

29

2ej.



*Universidad Nacional Autónoma  
de México*

---

*Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"*

*ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS ENTRE Rhizobium  
Y ALGUNAS LEGUMINOSAS DE SAN LUIS  
TAXHIMAY ESTADOS DE HIDALGO Y MEXICO,  
BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.*

*Reporte de Investigación*

*Que para obtener el Título de*

*BIOLOGO*

*presenta*

*José Luis Rosiles Ortega*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

*México, D. F.*

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## I N D I C E .

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	
INTRODUCCION	
III.- REVISION BIBLIOGRAFICA .....	6
1.- IMPORTANCIA DEL NITROGENO .....	6
2.- CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA DE LAS LEGUMINOSAS .....	8
2.1.- CARACTERISTICAS DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS ...	10
3.- EL GENERO <u>Rhizobium</u> .....	11
4.- FORMACION DEL NODULO .....	13
5.- FACTORES QUE AFECTAN LA SUPERVIVENCIA DE <u>Rhizobium</u> ...	16
5.1.- DESECACION Y TEMPERATURA ELEVADA .....	16
5.2.- FACTOR TOXICO DE LA CUBIERTA DE LA SEMILLA .....	16
5.3.- CONTACTO CON FERTILIZANTES .....	16
5.4.- APLICACION DE PESTICIDAS .....	17
6.- FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO .....	18
7.- VIABILIDAD DE LAS CEPAS DE LOS INOCULOS .....	21
IV.- ANTECEDENTES .....	23
V.- OBJETIVOS .....	25
VI.- DESCRIPCION DE LA ZONA DE ESTUDIO .....	26
VII.- MATERIALES Y METODOS .....	29
VIII.- RESULTADOS .....	35
IX.- DISCUSION .....	56
X.- CONCLUSIONES .....	68
XI.- LITERATURA CITADA .....	69
APENDICE I .....	72
APENDICE II .....	76

INDICE DE FIGURAS, TABLAS, DIAGRAMAS Y LISTADOS.

FIGURAS

TITULO	NUMERO	PAGINA
CICLO DEL NITROGENO	1	7
DESARROLLO DEL NODULO	2	14
VIAS METABOLICAS DENTRO DEL NODULO	3	19
LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO	4	27

TABLAS

LISTADO DE LEGUMINOSAS COLECTADAS, CEPAS BACTERIANAS, SEMILLAS DISPONIBLES, TIEMPO Y PORCENTAJE DE GERMINACION DE LAS MISMAS.	1	39
RESULTADOS DE LOS ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS DE SUELO.	2	40
RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS SINBRAS DE BACTERIAS EN DIFERENTES PRUEBAS BIOQUIMICAS Y CULTIVO A 28°C DURANTE 48 HORAS.	3	41
CARACTERISTICAS DE LAS LEGUMINOSAS DETERMINADAS HASTA ESPECIE.	4	50
CARACTERISTICAS DE DESARROLLO Y NODULACION DE LAS LEGUMINOSAS ESTUDIADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.	5	51
ANALISIS DEL NITROGENO TOTAL DEL SUELO DE LAS MACETAS DESPUES DE LA COSECHA DE LEGUMINOSAS.	6(a)	52
ANALISIS DE NITROGENO EN TEJIDOS VEGETALES.	6(b)	53

TITULO	NUMERO	PAGINA
RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LA DETERMINACION DE NITROGENO TO TAL EN SUELO DE LAS MACETAS CON <u>Phaseolus vulgaris</u> .	7	54, 55
REACCIONES CATALIZADAS POR LA NITRO GENASA.	A	73
SISTEMAS BIOLÓGICOS QUE FIJAN NITRO GENO.	B	74
CARACTERISTICAS GENERALES DE <u>Rhizo-</u> <u>bium</u> .	C	75
CLASIFICACION TENTATIVA PARA MATE- RIA ORGANICA PROPUESTA POR MORENO (1970).	D	82
DIAGRAMAS		
DIAGRAMA DE FLUJO	-	30
LISTADOS		
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS ESPECIES DE LEGUMINOSAS COLECTADAS.	A	42

## RESUMEN .

La importancia de la asociación Rhizobium-Leguminosa, radica en la capacidad potencial que presenta para suplir los fertilizantes nitrogenados, además del enriquecimiento de los suelos con este nutrimento, y por lo tanto, la reducción de los gastos de producción, ya sea para cultivos de interés forrajero o alimenticio.

El presente trabajo, es un estudio de las leguminosas silvestres y cultivadas nativas de los suelos cercanos a la presa de San Luis Taxhimay, Estados de Hidalgo y México, así como la obtención de sus cepas infectantes, evaluando su efectividad, así como su posible especificidad.

Se colectaron un total de 35 especies de leguminosas llegando a determinarse hasta especie 20 de ellas, mismas que fueron depositadas en el herbario de la E.N.E.P. Zaragoza.

Asimismo se obtuvieron 16 cultivos puros de Rhizobium a partir de los nódulos simbióticos determinandose uno de ellos como Rhizobium phaseoli y otros tres como Rhizobium caupi. De igual manera se observó que el suelo de la zona de estudio presenta propiedades físicas y químicas (Textura, D.A., D.R., % M.O., pH, y % N<sub>c</sub>) adecuadas para el desarrollo de los rizobios, sin embargo, el alto contenido de arcilla provoca que el suelo se compacte y esto dificultó un buen desarrollo radicular de las leguminosas que se utilizaron en el experimento de invernadero.

Se realizaron pruebas de inoculación cruzada entre tres leguminosas silvestres y una cultivada con sus respectivas cepas infectantes en un diseño experimental de 4X4 más un lote testigo, del cual los resultados obtenidos fueron válidos únicamente para Phaseolus vulgaris y Crotalaria pumila debido principalmente a problemas de no germinación con las otras dos especies de leguminosas (Dalea cici-

triodora y Phaseolus sp.), encontrándose que la cepa más efectiva para las especies citadas fueron FN 4 y FN 19 respectivamente.

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

La familia de las leguminosas presenta características muy particulares que la hacen fácilmente diferenciable; esta familia posee alrededor de 550 géneros y 13 000 especies, de las cuales Rzedowski (1979) reporta para el Valle de México, 139 especies.

Dentro de este grupo de fanerógamas estan representados todos los tipos de crecimiento vegetal, a los que pertenecen herbáceas anuales y perennes, arbustos, enredaderas, árboles; tienen una distribución mundial, sin embargo, se dice que su origen es tropical - (Postgate, 1981).

Para el hombre, esta familia tiene una importancia primordial, ya que proporciona alimentos, para él y para sus animales domésticos, utilizandose inclusive con fines ornamentales.

La legumbre o vaina, es el fruto característico de la familia, esta formado por un carpelo simple con un lóculo y numerosas semillas, en la mayoría de los géneros es dehiscente y sólo unos cuantos de ellos, lo presentan indehiscente (Postgate, 1981).

Hay en esta familia la presencia de una característica importante en cuanto a su metabolismo, ya que la mayor parte de sus miembros posee la capacidad de fijar nitrógeno de manera simbiótica, al asociarse a bacterias del género Rhizobium, formando nódulos en el tejido radicular del vegetal (Sanchez, 1979).

Las bacterias del género Rhizobium, son bacilos Gram Negativos que contienen el complejo nitrogenasa, capaz de fijar el nitrógeno atmosférico, este proceso se realiza en el interior de las bacterias en forma anaeróbica, de esta forma la bacteria obtiene carbohidratos de la planta y esta última aprovecha el nitrógeno fijado por aquella.

Como producto de la simbiosis se obtienen plantas más vigorosas, además se enriquece el suelo, una vez que se da el proceso de descomposición de los tejidos vegetales y su posterior incorporación al sustrato (Allen y Allen, 1981).

Es bien conocido que la asociación Rhizobium-Leguminosa presenta tres fenómenos que determinan en gran parte su existencia y óptimo funcionamiento, éstos son; la especificidad, infectividad y efectividad (Quispel, 1974).

La inoculación de semillas de leguminosas, puede ser benéfica en suelos en los cuales la especie particular de Rhizobium esta ausente, muy esparcida o cuando la cepa local es inefectiva o su capacidad de fijación es mínima (Vargas, 1969).

Las tierras agrícolas requieren de insumos tales como riego, - fertilizantes, plaguicidas, etc. Sin embargo, la utilización sostenida del suelo provoca una necesidad creciente en el suministro de fertilizantes, que llega a hacer incosteable la obtención de productos alimenticios. De este modo, en un ecosistema agrícola, el aporte de nitrógeno, producto de la simbiosis antes mencionada, constituye una alternativa biológica que puede sustituir una buena parte de los insumos de origen sintético y así evitar el empobrecimiento de los suelos agrícolas (Azcón, 1983).

Todo lo anterior, lleva a considerar la importancia de la realización de estudios relacionados a la asociación simbiótica Rhizobium-Leguminosa, encaminados a la reducción de los costos de insumos agrícolas y pecuarios.

El presente trabajo, es un estudio de las leguminosas silvestres y cultivadas nativas de los suelos cercanos a la presa de San Luis Taxhimay, Estados de Hidalgo y México, así como la obtención

de sus cepas infectantes, evaluando su efectividad, así como su posible especificidad.

### III.- REVISION BIBLIOGRAFICA .

#### 1.- IMPORTANCIA DEL NITROGENO.

El nitrógeno es un componente esencial de las proteínas, ácidos nucleicos y muchas otras biomoléculas que se encuentran en los seres vivos y en la mayoría de los casos es el elemento limitante en la productividad de los ecosistemas, lo que constituye una paradoja, ya que el 80% del aire está compuesto por nitrógeno, mismo que no puede ser incorporado al metabolismo de los autótrofos ya que se encuentra en forma inerte; sin embargo puede participar en los sistemas biológicos, cuando ha sido "fijado"; es decir, cuando se combina con otros elementos como el hidrógeno y el oxígeno, capacidad que la naturaleza reserva únicamente a bacterias de algunos cuantos géneros y a las algas verde-azules (Nishustín y Shilnikova, 1971).

Ningún otro organismo superior ha desarrollado esta capacidad, por lo tanto, se dice que el nitrógeno atmosférico es fijado por diferentes tipos de bacterias, las de tipo simbiótico asociadas a leguminosas y que pertenecen al género Rhizobium, o las asociadas a otro tipo de plantas y que se ubican dentro del género Frankia; ambos géneros bacterianos forman nódulos en los tejidos radiculares de sus hospederos, o bien los hay de vida libre como Azotobacter, Clostridium, Aerobacter, Methanobacterium, Azospirillum, Chromatium, Rhodomicrobium, Chlorobium y otros organismos, aparte de los géneros antes mencionados (Stumpf y Conn, 1980).

Dentro del ciclo del nitrógeno, el siguiente paso es la asimilación, que consiste en la conversión biológica de los compuestos nitrogenados, fijados en forma de iones nitrato y amonio, en nitrógeno orgánico. Para las plantas verdes el proceso se inicia con la absorción del nitrógeno inorgánico teniendo, como mayor fuente el -

FIGURA 1 CICLO DEL NITROGENO

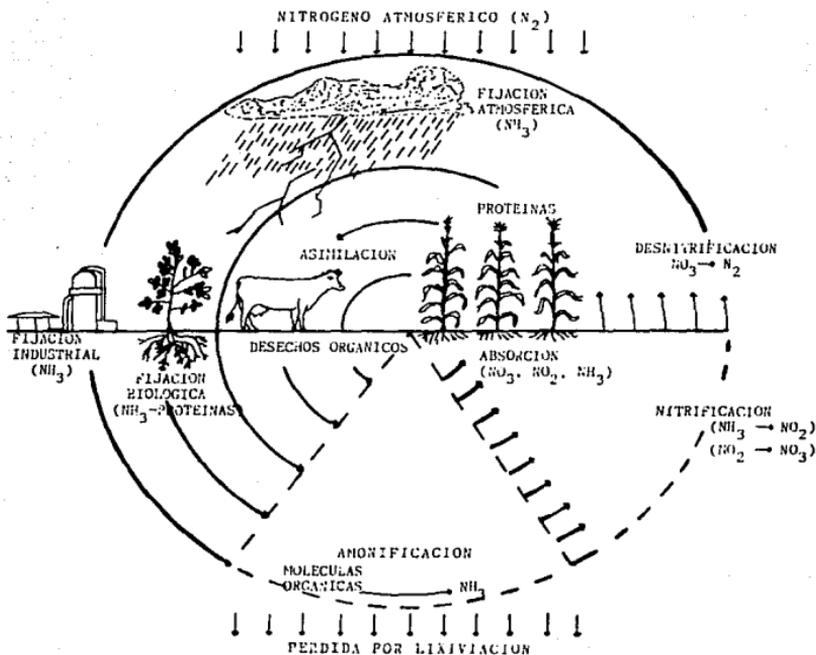


Figura 1.- CICLO DEL NITROGENO. La figura esquematiza el equilibrio entre las dos fuentes principales de nitrógeno, atmósfera y corteza terrestre.

