | | |
| H_2SO_4 20% | | |
| Al utilizar, diluir 1/5, almacenar a 4°C | | |

METODO DE FLOTACION Y BURBUJEO PARA EXTRACCION DE
ESPORAS DE HONGOS VA (FURLAN Y FORTIN? 1975).

- Pesar una cantidad de suelo X (p.ej. 100 g)
- Tamizar (2mm de abertura)
- Mezclar el suelo con agua
- Dejar reposar 40 segundos
- Pasar a traves de una serie de tamices (de mayor a menor)
- Recojer el último tamizado y colocarlo en una columna de vidrio
- Agregar glicerol (40 % v/v)
- Inyectar aire hasta una presión de 12 lb por 2 min.
- Dejar reposar 30 min
- Aspirar el sobrenadante y recoger las esporas
- Lavar con agua
- Colocar las esporas en una caja de petri conteniendo solución fisiológica de Ringer más antibióticos
- Observar al microscopio y contar

TECNICA DE TINCION DE RAICES PARA OBSERVAR INFECCION
ENDOMICORRIZICA (PHILLIPS AND HAYMANN, 1970)

- Lavar las raíces y colocar en frascos viables
- Llenar con KOH al 10%
- Esterilizar 120°C (15 lb.) por minuto
- Quitar el KOH y enjuagar por lo menos tres veces o hasta -
que el agua del frasco quede limpia
- Agregar H₂O₂ alcalina a temperatura ambiente por 10 a 20 mi
nutos o hasta que las raíces se blanqueen
- Enjuagar por lo menos tres veces
- Agregar HCl al 1% y mantenerlas así durante tres a cuatro -
minutos
- Después de este paso no enjuague
- Agregue solución de fuesina ácida-ácido láctico 0.01%
- Esterilizar a 120°C (15 lb.) durante 10 minutos
- Observar al microscopio

DETERMINACION DE INFECCION MICORRIZICA (FURLAN, 1981)

- Cortar el material teñido (raíces) en fragmentos de 1 cm. - aproximadamente
- Colocar los fragmentos en lactofenol limpio para quitar el exceso de colorante
- Montar los fragmentos de raíz en un portaobjetos limpio (20 a 25 fragmentos por portaobjetos) y tapar con un cubreobjetos
- Agregar una gota de lactofenol en la orilla del cubreobjetos y permitir que difunda
- Presionar levemente con papel higiénico
- Observar al microscopio para determinar presencia o ausencia de infección micorrizica (100 x)

La infección puede manifestarse como puntos de entrada, micelio externo, micelio interno, esporas, vesículo o arbusculo.

SOLUCION FISIOLOGICA DE RINGER

| | |
|-------------------------|----------|
| NaCl | 6 g. |
| CaCl | 0.1 g. |
| KCl | 0.1 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |
| pH 7.4 ajustar con NaOH | |

- Esterilizar a 120°C durante 20 minutos

- Agregar:

| | |
|--|---------|
| Sulfato de Estreotomicina | 200 mg. |
| Gentamicina | 100 mg. |
| Solución de H ₂ O ₂ alcalinizada | |
| NH ₄ OH | 3 ml. |
| H ₂ O ₂ al 10% | 30 ml. |
| agua destilada | 567 ml. |

- Si no hay NH₄OH disponible, agregar amonio común

- La solución debe prepararse al momento de utilizar

| | |
|--|---------|
| Solución de Fuecsina ácida-ácido láctico | |
| Acido láctico | 875 ml. |
| Glicerina | 63 ml. |
| Fuecsina ácida | 0.1 g. |
| Agua destilada | 63 ml. |