(Modificado de Brill, 1977).

ión nitrato; éste se incorpora como grupo amino a moléculas orgánicas originándose así los aminoácidos. (Bonner y Varner, 1976).

En esta asimilación, la primera reacción es la reducción de nitrato a nitrito (catalizada principalmente por la nitrato reductasa) y posteriormente por la acción de la nitrito reductasa el ión nitrito se transforma en ión amonio (Larcher, 1977).

Al morir los seres vivos, la descomposición de las proteínas y otros compuestos nitrogenados produce amoníaco; a este proceso se le conoce como amonificación.

La nitrificación es la conversión de amoníaco en ión nitrato, en este proceso se ven involucradas las bacterias del género Nitrosomonas (transforman el amoníaco en ión nitrito), y las bacterias del género Nitrobacter (transforman el ión nitrito en ión nitrato); gracias a este paso una parte del nitrógeno del suelo se mantiene ahí mismo, debido a que el amoníaco es muy volátil, pero por otra parte, los nitratos son fácilmente lavados por la lluvia; aunque parte de ellos pueden ser usados por las plantas antes de ser lavados. Por lo tanto, se presenta una pérdida que sólo es equilibrada por los diferentes pasos del ciclo, en especial la fijación del nitrógeno (Postgate, op. cit.).

Por último esta la desnitrificación, en la cual el ión nitrato es utilizado como suplente del oxígeno en la respiración por bacterias de los géneros Pseudomonas, Micrococcus y Thiobacillus y da por resultado la formación de nitrógeno molecular que se incorpora así a la atmósfera, cerrando el ciclo (Brill, 1977). Ver figura 1.

## 2.- CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA DE LAS LEGUMINOSAS.

La clasificación de las leguminosas según Sanchez (1979), es -

la siguiente:

Reino: Vegetal.

Subreino: Embryophyta.

División: Magnolophyta.

Subdivisión: Pterosida.

Clase: Angiospermae.

Subclase: Dicotyledonae.

Orden: Rosales.

Familia: Leguminosae.

Las leguminosas son plantas leñosas o herbáceas, de hojas generalmente alternas, espaciadas, estipuladas, pecioladas o sésiles, - compuestas, pinnadas, bipinnadas, digitado compuestas, trifoliadas o bien pueden ser simples. Flores cigomorfas o actinomorfas, solitarias o dispuestas en fascículos, cabezuelas o racimos, que pueden - ser axilares o terminales, normalmente hermafroditas, algunas unisexuales o polígamas, con prefloración valvar o atejada. Cáliz de 5 sépalos, libres o algo soldados. Corola de 5 pétalos libres, iguales o desiguales, imbricados o valvados, por lo general con 5, 10 ó más estambres, con los filamentos libres, o algo soldados entre sí y anteras biloculadas, de dehiscencia longitudinal, gineceo súpero, unilocular, unicarpelar, con uno o varios óvulos. Su fruto es típicamente una legumbre dehiscente o indehiscente, con una o varias semillas, con el fúnculo por lo común expandido formando un arilo - carnoso, casi no tiene endospermo. Sus raíces están provistas de nodosidades, debidas a la simbiosis con las bacterias del género Rhizobium (Sanchez, op. cit.; Rzedowski, op. cit. y Allen y Allen, - 1979).

Las leguminosas tienen una amplia distribución, ocupando entre el segundo y tercer lugar en el número de especies de plantas con -

flores, la mayoría de éstas son árboles, arbustos o hierbas tendidas, trepadoras o erguidas, a menudo se encuentran en hábitats tropicales inaccesibles. Aquellas especies que son cultivadas y otras silvestres, incluyen la mayor parte de las plantas comestibles, forrajeras y de pastoreo, así como las que producen madera para construcción y otros productos (Rzedowski, op. cit.).

Para el Estado de México, Martínez (1955), menciona que las leguminosas más importantes desde el punto de vista agronómico y de forraje, son las siguientes:

TIPO DE INTERES:

= Agronómico.

+ Forrajero.

<u>Acacia farnesiana</u> Willd.	+	<u>Minkelersia multiflora</u> Rose.	+
<u>Calliandra houstoniana</u> (Mill). St.	+	<u>Phaseolus coccineus</u> L.	+
<u>Canavalia villosa</u> Benth.	+	<u>Phaseolus heterophyllus</u> H.B.K.	+
<u>Desmanthus pumilus</u> (Schl). Macbr.	+	<u>Phaseolus pedicelatus</u> Benth.	+
<u>Medicago denticulata</u> Willd.	+	<u>Phaseolus vulgaris</u> L.	=
<u>Medicago hispida</u> Gaertn.	+	<u>Tamarindus indica</u> L.	=
<u>Medicago lupulina</u> L.	+	<u>Trifolium amabile</u> H.B.K.	+
<u>Medicago sativa</u> L.	+	<u>Trifolium mexicanum</u> Hemsl.	+
<u>Melilotus alba</u> Willd.	+	<u>Vicia faba</u> L.	=
<u>Minkelersia biflora</u> Hemsl.	+		

2.1.- CARACTERISTICAS DE LAS SEMILLAS DE LEGUMINOSAS.

Las leguminosas son una familia que abarca todas las formas de desarrollo, es decir, se encuentran desde rastreras hasta arbóreas, por lo mismo su fruto (vainas), y desde luego la semilla varían ampliamente tanto en forma como en tamaño.

En general, las semillas de las leguminosas del estrato herbá-

ceo, son aquellas que presentan el tamaño más reducido en cuanto a semillas, sin embargo, el tamaño no afecta de ninguna manera sus propiedades germinativas. En esta familia, las testas de las semillas tienden a ser duras y con frecuencia impermeables al agua, según lo señala la U.S.D.A. (1962), esto afecta directamente la capacidad germinativa de las mismas, al evitar las reacciones hormonales que involucran al embrión. Aún en el caso de que se pueda presentar la germinación, penetrando el agua al interior de la semilla, la testa al estar constituida por tejido densamente compacto, impide la salida del embrión al exterior.

Otra característica que disminuye la viabilidad de las semillas es el endospermo, Duffus y Slaughter (1980), mencionan que el endospermo de la mayor parte de las leguminosas, es sólo una delgada membrana, la cual se reduce más, si la semilla no está completamente madura, por lo que no es aconsejable el almacenamiento prolongado de las mismas.

### 3.- EL GENERO Rhizobium.

Las bacterias del género Rhizobium, son bacilos sin endosporas, aeróbicas, Gram Negativas. Incitan hipertrofias corticales en las plantas infectadas; en leguminosas, forman nódulos, sus dimensiones varían entre 0.5 y 0.9 micrómetros de ancho, por 1.2 a 3.0 micrómetros de largo, son móviles en estadios juveniles. En su metabolismo respiratorio, el oxígeno es el aceptor final de electrones. No licúan la gelatina, producen muy poco  $H_2S$  o no lo producen (Bergey, 1974). Las bacterias de la familia Rhizobiaceae no utilizan el citrato, no producen 3-Cetolactosa, si se habla de las que pertenecen al género Rhizobium. El grupo "I" de este género, se caracteriza por tener un crecimiento rápido en un medio con extracto de leva

dura, sin embargo las pertenecientes al grupo "II", presentan un crecimiento lento sobre el mismo medio (Bergey, op. cit.).

En general los rizobios pueden encontrarse libres o formando simbiosis intracelular, pudiendo fijar nitrógeno en ambos casos (Alexander, 1980).

Generalmente se distingue a los dos grupos que forman al género Rhizobium, de acuerdo a tres características principales:

- 1) Número y posición de flagelos.
- 2) Producción de ácidos o bases.
- 3) Tiempo de generación.

El grupo I, se caracteriza por poseer 6 flagelos en posición perifrítica, producción de ácidos y con tiempo de generación de 2 a 4 horas, encontrándose en este grupo a Rhizobium phaseoli, R. trifolii, R. meliloti y R. leguminosarum.

El grupo II, se distingue por tener un sólo flagelo polar o subpolar, su producción de álcalis le permite una mayor tolerancia en medios ácidos, su tiempo de generación es de 4 a 6 horas y dentro de este grupo están; R. lupini, R. japonicum y R. caupi (Quispel, 1974). Ver apéndice 1, Tabla C.

En general los rizobios se encuentran en forma pleomórfica (bacteroides) dentro de los sacos membranosos producidos por la planta. Los bacteroides del nódulo, característicamente implican la fijación de nitrógeno molecular, en formas utilizables por la planta hospedadora.

Todas las cepas de Rhizobium, presentan cierto grado de afinidad al hospedero, lo anterior se conoce como especificidad y se refiere a que las especies de Rhizobium, sólo se asocian a determinadas especies de leguminosas, aún cuando pueden darse casos de inoculación cruzada; la infectividad se podría definir como la capacidad

de la bacteria para penetrar al tejido cortical radicular de la planta y formar nódulos, por otro lado la efectividad es la capacidad de fijación de nitrógeno por la asociación Rhizobium-Leguminosa, es decir, el nitrógeno que puede ser aprovechado por el vegetal. La efectividad varían ampliamente entre las cepas de una misma especie, se estima que alrededor del 25% de las cepas existentes en el mundo son inefectivas, otro 50% tiene una eficacia media y el 25% restante fija el nitrógeno de manera óptima (Alexander, 1980).

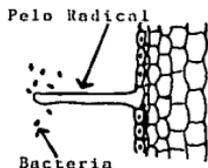
La infectividad y efectividad, representan un fenómeno discreto que varía en amplios límites, dependiendo de factores genéticos presentes en la cepa bacteriana y en la planta hospedadora. Las pruebas con vegetales son necesarias para establecer una determinación específica (Bergey, op. cit.).

#### 4.- FORMACION DEL NODULO.

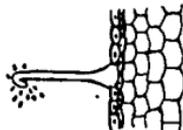
La relación entre la bacteria y la leguminosa, se inicia a partir de la proliferación de la primera en el suelo y la posterior adsorción de la bacteria por el pelo absorbente de la leguminosa; la bacteria, entonces, perfora la membrana del pelo radical y penetra en dicha célula un filamento de infección bajo la influencia del mismo núcleo celular del pelo absorbente, posteriormente se da la formación y penetración del filamento infeccioso dentro y alrededor de las células corticales, donde después de pasar las tres primeras capas celulares, comienza a ramificarse induciendo a la vez la división de las células del tejido radicular de la leguminosa con lo cual se da la formación del nódulo (Nutman, 1976 . Ver figura 2 ).

La forma del nódulo, va a estar determinada primeramente por el hospedero, pero puede modificarse por la efectividad del Rhizobium asociado. El nódulo puede ser más o menos esférico, cilíndrico

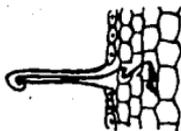
## FIGURA 2 DESARROLLO DEL NODULO



1) Multiplicación de los rizobios.



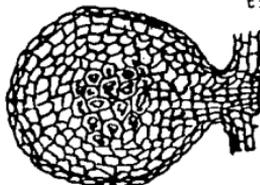
2) Adsorción de la bacteria y torsión del pelo radical.



3) Formación del filamento de infección.



4) Proliferación de los rizobios en tejido cortical.



5) Nódulo maduro.

Figura 2.- FORMACIÓN DEL NODULO. 1) Proliferación de rizobios en la rizosfera de la leguminosa, en 2) la adsorción del rizobio que parece estar relacionada a proteínas específicas de la leguminosa y bacteria. 3) Filamento que crece a través y entre las células, en 4) división de las células radiculares diploides. 5) Nódulo maduro, cuando es efectivo posee una zona central roja. (Tomado de Azcón, 1983).

o circular. La forma elongada puede incluir pequeñas protuberancias, la superficie puede ser lisa, costrosa o acanalada (Quispel, 1974).

Según Quispel (1974), un nódulo efectivamente funcional, tiene relativamente amplia región roja, debido a la leghemoglobina, ésta puede ser enmascarada por pigmentos externos de la raíz o pigmentos oscuros del centro del mismo nódulo, esta última condición, parece ser específica, a ciertas asociaciones de Rhizobium-Hospedero, los nódulos expuestos a la luz se tornan verdes, debido a la clorofila, pero el verde localizado en la parte basal del nódulo, puede indicar una modificación de la leghemoglobina, debido a la senescencia o como respuesta a condiciones anormales para la fotosíntesis y la continuación de la fijación de nitrógeno.

La longevidad del nódulo, refleja el hábito de crecimiento del hospedero, los nódulos de las especies herbáceas son relativamente frágiles y funcionan por un período corto del año durante el crecimiento vegetativo activo de la planta, ciertas condiciones desfavorables pueden ocasionar su desintegración o vaciamiento. Las especies perennes pueden producir nódulos frescos estacionalmente o pueden persistir por varios años. La necrosis del nódulo comienza con la autólisis de la zona más antigua de los bacteroides, ocasionada por la desintegración de las células del hospedero. Los Rhizobium -residuales vegetativos pueden multiplicarse en los espacios intercelulares e invadir la lámina media de la pared de las células hospedadoras (Quispel, op. cit.).

## 5.- FACTORES QUE LIMITAN LA SUPERVIVENCIA DE Rhizobium.

### 5.1.- DESECACION Y TEMPERATURA ELEVADA.

La muerte más rápida de los rizobios tiene lugar durante el período seco de la aplicación del inóculo. La proporción se incrementa marcadamente con cualquier incremento en la temperatura a la cual es expuesto el inóculo de la semilla, encontrándose tolerancias de manera regional (Vincent, 1970).

### 5.2.- FACTOR TOXICO DE LA CUBIERTA DE LA SEMILLA.

Se atribuye la muerte más rápida sobre la semilla (en la superficie) a un material tóxico asociado con la cubierta. Este hecho ha sido confirmado por hallazgos posteriores y tales sustancias han sido caracterizadas químicamente. R. trifolii muere más rápidamente sobre las semillas enterradas del trébol que sobre cultivos in vitro y los extractos de semillas de trébol dieron una marcada toxicidad a la superficie del vidrio, La goma arábiga, más no la maltosa, protege a los rizobios contra este efecto (Vargas, 1969).

### 5.3.- CONTACTO CON FERTILIZANTES.

La muerte de los rizobios sobre las semillas que están en contacto con superfosfatos, ha sido bien establecida. La cal mezclada con superfosfatos para neutralizar la extrema acidez o el uso de cal como adherente en la semilla, son métodos por medio de los cuales ésta muerte puede ser evitada. Los componentes de fertilizantes, incluyendo metales como Cu y Zn, pueden tener efectos sobre la tolerancia de los rizobios, cuando se acercan a la semilla inoculada (Vargas, 1969).

#### 5.4.- APLICACION DE PESTICIDAS.

Los efectos tóxicos debidos a estos agentes presentan un serio problema, sobre todo cuando se usan de manera sostenida para protección de las plantas. Muchas de estas sustancias han sido estudiadas por su acción sobre los rizobios, aunque con frecuencia sólo en condiciones artificiales de laboratorio (tales como una zona de inhibición en un medio de agar), las cuales difícilmente pueden relacionarse a las condiciones prácticas que en último lugar son las realmente necesarias para cuantificar la sobrevivencia sobre las se millas inoculadas en contacto con el pesticida, y los datos de nodulación permiten las comparaciones con controles libres de pesticidas. La confusión asociada con el uso de marcas registradas sin la suficiente descripción química es otra causa de dificultad; como es de esperarse, todos los fungicidas tienen un cierto grado de toxicidad hacia los rizobios. Los riesgos son muy grandes con los compuestos orgánicos o inorgánicos que contienen metales tóxicos, tales como Hg o Cu y menores con carbamatos (tales como Thiram, tetra metil thiuram disulfuro); las quinonas, estan intermedias en su toxicidad (Vargas, op. cit.).

Entre los insecticidas presentes en el mercado, hay evidencias indirectas de toxicidad del Hexacloruro de Benceno y del D.D.T. cuando es usado junto con semillas inoculadas. Los hidrocarburos clorados, como la dieldrina, no tienen un efecto adverso sobre la nodulación de Phaseolus lathyroides, o bien pueden disminuirla pero no eliminarla; el Dimethoato (Rogor), es extremadamente tóxico para los rizobios. Hay varios reportes de reducción o completa detención de nodulación aún cuando la semilla fue tratada varios días avanzada la nodulación. La pobre nodulación obtenida con este insecticida (Rogor), reflejó una baja sobrevivencia de rizobios sobre la super-

ficie de la semilla tratada, cuando muy pocos rizobios son encontrados después de un día de almacenamiento y ninguno después de 3 a 8 días. El efecto tóxico del Rogor fué más drástico con la turba como inóculo (Vargas, op. cit.).

#### 6.-FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO.

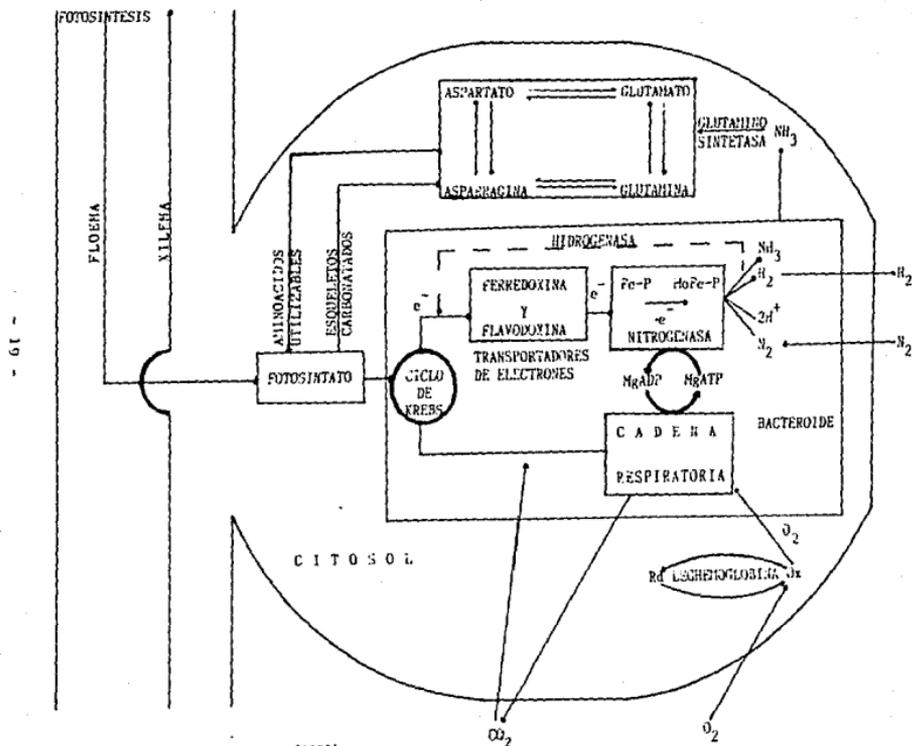
El proceso de fijación biológica de nitrógeno se observa entre los organismos procarióticos; se encuentran desde anaerobios obligados, anaerobios facultativos, aerobios obligados, autótrofos, quimioautótrofos, hasta heterótrofos; bacterias fotosintéticas y algas verde-azules (cianobacterias) (Stumpf y Conn, 1980; ver Apéndice I, Tabla B).

Es bien conocido que dos grupos de microorganismos fijan el nitrógeno atmosférico. Unos en simbiosis con plantas superiores generalmente formando nódulos sobre sus raíces, mientras que otros viven en el suelo independientemente de las plantas. Las potencialidades de las bacterias simbióticas y las de vida libre, no son iguales (Quispel, 1974).

En términos de nitrógeno total fijado, los sistemas simbióticos, particularmente la asociación Rhizobium-Leguminosa, son mucho más importantes para la agricultura que las bacterias de vida libre. Las razones son directas; economía de espacio, tiempo y labor, sin embargo algunos aspectos de la fijación simbiótica del nitrógeno han sido ampliamente estudiadas (Stumpf y Conn, op. cit.).

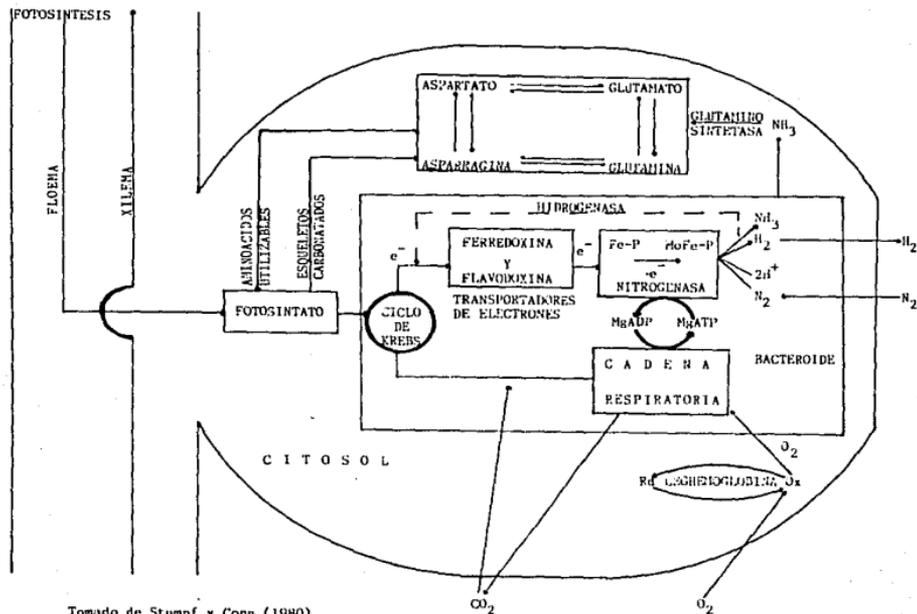
De manera específica se puede referir a la nitrogenasa como la causante de la transformación de nitrógeno atmosférico asimilado durante la respiración, en amoníaco o ión amonio, como producto del metabolismo de las bacterias. La nitrogenasa es una enzima compleja que cataliza la reducción de diversos sustratos (Apéndice I, Tabla A).

FIGURA 3 VIAS METABOLICAS DENTRO DEL NODULO



Tomado de Stumpf y Conn (1980).

FIGURA 3 VIAS METABOLICAS DENTRO DEL NODULO



Tomado de Stumpf y Conn (1980).

La enzima contiene dos proteínas (Hierro-Azufre) fácilmente separables, una de las cuales contiene molibdeno (Stumpf y Conn, op. cit.). Ver Figura 3.

En cuanto a la nomenclatura varía de acuerdo al autor, pero en general se conoce como dinitrogenasa (Ferro-Molibdo-Proteína o Componente I) y Dinitrogenasa Reductasa (Ferro-Proteína o Componente II), esta nomenclatura debida a la diferencia en los tiempos de separación de cada componente, por cromatografía (Azcón, 1983).

De esta forma la enzima requiere un reductor, un sustrato reducible y un sistema generador de ATP, además de un ambiente anaeróbico. Estudios recientes han demostrado que la enzima requiere de  $Mg^{++}$  como un activador. El sistema generador de ATP es necesario debido a que el ADP inhibe la actividad de la nitrogenasa (Yates, 1981).

El mecanismo de la fijación biológica del nitrógeno puede ser el siguiente; la activación de Componente II a partir de su forma reducida se realiza con átomos de hierro, con gasto de ATP y con la ración de iones Magnesio, una vez activada se une al Componente I el cual con un electrón de más ha atrapado un sustrato reducible en el átomo de Molibdeno, de esta manera, al formarse el complejo nitrogenasa, se dan sucesivas transferencias de electrones del Componente II al Componente I, después se separa el Componente II continuando la transferencia de electrones hasta dar como producto el  $NH_3$  que no puede ser retenido en la proteína y se libera. El electrón adicional en cada repetición del proceso es donado al Componente II por un donador de electrones tal como la ferredoxina o la flavodoxina (Postgate, op. cit.).

El incremento en la actividad fijadora de nitrógeno en los bacteroides durante el desarrollo del nódulo, es seguido al mismo tiempo

po por un incremento en el nivel de leghemoglobina y enzimas de asimilación de amonio en el citoplasma que rodea a los bacteroides. - Las enzimas de asimilación de amonio convierten a este en aminocompuestos que son transportados fuera del nódulo a otras partes de la planta, vía xilema. Las enzimas en el citoplasma de las células de la planta, estan también involucradas en el metabolismo del fotosintato, aportado a los nódulos, vía floema. Algunos de los productos de este metabolismo son usados por los bacteroides como un recurso de energía para sostener la fijación de nitrógeno (Nutman, op. cit.).