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M. 1977. The nitrogen cycle. in Introduction to soil microbiology. Second edition. John Wiley and Sons. New York. 223-329.
- Abbot, L.K. and A.D. Robson. 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular fungi: effect of inoculum type. Aust. J. Agric. Res. 32:631-639.
- Barea, J.M. and C. Azcón-Aguilar. 1983. Mycorrhiza and their significance in nodulating nitrogen fixing plants. Adv. Agron. 36:1-54.
- Barea, J.M., C. Azcón-Aguilar y B.R. Fajardo. 1984. Avances recientes en el estudio de las micorrizas VA. I Formación, funcionamiento y efectos en la nutrición vegetal (1). An. Edafol. Agrobiol. 659-677
- Brewbaker, J. 1978. Guide to the systematics of the genus Leucaena (Mimosaceae). Memorias del CIAT. Colombia. 17 pp.
- Brill, W. 1977. Fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia 8:44-54.
- Brill, W. 1980. Biochemical, genetics of nitrogen fixation. Microbiol. Rev. 44:449-467.
- Cajuste, L. 1987. El fósforo aprovechable en los suelos. en Análisis Químico para evaluar la fertilidad del suelo. SMCS. 133-151
- Cress, W. A., G.O. Throneberry and D.L. Lindsey. 1979. Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhiza and nonmycorrhizal tomato roots. Plant. Physiol. 64: 484
- Date, R.A. 1976 Especificidad en la simbiosis Rhizobium-leguminosa. en VIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Cali, Colombia. 59-61
- Dazzo, F.B. 1984. Specific phases of root hair attachment in the Rhizobium trifolii clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 48:1140-1150.
- Enriquez, V.F. 1986. Efectos del tratamiento termico y ferrico sobre la toxicidad de Leucaena leucocephala en dietas para pollos de engorda. en Memorias de la Reunión Pecuaria en México. SARH-INIFAP. 252.
- Etchevers, J.D. 1987. Componentes de un programa de analisis de suelo. en Análisis Químico para evaluar la fertilidad del suelo. SMCS. 191-202.
- FAO. 1983. Technical Handbook on symbiotic nitrogen fixation legume-Rhizobium. Roma, Italia, 190 pp.
- FAO, 1984. Proteger y producir. Conservación del suelo para el desarrollo. Roma, Italia. 40 pp.
- FAO. 1985. La madera fuente de energía. Roma, Italia. 41 pp.

- FIRA. 1977. Potencial y usos de la Leucaena en México. Boletín Informativo de la División de Divulgación y Publicaciones. Banco de México. XI (103)8-16.
- FIRA. 1984. Utilización de la Leucaena como forraje para la alimentación de bovinos en México. Boletín Informativo de la División de Divulgación y Publicaciones. Banco de México. XVI(1530) 1-68.
- Fisher, R.A. and F. Yates. 1963. Densities of organisms estimated by the dilution method. in Statistical tables for Biological, Agricultura and Medical Research. Oliver and Boyd. Edimburg.8-10.
- Furlan, V.B. and J.A. Fortin. 1975. A flotation-bubbling system for collecting Endogonaceae spores from sieved soil. Naturaliste Can. 102: 663-667.
- Furlan, V.B. 1981. Les endomycorrhizes a vesicules et arbuscules (VA) teoria et conseils techniques. Departamente D'Ecologie et Pedologie. Faculte de Foresterie et Geodesia. Universite La Val, Quebec. GiK7P4.67pp.
- Franco, A.A. 1976. Factores nutricionales na simbiose leguminoseae-Rhizobium. en VIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Cali, Colombia. 62-74.
- Gerdemann, J.W. 1975. Vesicular arbuscular micorrhizae. in The development and function of root. Torrey, G.S.. Academic Press, London. 588pp.
- Haymann, D.S. 1982. Practical aspects of vesicular arbuscular micorrhiza. in Advances in Agricultural Microbiology. Subba Rao. Oxford Publ.Co.373.
- Haymann, D.S. 1984. Methods for evaluating and manipulating vesicular arbuscular mycorrhiza. Microbiol. Meth. Environ. Biotech. 95-117.
- Haymann, D.S. 1985. Effect of plant species soil and environmental factors on vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM). Infection and nutrient uptake. in Nuclear techniques to the study the role of micorrhiza in increasing food crop production.29-47.
- INIA. 1983. Guia para la asistencia tecnica agricola:Valles Centrales, Caxaca. SARH.130pp
- INIA. 1984. Guia para la asistencia tecnica agricola:Mixteca Oaxaqueña. SARH. 139pp.
- Little, T.M. y F.J. Hills. 1983. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Edit Trillas. México. 270 pp.
- López, R.J. 1987. Esplendor de la antigua Mixteca. Edit Trillas. México.148pp.
- Marx, D.H. and N.C. Schenck. 1983. Potential of mycorrhizal symbiosis in agricultural and forest productivity. in Challenging problems in plant health. Kommandahland and Williams. Amer.Phitopatol.Soc.334-347.