#### 7.- VIABILIDAD DE LAS CEPAS DE LOS INOCULOS.

Numerosas formas de inóculos han sido aplicados por muchas vías con azúcares, adherentes, leche, cal, fósforo, estiércol y otras sustancias, pero sólo se han obtenido éxitos ocasionales.

Los métodos de inoculación más efectivos sobre un tipo de semillas, no necesariamente son efectivos sobre otras. Las semillas de las leguminosas difieren ampliamente de tamaño, forma, carácter o naturaleza de la testa y otras características (Nutman, op. cit.)

Las especies y las cepas de Rhizobium, pueden también variar en su capacidad para sobrevivir sobre la semilla o en el suelo. En general, los medios a base de turba son superiores a los demás inóculantes. Los medios a base de turba requieren también de esterilización para elevar la probabilidad de sobrevivencia de los Rhizobium. La sacarosa y maltosa en los medios de inoculación, disminuyen la mortalidad de los rizobios sobre las semillas. Las gomas naturales y sintéticas (arábica o de mesquita), aplicadas al medio de inoculación, adhieren el inóculo a la semilla e incrementan la longevidad del mismo.

Una abundancia de rizobios, es particularmente importante cuan

do las semillas son sembradas bajo condiciones adversas, o en suelos donde existen poblaciones de rizobios inefectivos (Nutman, op. cit.).

#### IV.- ANTECEDENTES .

La zona de San Luis Taxhimay y en general las áreas circundantes a la presa del mismo nombre has sido objeto de numerosos estudios relacionados a la fijación de nitrógeno por alumnos de la E.N.E.P. Zaragoza, de los Laboratorios Integrales de Biología IV, V y prestadores de Servicio Social. Se han realizado diferentes revisiones respecto a la simbiosis Rhizobium-Leguminosa; entre los más importantes se pueden mencionar los siguientes estudios:

- "Estudio preliminar de la influencia del P en la simbiosis Phaseolus vulgaris-Rhizobium phaseoli; tanto en cepas inoculadas como nativas del suelo de Taxhimay, Estado de México-Hidalgo, en el invernadero", Baena, et-al; (1983).
- Benitez, V. A. R., (1982). TESIS. "Uso de biofertilizantes, simbiosis entre leguminosa-hongo-bacteria, para incrementar el rendimiento de la alfalfa en una zona cercana a la presa de Taxhimay, Estado de México". U.N.A.M.
- "Contribución al estudio de las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a leguminosas silvestres para la implementación de pagtízal", Durán, et-al; (1986).
- "Evaluación de algunos efectos del plaguicida Malathion en la relación simbiótica Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum bajo condiciones de invernadero", Esquivel, et-al; (1983).
- Estañol, B. E., (1987). TESIS. "Efectos de la inoculación de (Rhizobium phaseoli) y de la endomicorriza Vesículo-Arbuscular (V-A) sobre el parasitismo de los nemátodos (Meloidogyne incognita y Ditylenchus dispaci) en cultivos de frijol y cebolla". U.N.A.M.
- "Influencia de fertilizantes orgánicos e inorgánicos en la nodulación de Phaseolus vulgaris por Rhizobium", Tores, et-al; (1982).

- "Evaluación de la fijación de nitrógeno de tres diferentes cepas de Rhizobium sp. asociadas a leguminosas; Prosopis sp., Crotalaria ovalis y Medicago sativa, bajo condiciones de invernadero", Urrieta, et-al; (1986).

## V.- O B J E T I V O S .

### O B J E T I V O     G E N E R A L .

ESTUDIAR LA SIMBIOSIS ENTRE BACTERIAS DEL GENERO Rhizobium Y ALGUNAS LEGUMINOSAS DE SAN LUIS TAXHIMAY, ESTADOS DE HIDALGO Y MEXICO, BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Enlistar las leguminosas del área de estudio y conocer sus características morfológicas.
- Aislar las cepas de Rhizobium a partir de nódulos radiculares de las distintas leguminosas presentes en la zona de estudio.
- Determinar las características cualitativas de los rizobios.
- Determinar las propiedades físicas y químicas del suelo que son de mayor importancia para el desarrollo de los Rhizobium (pH, % de Materia Orgánica, Textura, Densidad Aparente y Real, % de Espacio Poroso y Nitrógeno Total).
- Analizar la respuesta a la inoculación en invernadero, evaluando la efectividad y la especificidad de los rizobios asociados a las leguminosas.

## VI.- DESCRIPCION DE LA ZONA DE ESTUDIO.

### LOCALIZACION:

El área se encuentra limitada por los paralelos 19°51'39" y - 19°50' de Latitud Norte; 99°22'36" y 99°25'12" de Longitud Oeste - del Meridiano de Greenwich, a una altitud media de 2 500 m.s.n.m. - Geográficamente hablando, se localiza dentro de la región fisiográfica denominada Meseta Central (Rzedowski, op. cit.) Ver Figura 4.

### GEOLOGIA:

Es rara la presencia de rocas ígneas en la zona. Se observan - en abundancia rocas sedimentarias, principalmente areniscas en asociación con conglomerados (CETENAL).

### CLIMA:

Este lugar tiene un clima C(w<sub>1</sub>)(w)bg; es decir, Templado Subhúmedo con lluvias en Verano, cuya temperatura media anual oscila entre 12 y 18°C, siendo la temperatura del mes más frío entre -3 y -18°C y la del mes más caliente de 6.5 a 22°C, con un verano fresco y lluvia invernal menor al 5% (CETENAL).

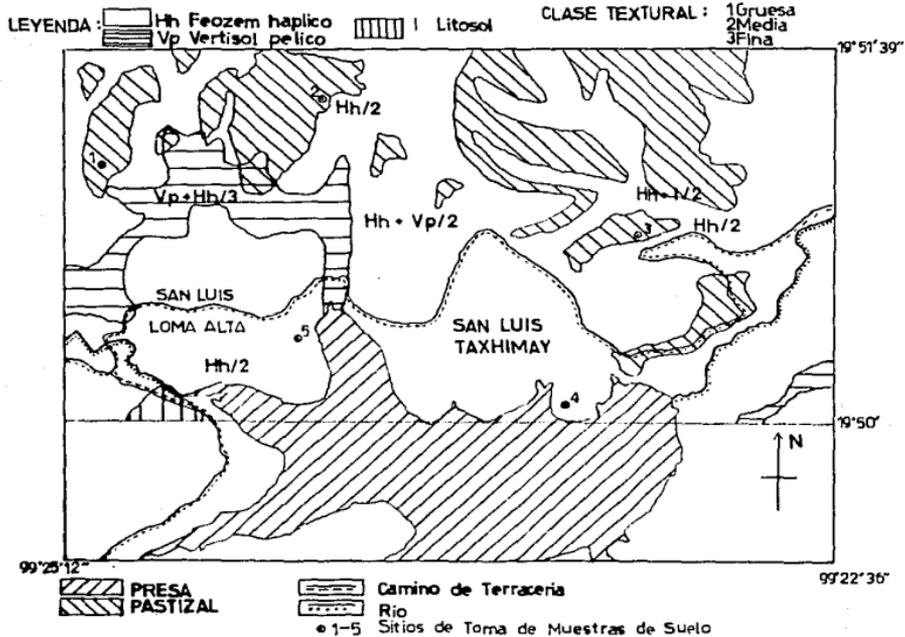
### TIPO DE SUELO:

En la zona de estudio se observa el predominio de Feozem háptico con Vertisol sobre el Litosol (CETENAL). Ver Figura 4.

Según FitzPatrick (1984), las características de éstos tipos - de suelo son las siguientes:

Feozem: Suelos con horizontes A mólicos carentes de un horizonte cálcico o concentraciones de cal suave dentro de los primeros 150 cm. de profundidad. Sin salini-

# FIGURA 4 LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO



dad elevada, carente de propiedades hidromórficas - dentro de los primeros 50 cm.

**Vertisol:** Suelos que tienen 30% o más de arcilla en todos los horizontes a una profundidad no menor de 50 cm. Desarrollan grietas en la superficie. Suelos de color - obscuro con textura uniforme y fina con bajo contenido de materia orgánica.

**Litosol:** Suelos con roca dura a muy poca profundidad (10 a 20 cm.), presentandose principalmente en zonas montañosas.

#### VEGETACION:

Las zonas que no estan cultivadas se encuentran ocupadas por - manchones de bosque natural latifoliado de Encinos, con pastizal inducido o con matorral espinoso (CETENAL).

#### VIAS DE COMUNICACION:

La zona de estudio se encuentra comunicada por la carretera número 57 México-Querétaro, de la cual sale un camino de terracería a un costado de Tepej del Río, Hidalgo, el cual es transitable todo el año y conduce a San Luis Taxhimay con destino a Villa del Carbón, Edo. de México (CETENAL).

## VII.- MATERIALES Y METODOS.

El presente estudio se compone de cuatro etapas; trabajo de campo, laboratorio, invernadero y gabinete. Ver diagrama de flujo.

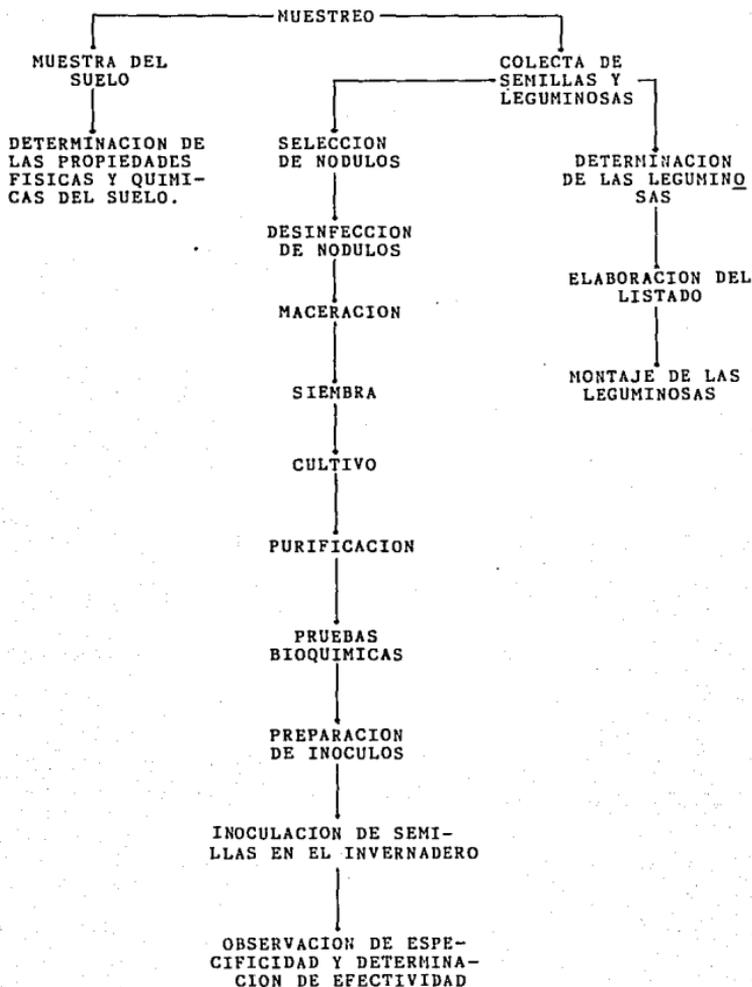
El trabajo se inició con la colecta de leguminosas cultivadas y silvestres durante los meses de julio a septiembre de 1987, en terrenos de cultivo cercanos a la presa, a orillas de los mismos; así como en zonas de pastizal ubicadas en sitios más altos y/o lejanos de la misma, extrayéndolas con todo y raíz, asegurándose donde fuera posible de la presencia de nódulos y con una porción de sustrato; de cada especie encontrada se colectaron tres ejemplares para su cultivo en invernadero, extracción de bacterias y montaje para la colección del herbario, respectivamente. De igual manera se colectaron semillas de éstas leguminosas. Una vez en el laboratorio se determinaron las leguminosas colectadas mediante el empleo de claves, elaborando un listado de ellas y su montaje para herbario. También se determinaron las propiedades físicas y químicas del suelo colectado junto con las leguminosas (de 0 a 40 cm. de profundidad), tales características fueron:

- Densidad aparente por relación peso/volumen (Método de la probeta; García, 1981).
- Densidad real, por exclusión volumétrica del agua; método del picnómetro (García, 1981).
- % de Espacio poroso (García, 1981).

$$\% \text{ E.P.} = 100 \left( 1 - \frac{\text{D.A.}}{\text{D.R.}} \right)$$

- Determinación de la Textura por el método de Bouyoucos (García, 1981).
- Determinación potenciométrica del pH a punto de saturación y en -

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.



relación 1:1 (Jackson, 1982).

- % de Materia Orgánica por el método de Walkley-Black por vía húme da (Jackson, 1982).
- Determinación de Nitrógeno Total, por el método de Kjeldahl (Jack son, 1982).

Simultáneamente, las raíces fueron examinadas, extrayendo y se leccionando los nódulos de apariencia más vigorosa y consistente, - los cuales fueron lavados con agua corriente y sumergidos por 5-10 segundos en etanol al 95% y después en  $HgCl_2$  acidificado al 0.1% de 1 a 3 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua estéril por 5 ocasiones procediendo a macerarlos para obtener un jugo lechoso - blanco que fue sembrado en medio de cultivo sólido, a base de ex- tracto de levadura, manitol, agar y rojo congo (ELMARC). Ver apéñdi ce 2.

La purificación de las bacterias se realizó por medio de re- siembras en cuadrantes por estría, en el mismo medio (Vincent, - 1970).

La determinación de las bacterias se realizó en primer lugar por tinción de Gram, que permitió observar sus características mor- fológicas y posteriormente se llevaron a cabo pruebas bioquímicas a partir de colonias aisladas y purificadas. Estas pruebas fueron:

- 1.- Producción de  $H_2S$ , por desdoblamiento anaeróbico de proteí- nas. Medio SIM.
- 2.- Producción de indol por degradación de triptofano. Medio SIM.
- 3.- Movimiento en medio SIM.
- 4.- Reducción de nitratos a nitritos. Medio Agar Nitratado.
- 5.- Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos comunes. Medio TSI y Agar Glucosado con Rojo de Fenol.
- 6.- Aprovechamiento de citratos como única fuente de carbono. Me-

dio Agar Citratado.

- 7.- Prueba de Rojo de Metilo. Para observar si hay producción de ácido a partir de glucosa. Medio Caldo Glucosado y Rojo de Metilo.
- 8.- Prueba de Voges-Proskauer. Desdoblamiento de glucosa en acetil-metil-carbinol. Medio Caldo Glucosado, KOH y  $\alpha$ -naftol.
- 9.- Licuefacción de la gelatina. Medio Gelatinasa.
- 10.- Prueba de la Catalasa para desdoblar  $H_2O_2$ .

A las cepas bacterianas obtenidas a partir de las diferentes especies de leguminosas se les denotó con las siglas FN (de manera provisional, que son las iniciales de "Fijadoras de Nitrógeno") y un número arábigo progresivo ascendente, de acuerdo al orden de su colecta en campo.

Por su parte, la preparación de inóculos se hizo partiendo de una suspensión bacteriana en un medio nutritivo líquido (aproximadamente 3 ml.; ver Apéndice 2 para su composición), con el cual se impregnó la turba previamente esterilizada (aproximadamente 3 g.) dentro de bolsas de polietileno, que se sellan e incuban aproximadamente 96 horas a una temperatura de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}C$ , homogeneizando diariamente el inóculo. Cada bolsa con inóculo fué destinada para una sola semilla.

Se realizaron pruebas de germinación de semillas de las especies de leguminosas colectadas, previa escarificación con  $H_2SO_4$  al 10% durante 15-30 segundos, esto debido a las características que presentan las semillas en cuanto a dureza, impermeabilidad, etc.

Las semillas una vez escarificadas se colocaron en cajas de Petri con papel filtro húmedo en condiciones de esterilidad, y llevando un registro de la germinación; eligiéndose para la siguiente fase del proyecto (invernadero) únicamente las especies que reunieron

las siguientes características:

- 1) Disponibilidad de semillas.
- 2) Rapidez de germinación, y
- 3) Disponibilidad de cepa bacteriana infectante.

Debido a esto, solo cuatro especies reunieron tales requisitos, y estas fueron; Crotalaria pumila, Dalea citriodora, Phaseolus sp. y Phaseolus vulgaris.

La cantidad de bacterias por inóculo se determinó por la técnica de conteo en placa a base de diluciones (hasta  $10^{-7}$ ) y desarrollo de colonias a partir de una sola célula (Vincent, 1970).

En la fase de invernadero, para la realización de las pruebas de efectividad se diseñó el siguiente modelo experimental:

Para cada una de las cuatro especies de leguminosas se hizo la inoculación con su respectiva cepa bacteriana así como la inoculación cruzada de las mismas; dando combinaciones de 4 X 4 más un lote testigo; cada uno de los tratamientos tuvo tres repeticiones dando un total de 60 macetas (ver Apéndice 2; figura 1 "a"). En cada maceta se sembraron 5 semillas, inoculadas individualmente (ver Apéndice 2; figura 1 "b").

Para esta fase del proyecto se utilizó suelo de las zonas donde se encontró la mayor cantidad y/o diversidad de leguminosas, éste fué esterilizado previamente con formol (dilución 1:3 formol-agua), dejándolo reposar con esta solución durante 72 horas en una envoltura de plástico bien sellada. Después de transcurrir este tiempo se dejó ventilar para permitir la evaporación del formol, procediendo entonces al vaciado del suelo dentro de las macetas de 15 cm. de diámetro por 20 cm. de profundidad.

Para esta fase del proyecto se llevó un registro diario de las temperaturas máximas y mínimas, características de desarrollo y e-

dad de cada individuo en las macetas. El riego de las macetas se realizó con agua previamente esterilizada en autoclave (15 minutos a 15 lb./plg<sup>2</sup>).

La cosecha de las plantas se realizó a diferentes días después de la germinación para cada especie; para Phaseolus vulgaris se llevo a cabo a los 57 días y para Crotalaria pumila a los 78 días, mientras que debido a la baja germinación de las dos especies restantes (Dalea citriodora y Phaseolus sp.) obtenida en las macetas y en las pruebas de germinación previas, no fueron incluidas en esta fase del proyecto, destinada a la evaluación del Nitrógeno Total.

Se procedió a analizar el contenido de Nitrógeno Total por el método de Kjeldahl, tanto en suelo, antes de la siembra y después de la cosecha, así como en tejido vegetal utilizando toda la planta excepto la raíz.

Por último se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando la "t" de Student con las siguientes ecuaciones:

Cuando  $n_1$  y  $n_2$  tienen tamaño de muestras diferentes y ambos son pequeños ( $n \leq 30$ ); Grados de Libertad =  $n_1 + n_2 - 2$

$$t_s = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2) - (u_1 - u_2)}{\sqrt{\frac{(n_1-1) S_1^2 + (n_2-1) S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}}$$

Cuando se compara un solo ejemplar con una muestra:

$$t_s = \frac{Y_1 - Y_2 - (u_1 - u_2)}{S_2 \sqrt{\frac{n_2 + 1}{n_2}}}$$

Ecuaciones tomadas de Sokal (1969) y Spiegel (1970).

### VIII.- R E S U L T A D O S .

Durante la realización del presente trabajo, se encontraron un total de 35 especies de leguminosas silvestres y cultivadas tanto en zonas de pastizal como de cultivo y en las margenes de éstos, de las cuales, 20 se determinaron hasta especie y 15 hasta género. El listado de tales especies se encuentra en la Tabla 1, en la que también se indican las 16 especies de leguminosas de las cuales se obtuvo la cepa bacteriana a partir de los nódulos de sus raíces, así como la disponibilidad de semillas, que en su mayoría es baja o nula (de 0 a 50 semillas), también se señalan los tiempos de germinación de las semillas; es importante señalar que las de testa más gruesa tardaron más en germinar. Por último se muestran los porcentajes de germinación y se observó que en la mayoría de los casos (78%), este hecho no superó el 40%.

En la Tabla 2, se muestran los análisis físicos y químicos de suelo; en cuanto a Textura, el punto 1 muestra la clase textural denominada Migajón-Arenoso, mientras que los restantes 4 puntos muestreados se encuentran dentro de la misma clase textural, a saber, Migajón-Arcillo-Arenoso, pero en general con altos contenidos de arcilla, que van del 16 al 33%; los contenidos de limo están entre 9 y 20% y los de arena están entre 51 y 75%. Por su parte la Densidad Real está relacionada de manera directa con la cantidad de arcilla de las muestras y la Densidad Aparente se relaciona también con la cantidad de arcilla y el % de Materia Orgánica. Estas dos propiedades (D.A. y D.R.) arrojan un % de Espacio Poroso de 49.34 a 54.68%.

En cuanto al pH se observan valores cercanos a la neutralidad (de 6.4 a 7.5), a excepción de los de las muestras 4 y 5 que fueron obtenidas en zonas de cultivo adenañas a la presa Taxhimay y que están entre 5.7 y 5.8 unidades de pH.

El porcentaje de Materia Orgánica más alto es el de la muestra 4 (5.348%), obtenido en zona de cultivo y el porcentaje menor es el de la muestra 3 (1.276%), obtenido en zonas de pastizal.

En la Tabla 3 se dan las características de los cultivos de Rhizobium, macroscopicamente las colonias en medio ELMARC, son de color blanquecino o ligeramente rosado, circulares, convexas y de aspecto liso. Microscopicamente se tienen cultivos puros de bacilos Gram Negativos sin un arreglo específico. En la misma tabla se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas y se observa que en los medios SIM (indol), Agar Citratado, Agar Nitratado, TSI, Prueba del Rojo de Metilo, Prueba de Voges-Proskauer y Gelatinasa la respuesta es negativa, en SIM (movimiento) y Prueba de la Catalasa todas las cepas dieron respuesta positiva; en Rojo de Fenol FN 4 tuvo respuesta positiva, mientras las demás la tuvieron negativa; hubo producción de gas ( $H_2S$ ) en todas las cepas a excepción de FN 10.

En la Tabla 4, se muestran las características más sobresalientes de las leguminosas determinadas, de las cuales, la mayoría pertenece al estrato herbáceo (14 de las 20 especies determinadas) y también se menciona en caso dado el nombre común de dicha planta. En el listado A se muestran características más específicas de las especies colectadas.

La Tabla 5, reúne características de desarrollo y nodulación observadas durante la fase de invernadero. Puede observarse que para la especie Phaseolus vulgaris hubo germinación en todos los lotes y nodulación con su propia cepa (FN 4), e inoculación cruzada con FN 15, no habiendo nodulación en los restantes lotes. En los lotes con nodulación existió un mayor desarrollo vegetativo de las plantas, con respecto a los lotes donde no hubo nodulación.

Para la especie Phaseolus sp., se presentaron problemas de ger

minación en los lotes de FN 4, FN 10 y Testigo, en tanto que no hubo nodulación con FN 15 ni con FN 19.

Para Crotalaria pumila hubo germinación en todos los lotes y - nodulación con FN 15 que es su propia cepa e inoculación cruzada con FN 10 y FN 19, aunque el desarrollo de las plantas de esta especie - fue escaso en general.

Para Dalea citriodora se tuvieron problemas de germinación en los lotes FN 4, FN 10 y FN 19; por su parte los lotes donde hubo germinación, que fueron FN 15 y Testigo, no presentaron nodulación y - las plantas presentaron en general escaso desarrollo vegetativo. Tam - bién se muestran en esta tabla los promedios de las temperaturas re - gistradas en la fase de invernadero, siendo el Promedio Máximo de - 34.9°C y el Promedio Mínimo de 13.2°C. Es de hacerse notar que en ge - neral, la germinación de las semillas en esta parte del trabajo fue de alrededor del 17%.

En la Tabla 6(a), se muestran los resultados de los análisis de Nitrógeno Total en suelo para Phaseolus vulgaris y puede resaltarse que en general las macetas del lote inoculado con la cepa FN 4 tie - nen el valor promedio más alto (0.224%), seguido de las cepas FN 15 (0.179%), FN 19 (0.178%), FN 10 y Testigo. Algunos cuadros estan mar - cados con el signo (-) lo que significa que no hubo germinación en - esas macetas.

En la misma Tabla 6(a), se encuentran los resultados de los aná - lisis de Nitrógeno Total en suelo para Crotalaria pumila, siendo el valor promedio más alto el de las macetas inoculadas con la cepa - FN 15 (0.179%), seguidas por las cepas FN 4 (0.158%), FN 19, FN 10 (0.132%) y Testigo; al igual que en el caso anterior el signo (-) in - dica que no hubo germinación en la respectiva maceta.