- Morton, J. 1988. Curso: Procedimientos para la extracción, cultivo e identificación de hongos micorrícicos V-A. ENEP Iztacala. UNAM. 5pp.
- Mosse, B. 1973. Advances in the study of vesicular arbuscular mycorrhiza. A. Rev. Phytopathol. 11:171-196.
- NAS. 1979 Tropical legumes: resources for the future. Washington, D.C. 331pp.
- NAS. 1984. Leucaena: promising forage and tree crop for the tropics. Washington, D.C. 350 pp.
- Nicolson, T.H. 1967. Vesicular arbuscular mycorrhizal: A universal plant symbiosis. Sci. Progr. Oxford. 55:561-581.
- Núñez, E.R. 1985. Efecto de la acidéz del suelo sobre la producción de cultivos y su corrección por encalado. Centro de Edafología. CP. Chapingo, México. 20 pp.
- Nutmann, P.S. 1970. Rhizobium in the soil. in Introduction to the soil ecosystem. Longman Group. 360-383.
- Oakes, A.J. 1968. Leucaena leucocephala: description, culture, utilization. Advancing Frontiers of Plant Sciences. 20:1-114.
- Pérez, G.J. 1977. Leucaena: leguminosa tropical mexicana, usos y potencial. Tesis de Licenciatura. UACH. Chapingo, México. 78pp.
- Pérez, G.J. 1979. Leucaena: leguminosa tropical mexicana. Banco de México. Boletín Informativo de la División de Divulgación y Publicaciones. 69 pp.
- Porter, W.M. 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Aust. J. Soil Res. 17:515-519.
- Pirozenski, K.A. 1981. Interactions between fungi and plants through the ages. Can. J. Bot. 59: 1824-1827.
- Phillips, J.M. and D.S. Haymann. 1970. Improved procedure for clearing root and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. Trans. Bri. Mycol. Soc. 55:158-161.
- Roldan, P.A. y J.D. Trueba. 1978. Factores ecológicos y sociales de la desertificación en México. UASLP. 55-80.
- Roughley, R.J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil. 32: 675-701.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbúscular en el laboratorio. CIAT, Colombia. 121 pp.
- Smith, G.W. and H.D. Skipper. 1979. Comparison of methods to extract spores of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Sci. Soc. Am. J. 43: 722-725.

- Trappe J.M. and Shannon, M.B. 1982. Synoptic keys to genera and species of Endogonaceae. U.S.D.A.Forest Service.31 pp.
- Valdés, R.M. 1986. Manual de practicas de Microbiología Agrícola.ENCB.IPN.
- Vincent,J.M. 1974. Root nodule symbiosis with Rhizobium. in Quispel,A.Ed. The biology of nitrogen fixation. North, Holland Publ.Co.
- Vincent,J.M. 1975. Manual Practico de rhizobiología. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina. 200 pp.
- Whiteman,P.C. 1976.III. Comparison of legume based and nitrogen fertilized tropical pastures for animal production. Memorias del Seminario Internacional de Ganaderia Trópical. Acapulco, Guerrero.SARH.109-122.
- Zelitch,I. 1979. Photosintesis and crop production.Chemical and Engineering. 57:28-48.