En la Tabla 6(b), se encuentran los resultados de los análisis

de Nitrógeno Total en tejidos vegetales, observandose que para Phaseolus vulgaris el contenido promedio más alto esta en el lote inoculado con la cepa FN 15 (3.776%), seguido por FN 19 (3.156%), FN 4 (2.474%), FN 10 y Testigo. En este caso el signo (-) indica la falta del individuo respectivo para la realización de este análisis.

En la misma Tabla 6(b), se muestran los resultados de los análisis de contenido de Nitrógeno Total en tejidos vegetales de Crotalaria pumila y puede notarse que el contenido promedio más alto esta en el lote inoculado con la cepa FN 19 (7.750%), seguido de FN 10 (5.673%), Testigo, FN 4 (4.314%) y por último FN 15. Al igual que en el caso anterior el signo (-) indica la ausencia del individuo para la realización de este análisis.

En la Tabla 7, se muestra el análisis estadístico de las comparaciones entre los resultados de los diferentes lotes de los análisis de Nitrógeno Total; para Phaseolus vulgaris, éste indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ni en suelo ni en tejidos vegetales.

Para Crotalaria pumila hay diferencias estadísticamente significativas al comparar el contenido de Nitrógeno Total en suelo entre FN 4 y FN 10 y otra diferencia estadísticamente significativa al comparar esta misma propiedad en tejidos vegetales entre los lotes FN 4 y FN 19.

Por último en lo referente al conteo de bacterias en los inóculos se tuvo que a la dilución de  $10^{-7}$ , el número de colonias por caja superó el límite superior aceptado que es de 300 (Vincent, 1970).

T A B L A 1.

LISTADO DE LEGUMINOSAS COLECTADAS, CEPAS BACTERIANAS, SEMILLAS DISPONIBLES, TIEMPO Y PORCENTAJE DE GERMINACION DE LAS MISMAS.

ESPECIE	CEPA	CANTIDAD DE SEMILLAS	TIEMPO DE GERMINACION (SEMANAS)	% DE GERMINACION
1.- <i>Vicia faba</i> L.	FN 1	BAJA	2	80%
2.- <i>Desmodium grahamii</i> Gray.	FN 2	BAJA	2	90%
3.- <i>Medicago polymorpha vulgaris</i> (Benth) Shinnars.	FN 3	ABUNDANTE	*	0%
4.- <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	FN 4	ABUNDANTE	1	40%
5.- <i>Dalea reclinata</i> (Cav.) Willd.	FN 5	NULA	-	-
6.- <i>Medicago lupulina</i> L.	FN 6	REGULAR	*	0%
7.- <i>Phaseolus</i> sp.	FN 8	REGULAR	*	0%
8.- <i>Phaseolus</i> sp.	FN 9	NULA	-	-
9.- <i>Phaseolus</i> sp.	FN 10	REGULAR	1	20%
10.- <i>Phaseolus</i> sp.	FN 11	NULA	-	-
11.- <i>Trifolium</i> sp.	FN 12	REGULAR	3	10%
12.- <i>Phaseolus</i> sp.	FN 13	NULA	-	-
13.- <i>Crotalaria pumila</i> Ort.	FN 15	REGULAR	1	30%
14.- <i>Dalea</i> sp.	FN 17	BAJA	3	10%
15.- <i>Acacia</i> sp.	FN 18	NULA	-	-
16.- <i>Dalea citriodora</i> Willd.	FN 19	REGULAR	1	20%
17.- <i>Desmodium neomexicanum</i> Gray.	-	REGULAR	2	20%
18.- <i>Lupinus bilineatus</i> Benth.	-	ABUNDANTE	*	0%
19.- <i>Phaseolus heterophyllus</i> Willd.	-	NULA	-	-
20.- <i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.) DC.	-	NULA	-	-
21.- <i>Acacia</i> sp.	-	BAJA	*	0%
22.- <i>Brongnartia intermedia</i> Moric.	-	NULA	-	-
23.- <i>Astragalus</i> sp.	-	NULA	-	-
24.- <i>Heliotrop indicus</i> (L.) All.	-	ABUNDANTE	1	25%
25.- <i>Zornia thymifolia</i> H.B.K.	-	ABUNDANTE	2	10%
26.- <i>Dalea</i> sp.	-	NULA	-	-
27.- <i>Acacia</i> sp.	-	BAJA	1	5%
28.- <i>Crotalaria rotundifolia</i> (Walt.) Gmelin.	-	BAJA	*	0%
29.- <i>Indigofera hartwegii</i> Rydb.	-	REGULAR	1	95%
30.- <i>Dalea zimmermanii</i> Schauer.	-	BAJA	*	0%
31.- <i>Calliandra grandiflora</i> (L'Hér.) Benth	-	NULA	-	-
32.- <i>Dalea</i> sp.	-	NULA	-	-
33.- <i>Dalea</i> sp.	-	NULA	-	-
34.- <i>Dalea</i> sp.	-	NULA	-	-
35.- <i>Mimosa acanthocarpa</i> Benth.	-	REGULAR	-	-

\* - SEMILLAS QUE NO GERMINARON DENTRO DE UN LAPSO DE 4 SEMANAS.

CANTIDAD DE SEMILLAS:

0 SEMILLAS -- NULA

50 a 100 SEMILLAS -- REGULAR

1 a 50 SEMILLAS -- BAJA

MAS DE 100 SEMILLAS -- ABUNDANTE

T A B L A 2 .

## RESULTADOS DE LOS ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS DE SUELO.

MUESTRA DE SUELO	TEXTURA	DENSIDAD APARENTE (g/cc)	DENSIDAD REAL (g/cc)	ESPACIO POROSO (%)	pH PUNTO DE SATURACION	pH RELACION 1:1	MATERIA ORGANICA (%)	% DE NITROGENO TOTAL EN MUESTRA COMPUESTA.
* 1	MIGAJON-ARENOSO.	1.26	2.78	54.68	7.4	7.5	2.001	
* 2	MIGAJON-ARCILLO-ARENOSO.	1.16	2.50	53.60	7.2	7.1	2.242	
* 3	MIGAJON-ARCILLO-ARENOSO.	1.02	2.17	53.00	6.3	6.4	1.276	0.111
& 4	MIGAJON-ARCILLO-ARENOSO.	1.08	2.38	54.62	5.8	5.8	5.347	
& 5	MIGAJON-ARCILLO-ARENOSO.	1.15	2.27	49.34	5.7	5.8	2.139	

\* SUELO COLECTADO EN AREAS DE PASTIZAL.

&amp; SUELO COLECTADO EN AREAS DE CULTIVO.

T A B L A      3 .

RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS SIEMBRAS DE BACTERIAS EN DIFERENTES PRUEBAS BIOQUIMICAS Y CULTIVO A 28°C DURANTE 48 HORAS.

+ = REACCION POSITIVA

- = REACCION NEGATIVA.

CEPA MEDIO	FN 4	FN 10	FN 15	FN 19
SIM (H <sub>2</sub> S)	+	-	+	+
SIM (MOVIMIENTO)	+	+	+	+
SIM (INDOL)	-	-	-	-
AGAR NITRATADO	-	-	-	-
TSI     (Gas) (Acido)	-	-	-	-
ROJO DE FENOL   (acido)	+	-	-	-
AGAR CITRATADO	-	-	-	-
PRUEBA DE ROJO DE METILO.	-	-	-	-
PRUEBA DE VOCES- PROSKAUER.	-	-	-	-
GELATINASA	-	-	-	-
PRUEBA DE LA CATALASA.	+	+	+	+

CARACTERISITCAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DE Rhizobium.

MACROSCOPICAS: COLONIAS BLANCAS O LIGERAMENTE ROSADAS EN MEDIO ELMARC, CIRCULARES, CONVEXAS Y DE ASPECTO LISO.

MICROSCOPICAS: CULTIVOS PUROS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS SIN UN ARRECLO DEFINIDO.

L I S T A D O    A .

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS ESPECIES DE LEGUMINOSAS COLECTADAS.

El número que antecede a cada especie es el que le corresponde en la Tabla 1.

27.- Acacia sp. Hierba de 15 a 20 cm. de altura; de raíz engrosada de color café y anillos de color amarillo. Ramas sin espinas; hojas alternas, pinnadas; folíolos de 12 a 16, de de 4 a 5 mm. de largo, de borde ligeramente piloso. Frutos amarillos de 3.5 a 4 cm. de largo, por 5 a 7 mm. de ancho, cada uno con 3 a 5 semillas; éstas son de color café claro con manchas café oscuro.

21.- Acacia sp. Hierba de aproximadamente 40 cm. de altura; raíz tubular costrosa de color café. Ramificada desde la base; bipinnado - con 24 a 30 folíolulos por folíolo; los folíolulos tienen 3 a 5 mm. de largo, por 1 a 2 mm. de ancho; frutos de 1 a 2 cm. de largo, por 5 a 8 mm. de ancho, con el ápice ligeramente curvado hacia adentro y mucronado, con 2 a 5 semillas; semillas lisas de color beige.

15.- Acacia sp. Hierba de 40 a 60 cm. de altura. Ramificada desde - la base y parcialmente tendida. Hojas bipinnadas, con 24 a 32 folíolos, cada uno con 46 a 52 folíolulos; cada folíolulo mide de 1 a 2 mm. de largo, por aproximadamente 1 mm. de ancho. Hojas de 5 a 7 - cm. de largo. Ramas sin espinas, pilosas al igual que las hojas. - Los folíolulos tienen el borde piloso. Flores pequeñas en cabezuelas, de color amarillo y los botones son globosos. Base de los estambres con ligera tonalidad rosa.

23.- Astragalus sp. Hierba erguida o tendida de 30 a 40 cm.; con - las ramas y hojas tomentosas; folíolos lanceolados; cada hoja con - 5 a 8 folíolos de 5 a 10 mm. de largo, por 3 a 5 mm. de ancho. Eje de la inflorescencia entre 5 y 7 cm.; espiga de 1 a 2 cm.; flores -

con bráctea, de color amarillento, de aproximadamente de 5 a 7 mm. de largo.

22.-Brongniartia intermedia Moric. Planta arbustiva, de tallo pubescente y hojas cortamente pecioladas de 1 a 2 cm. de largo con 11 a 37 foliolos, opuestos. Flores axilares, solitarias o en pares, de corola roja o morada, legumbre anchamente oblonga de semillas globosas, pardo-rojizas, lisas (Sanchez, 1979).

31.- Calliandra grandiflora (L'Hér) Benth. Arbusto con hojas de 15 mm. o más de largo y raquis algo angulado, pubescente, pinnas de 8 a 20 pares de foliolos linear oblongos, glabros o algo pubescentes en el envés. Capítulos con pedúnculos, formando racimos terminales densos. Semillas ovovadas de color amarillento (Rzedowski, 1979).

13.- Crotalaria pumila Ort. Hierba anual, de hojas trifoliadas; foliolos ovados, de 5 mm. a 1.3 cm. de longitud. Flores pequeñas de color amarillo-rojizo agrupadas en racimos axilares. Legumbre sésil o subsésil de 1 a 3 cm., inflada (Sanchez, 1979).

28.- Crotalaria rotundifolia (Walt) Gmelin. Planta herbácea perenne de 16 a 20 cm. de largo, muy ramificada desde la base; hojas simples subsésiles, orbiculares, ovadas, oblongas, lanceoladas o elípticas de 1 a 4 cm. de largo, por 5 a 20 mm. de ancho. Inflorescencias opuestas a las hojas, racimos con 3 a 6 flores, corola amarilla; legumbre inflada de 15 a 25 mm. de largo por 5 a 10 mm. de diámetro (Rzedowski, 1979).

16.- Dalea citriodora Willd. Hierba de unos 30 a 50 cm. de altura, con la superficie glabra, hojas imparipinnadas, los foliolos pequeños, ovales o elípticos, con intenso olor a limón. Inflorescencias cortas, pedunculadas, la región floral con forma elíptica; con flores blanco-purpúreas (Sanchez, 1979).

30.- Dalea reclinata (Cav.) Willd. Planta herbácea, anual, de apro-

ximadamente 30 cm. de altura, con tallo cilíndrico, a menudo con tintes de color morado, piloso. Hojas imparipinnadas, folíolos angostamente elípticos. Flores en espiga, sésiles, con el tubo del cáliz acampanulado, corola azul-violeta. Semillas lisas, brillantes - de color verde amarillento o pardo amarillento (Rzedowski, 1979).

14.- Dalea sp. Hierba parcialmente erguida de unos 40 cm. de longitud. Ramificada desde la base. Hojas imparipinnadas con 5 a 7 folíolos de 6 a 8 mm. de largo, por 3 a 5 mm. de ancho. Raíz de color amarillo intenso y textura coriácea. Flores en racimos con corola de color violáceo. Folíolos glandulosos en el envés.

26.- Dalea sp. Hierba de 40 a 50 cm. de altura; tallos verdes o verde-amarillentos. Hojas imparipinnadas con 11 a 15 folíolos, glandulosos, de 2 a 5 mm. de largo, por 1 a 2 mm. de ancho, ápice hendido. Inflorescencias densas de 2 a 3 cm.; cáliz densamente piloso - con glándulas verdes y amarillas; corola púrpura.

33.- Dalea sp. Hierba de raíces muy extendidas de color café. Muy ramificada desde la base, ramas de 20 a 30 cm. erguidas o semierguidas con el primer tercio de las mismas desprovisto de hojas. Hojas imparipinnadas con 9 a 15 folíolos que tienen de 4 a 6 mm. de largo, por 2 a 4 mm. de ancho, que tienen glándulas sólo en el envés y éstas son de color oscuro. Los folíolos son de borde entero y nervadura central prominente, con el ápice bilobulado que posee invariablemente una glándula. Ramas, hojas y folíolos pubescentes.

34.- Dalea sp. Hierba perenne de unos 20 a 30 cm. de longitud; ramificada desde la base, ramas semierguidas; raíz amarilla gruesa y con numerosas vellosidades. Hojas con 12 a 23 folíolos de 1 a 3 mm. de largo, por 1 a 2 mm. de ancho, borde entero, no mucronadas, ápice ligeramente bilobulado, glándulas sólo en el envés. Hojas y ramas glabras. Brácteas envolventes y glangulosas. Caliz glanduloso;

flores purpúreas.

32.- Dalea sp. Planta herbácea de 10 a 20 cm. de altura. Tallos glabros ramificados; hojas con 3 a 9 foliolos oblongos, de 4 a 10 mm. de largo, por 2 a 3 mm. de ancho. Flores en espigas densas de 2 a 3 cm. de largo, por 8 mm. de diámetro, en pedúnculos terminales de 1 a 3 cm. de largo. Corola azul.

30.- Dalea zimpanica Schauer. Arbusto de 1 a 3 m. de altura, con las ramas lisas y delgadas, hojas pinnadas, brevemente pecioladas; de 11 a 19 pequeños foliolos, elípticos, de 2 a 6 mm. de largo, lisos en ambas caras, con puntos glandulosos en el envés. Inflorescencias cortas, subglobosas u oblongas, de 1.5 a 3 cm. de largo, seríceo-vellosas, flores con el cáliz ciliado, veloso, con glándulas amarillentas y corolas también amarillentas o moreno-rojizas (Sanchez, 1979).

2.- Desmodium grahami Gray. Planta rastrera o más o menos erecta. Trifoliada, foliolo terminal ovado, de 2 a 4 cm. de largo, por 1.2 a 2.4 cm. de ancho; foliolos laterales más o menos obtusos, oblicuos, mucronados, por lo general truncos en la base, de 1.3 a 2.7 cm. de largo, por 0.7 a 1.5 cm. de ancho. Nervadura central y nervios principales prominentes en el envés, ambas superficies pilosas. Inflorescencias terminales o axilares, bracteadas. Semilla reniforme café-rojiza (Rzedowski, 1979).

17.- Desmodium neomexicanum Gray. Planta herbácea con tallos cortos o largos, que pronto se vuelven procumbentes. Foliolos angostamente a estrechamente ovado-anguloso o elípticos. Inflorescencias en racimos cortos o largos, semillas pardas, elíptico o rómbico-reniformes (Sanchez, 1979).

20.- Desmodium uncinatum (Jacq.) DC. Planta herbácea, trepadora o erecta; estípulas ovadas, largamente ciliadas. Foliolos más bien

delgados, el terminal más o menos ovado, obtuso en el ápice y mucronulado, foliolos laterales similares, algo oblicuos en la base, de 3 a 5 cm. de largo, de 1.5 a 2.8 cm. de ancho. Inflorescencias laxas y alargadas (Rzedowski, 1979).

29.- Indigofera hartwegii Rydb. Planta herbácea perenne de raíz gruesa y tallo leñoso en la base; ramas algo angulado-estriadas, tendidas. Pecíolo y raquis estrigosos, foliolos con ápice obtuso o redondeado. Flores dispuestas en racimos cortos y densos, de corola roja, legumbre recta, estrigosa (Rzedowski, 1979).

18.- Lupinus bilineatus Benth. Planta mayormente anual o bienal, en ocasiones perenne de vida corta, tallos huecos. Las flores subverticiladas o dispuestas en espiral, de corola glabra, de color lila. Legumbre con pubescencia pilosa (Sanchez, 1979).

6.- Medicago lupulina L. Planta anual, decumbente; tallos finamente pilosos; hojas cortamente pecioladas; foliolos ovovados, ovales o suborbiculares. Flores dispuestas en racimos ovoides muy cortos de corola amarilla, legumbre ligeramente encurvada, de color amarillo-verdoso o pardo-amarillento y de superficie lisa (Sanchez, 1979).

3.- Medicago polymorpha vulgaris (Benth) Shinnars. Planta anual, tendida, de tallo muy ramificado desde la base. Hojas pecioladas, foliolos ovovados u obcordados. Flores dispuestas en racimos axilares solitarios, más cortos que las hojas; corola amarilla. Legumbre enroscada en espiral, reticulada, con 2 a 6.5 espiras, armadas de numerosas espinas; semillas varias, reniformes. Esta variedad tiene el fruto discoidal, de 3 a 4 espiras de hasta 4 mm. de longitud, ganchudas y divergentes (Rzedowski, 1979).

24.- Melilotus indicus (L.) All. Planta anual de 30 a 50 cm. de altura de tallo erecto, ramificado; foliolos oblanceolados a veces casi lineares. Flores dispuestas en racimos de color amarillento. Le-

gumbre subglobosa (Sanchez, 1979).

32.- Mimosa acanthocarpa Benth. Arbusto de 1 a 2 m. de altura, armado de fuertes espinas recurvadas, que miden de 4 a 5 mm. Hojas bipinnadas, de contorno general oblongo-ovado, de 3 cm. de largo, por 1.5 cm. de ancho. Divisiones primarias oblongas, de 1 cm. de largo, formado de unos 20 foliolulos, de 3 a 4 mm. de largo. Inflorescencias axilares, de 10 a 12 mm. de diámetro, de color blanco-rosado. Frutos espinosos en el margen, comprimidos, de color moreno-violáceo, de 3 cm. de largo, por 4 a 6 mm. de ancho, angostos hacia la base y el ápice (Sanchez, 1979).

19.- Phaseolus heterophyllus Willd. Planta herbácea perenne, de tallo delgado, corto, postrado. Foliolos de forma variable; flores muy cortamente pediceladas, casi sésiles, corola de color púrpura o color salmón. Legumbre pedúncula, de semillas oblongas, amarillo-verdosas con tintes negros (Sanchez, 1979).

7.- Phaseolus sp. Planta herbácea, muy ramificada desde la base, foliolos ovados de 1.3 a 2 cm. de ancho, por 1.5 a 2 cm. de largo. Toda la planta es pilosa, flores de color violáceo. En estos individuos la raíz se engrosa y forma un camote de 3 cm. de largo, por 1.5 a 2.5 cm. de diámetro.

8.- Phaseolus sp. Hierba tendida, pilosa. Foliolos ovados de 2 a 3 cm. de ancho por 3 a 4 cm. de largo. Flores violáceas. Se encuentra muy ramificado desde la base. Sus raíces no se engrosan y no forman camote o tubérculo.

9.- Phaseolus sp. Hierba tendida de 30 o 40 cm. de longitud. La raíz se engrosa hasta 1.5 o 2 cm. de diámetro, por 8 a 15 cm. de largo y es de textura coriácea. Ramificada desde la base. Hojas trifoliadas, foliolos ovados de 2.5 a 3 cm. de largo, por 1.3 a 1.7 cm. de ancho. Densamente pilosa. Frutos rectos de 2 a 3 cm., café muy

pilosos, con 3 a 5 semillas pequeñas de color café. Inflorescencias con brácteas, en racimos, corola púrpura.

10.- Phaseolus sp. Hierba tendida, pilosa. Foliolos digitados, lanceolados u obovados de 2 a 3 cm. de largo, por 1 a 1.5 cm. de ancho. Ramificada desde la base, raíz engrosada de 2 a 3 cm. de largo, por 1.5 a 2 cm. de diámetro.

12.- Phaseolus sp. Hierba tendida de unos 40 cm. de largo. La raíz no se engrosa. Densamente pilosa en tallos y hojas. Foliolos ovados de 2 a 2.5 cm. de ancho, por 2 a 3 cm. de largo. Prefloración imbricada. Racimos axilares o terminales. Corola púrpura.

4.- Phaseolus vulgaris L. Planta herbácea de unos 60 cm. o más de altura o longitud. Trepadora o rastrera. Hojas trifoliadas, pilosas. Racimos axilares, flores de varios colores, dependiendo de la variedad de que se trate. Se le conoce comunmente como "frijol".

11.- Trifolium sp. Hierba de 20 a 30 cm. de largo, parcialmente tendida. Raíz cilíndrica tubular. Tallos pilosos. Hojas trifoliadas con peciolo de hasta 5 cm.; foliolo elípticos de 15 a 18 mm. de largo, por 4 a 5 mm. de ancho, ápice finamente mucronado, borde ligeramente aserrado, nervadura central pilosa. Flores en racimos de 1 a 1,5 cm. de diámetro, con 15 a 20 flores. Eje floral de 2 a 5 cm.; corola blanca del mismo tamaño que el cáliz. Flores con brácteas pequeñas. Vaina mucronada de 4 a 6 mm. de largo por 2 a 3 mm. de ancho, con 2 semillas por lo general, de color café-pardo. Se conserva el cáliz y la corola aún en la madurez del fruto.

1.- Vicia faba L. Planta herbácea erguida de unos 40 cm. de altura. Trifoliada. Con inflorescencias en racimos axilares. Su superficie es lisa. Flores de color violáceo. Se le conoce como "haba".

25.- Zornia thymifolia H.B.K. Planta perenne, de tallo tendido muy ramificado, delgado. Hojas con el peciolo delgado, piloso, foliolo

ovado-lanceolados. Flores dispuestas en espigas largas, muy cercanas entre sí, dando a la espiga un aspecto denso y compacto. Flores sésiles de corola amarillenta pálida. Semillas de color amarillento rojizo al principio y oscuras después (Rzedowski, 1979).

## T A B L A 4 .

CARACTERISTICAS DE LAS LEGUMINOSAS DETERMINADAS  
HASTA ESPECIE.

LEGUMINOSA	ESTRATO	FLOR O INFLORESCENCIA	NOBRE VULGAR
<u>Bronnartia intermedia</u> Moric.	Arbustivo	Axilar solitaria	No se le conoce
<u>Calliandra grandiflora</u> (L'Hér.) Benth.	Arbóreo	Racimo terminal	"Cola de caballo"
<u>Crotalaria pumila</u> Ort.	Herbáceo	Elíptica corta	"Cascabel"
<u>Crotalaria rotundifolia</u> (Walt.) Gmelin.	Herbáceo	Racimo axilar	"Cascabel"
<u>Dalea citriodora</u> Willd.	Herbáceo	Espiga terminal	"Terciopelillo"
<u>Dalea reclinata</u> (Cav.) Willd.	Herbáceo	Espiga terminal	No se le conoce
<u>Dalea zimmermanii</u> (Schauer).	Arbustivo	Espiga terminal	No se le conoce
<u>Desmodium grahamii</u> Cray	Arbustivo	Espiga terminal	No se le conoce
<u>Desmodium neomexicanum</u> Gray.	Herbáceo	Racimo terminal	No se le conoce
<u>Desmodium uncinatum</u> (Jacq.) DC.	Herbáceo	Racimo terminal	No se le conoce
<u>Indigofera hartwegii</u> Kydb.	Ruetera	Racimo corto	No se le conoce
<u>Lupinus bilineatus</u> Benth.	Herbáceo	Espiga terminal	No se le conoce
<u>Medicago polymorpha vulgaris</u> (Benth.) Shinners.	Herbáceo	Racimo terminal	"Carretilla"
<u>Medicago lupulina</u> L.	Herbáceo	Racimos ovoides	No se le conoce
<u>Nelilotus indicus</u> (L.) All.	Herbáceo	Racimo terminal	"Trébol de olor"
<u>Mimosa acanthocarpa</u> Benth.	Arbustivo	Racimo axilar	"Uña de gato"
<u>Phaseolus heterophyllus</u> Willd.	Herbáceo postrado	Axilar solitaria	No se le conoce
<u>Phaseolus vulgaris</u> L.	Herbáceo	Racimo axilar	"Frijol"
<u>Vicia faba</u> L.	Herbáceo	Racimo Axilar	"Haba"
<u>Zornia thymifolia</u> H.B.K.	Herbáceo tendida	Sésil solitaria	No se le conoce

T A B L A 5 .

CARACTERISTICAS DE DESARROLLO Y NODULACION DE LAS LEGUMINOSAS ESTU-  
DIADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

PLANTA CEPA	<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u>	<u>Phaseolus</u> <u>sp.</u>	<u>Crotalaria</u> <u>pumila</u>	<u>Dalea</u> <u>citriodora</u>
FN 4	3 Individuos en - desarrollo vegeta- tivo. 1 Individuo con - fruto inmaduro. Nodulación con su cepa.	NO HUBO GERMINACION.	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.	NO HUBO GERMINACION.
FN 10	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.	NO HUBO GERMINACION.	Desarrollo vegetativo. Inoculación cruzada.	NO HUBO GERMINACION.
FN 15	3 Individuos en - desarrollo vegeta- tivo. 3 Individuos con fruto inmaduro. Inoculación cru- zada.	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.	1 Individuo con fruto y el resto en desarrollo ve- getativo. Nodulación con su propia cepa.	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.
FN 19	Todos los indivi- duos con fruto, - en un caso maduro. No hubo nodula- ción.	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.	Inoculación cruzada. Desarrollo vegetativo.	NO HUBO GERMINACION.
TESTIGO	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.	NO HUBO GERMINACION.	Formación de fruto. No hubo no- dulación.	Desarrollo vegetativo. No hubo no- dulación.

En todos los casos la nodulación fue escasa (1 a 5 nódulos por indivi-  
duo).

Crotalaria pumila: Talla a 78 días de germinación; 15 a 17 cm. y con  
una sola rama.

Dalea citriodora: En general con escaso desarrollo vegetativo.

Temperaturas registradas durante la fase de invernadero:

Temperatura Máxima Promedio: 34.9°C.

Temperatura Mínima Promedio: 13.2°C.

T A B L A 6(a) .

ANALISIS DE NITROGENO TOTAL DEL SUELO DE LAS MACETAS DESPUES DE LA ,  
COSECHA DE LEGUMINOSAS.  
(cantidades en %).

El signo (-) indica que los datos requeridos para dicha casilla no existen, debido principalmente a problemas de germinación.

Phaseolus vulgaris.

MACETA CEPA	1	2	3	$\bar{x}$
FN 4	0.182	0.254	0.234	0.223
FN 10	0.163	-	-	-
FN 15	0.195	-	0.163	0.179
FN 19	0.176	0.189	0.169	0.178
TESTIGO	0.130	-	-	-

Crotalaria pumila.

MACETA CEPA	1	2	3	$\bar{x}$
FN 4	0.150	0.176	0.150	0.158
FN 10	0.130	0.137	0.130	0.132
FN 15	0.195	0.163	-	0.179
FN 19	0.139	-	-	-
TESTIGO	0.130	-	-	-

T A B L A 6(b).  
ANALISIS DE NITROGENO EN TEJIDOS VEGETALES.  
(cantidades en %).

Phaseolus vulgaris.

INDIVI- DUO CEPA	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$
FN 4	1.692	3.515	2.474	1.302	3.385	-	2.474
FN 10	1.953	-	-	-	-	-	-
FN 15	3.515	2.083	5.078	1.822	3.125	7.031	3.776
FN 19	3.906	2.734	2.828	-	-	-	3.156
TESTIGO	1.172	-	-	-	-	-	-

Crotalaria pumila.

INDIVI- DUO CEPA	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$
FN 4	4.613	3.730	4.490	4.633	3.326	5.293	4.300
FN 10	7.315	4.903	4.800	-	-	-	5.673
FN 15	4.340	4.130	-	-	-	-	4.235
FN 19	9.640	5.859	-	-	-	-	7.750
TESTIGO	5.208	-	-	-	-	-	-

T A B L A 7 .

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LA DETERMINACION DE NITROGENO  
TOTAL EN SUELO DE LAS MACETAS CON Phaseolus vulgaris.

$H_0$  = Las dos muestras provienen de la misma población.

$H_a$  = Las dos muestras provienen de diferentes poblaciones.

Nivel de confianza = 0.95

En el cuadro se muestra la hipótesis aceptada.

CEPA	FN 10	FN 15	FN 19	TESTIGO
FN 4	$H_0$	$H_0$	$H_0$	$H_0$
	FN 10	$H_0$	$H_0$	$H_0$
		FN 15	$H_0$	$H_0$
			FN 19	$H_0$

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LA DETERMINACION DE NITROGENO

TOTAL EN TEJIDO VEGETAL DE Phaseolus vulgaris.

Nivel de confianza = 0.95

CEPA	FN 10	FN 15	FN 19	TESTIGO
FN 4	$H_0$	$H_0$	$H_0$	$H_0$
	FN 10	$H_0$	$H_0$	$H_0$
		FN 15	$H_0$	$H_0$
			FN 19	$H_0$

Tabla 7 continuación:

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LA DETERMINACION DE NITROGENO  
TOTAL EN SUELO DE LAS MACETAS CON Crotalaria pumila.

Nivel de confianza = 0.95

CEPA	FN 10	FN 15	FN 19	TESTIGO
FN 4	$H_a$	$H_0$	$H_0$	$H_0$
	FN 10	$H_0$	$H_0$	$H_0$
		FN 15	$H_0$	$H_0$
			FN 19	$H_0$

RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE LA DETERMINACION DE NITROGENO  
TOTAL EN TEJIDOS VEGETALES DE Crotalaria pumila.

Nivel de confianza = 0.95

CEPA	FN 10	FN 15	FN 19	TESTIGO
FN 4	$H_0$	$H_0$	$H_0$	$H_0$
	FN 10	$H_0$	$H_0$	$H_0$
		FN 15	$H_0$	$H_0$
			FN 19	$H_0$

## IX.- D I S C U S I O N .

En la Tabla 1 se listan todas las especies encontradas (35), - tanto las que se determinaron hasta especie (20), así como las que se determinaron hasta género (15), esto último se debió principalmente a la falta de claves más precisas a nivel de especie.

Se menciona asimismo la cantidad de semillas en cuatro categorías arbitrarias que son las siguientes:

0 semillas -- Nula.

1 a 50 semillas -- Baja.

51 a 100 semillas -- Regular.

Más de 100 semillas -- Abundante.

De esta manera y debido al diseño experimental empleado se tiene que las especies de leguminosas con las que podía realizarse la determinación de la efectividad de las cepas, se restringieron sólo a las especies que se ubicaron en las últimas dos categorías (Regular y Abundante) y que además cumplieron con otras características, hecho que se discute más adelante.

En la misma Tabla 1, se nota que en general las leguminosas encontradas tenían una baja cantidad de semillas, debido a que el período de colecta fué reducido.

También se muestra el tiempo que tardaron las semillas de cada especie en germinar, habiéndose observado que las semillas que más tardaron en hacerlo fueron las de testa más gruesa, debido a las características que poseen las mismas, aunque posiblemente su período de germinación es muy largo y bajo condiciones de temperatura y humedad específicas, tales como las que se encuentran en campo y tal vez a que el tratamiento de escarificación utilizado debió de ser más severo.

Por su parte, las semillas de rápida germinación fueron aque-

llas correspondientes a plantas herbáceas, tanto anuales (por ejemplo Crotalaria pumila), como perennes (por ejemplo Phaseolus sp.); tal vez debido a que al recibir condiciones de humedad y previa escarificación, éstas germinan como una respuesta fisiológica para completar su desarrollo vegetativo, antes de llegar a la época de sequía (Bidwell, 1979).

Por último se anotan en esta misma tabla los porcentajes de germinación de las semillas de cada especie, que en su mayoría (78%), no superan el 40% en este renglón. Por comodidad las causas para esta baja germinación se discuten más adelante.

Con base en el análisis conjunto de 4 parámetros (leguminosa, cepa, cantidad de semilla y tiempo de germinación) se tiene que sólo 4 especies lograron reunir los requisitos de:

- 1) Disponibilidad de semilla.
- 2) Rapidez de germinación, y
- 3) Disponibilidad de cepa.

Estas fueron, Crotalaria pumila, Dalea citriodora, Phaseolus sp. y Phaseolus vulgaris.

En la Tabla 2, se muestran los resultados de los análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo, encontrando que para la muestra 1 la clase textural es Migajon-Arenoso, mientras que la textura es la misma para los restantes 4 puntos de muestreo, ubicada dentro de la clase textural Migajon-Arcillo-Arenoso; los porcentajes de arcilla van del 16 al 33%; los de limo están entre 9 y 20% y los de arena están entre 51 y 75%.

Se puede observar a partir de esto que las muestras de suelo tienen cantidades altas de arcilla (16 a 33%); cuyas propiedades más importantes son la de disminuir la permeabilidad y la aereación, favorece la conservación de agua y aumenta la cohesión, esta-

biliza la estructura, modera los cambios de temperatura y asegura - la conservación de minerales nutritivos e interviene en el intercam bio de iones del suelo (Gaucher, 1971).

En cuanto a los limos, se puede mencionar que se constituyen - como elementos de impermeabilidad del suelo; y carecen de propieda - des coloidales, de tal manera que una abundancia de los mismos en - el suelo influye como un elemento de inestabilidad en la estructura (Gaucher, 1971).

Las arenas por su parte, dan al suelo una buena aereación y - drenaje, pero al mismo tiempo se tiene poca retención de agua y una baja cohesión, por lo mismo, no presentan dificultad al desarrollo radicular de las plantas y son penetradas con facilidad por los ins trumentos de laboreo (Gaucher, 1971).

Ahora bien, si se toman en cuenta las tres fracciones del sue - lo en sus porcentajes, se tiene que en general, los datos para arci lla son especialmente altos (sobre todo los de la muestra 4 que es de 28.33% y los de las muestras 3 y 5 que están por arriba del 30%) y esto trae varios problemas consigo, a saber, un suelo compacto - que se hace difícil de trabajar, alta microporosidad que tiene como consecuencia el encharcamiento del agua, además del riesgo derivado de labores de cultivo sobre el mismo, ya que al alterar la estructu ra se tiende a compactar más el suelo y esto a menudo deriva en la obstrucción del desarrollo radicular de las plantas; de la misma ma nera se puede mencionar que todas estas características traen consi go implicaciones para los microorganismos, ya que por ejemplo, la - alta retención de humedad facilita la proliferación de los mismos, incluidos los rizobios, que encuentran de esta manera condi ciones a decuadas para su establecimiento.

Por otra parte, se tiene que los datos para Densidad Real y -

Densidad Aparente, coinciden con lo expresado en relación a la textura; particularmente la Densidad Real esta relacionada en forma directamente proporcional a la cantidad de arcilla de la muestra y la Densidad Aparente se relaciona de manera tal con la Densidad Real, que indica que la mayor parte del Espacio Poroso, esta compuesto por los microporos del suelo, con las consecuencias ya mencionadas en cuanto al comportamiento del agua en el mismo.

En cuanto al pH del suelo, en general se encuentra dentro de los límites de tolerancia para el desarrollo bacteriano, que según Bergey (op. cit.), se encuentra entre 5.0 y 8.5. Las muestras 4 y 5, presentan un pH ácido, hecho que puede deberse a la acumulación de materia orgánica, ya que para Vertisoles el pH es de 6.0 a 8.5 y para Feozems en la superficie puede ser mayor de 7.0 (FitzPatrick, 1984), pues se trata de muestras pertenecientes a las zonas aledañas a la presa, receptoras de material (suelo y materia orgánica) de las zonas más elevadas. Es necesario mencionar que la materia orgánica es útil a los rizobios por proporcionarles sustrato y nutrientes para su desarrollo cuando se encuentran en vida libre, además de incrementar la retención de humedad (Alexander, 1980).

Como puede observarse en la misma tabla, los resultados de M.O. obtenidos caen en su mayoría dentro de los límites expresados por Ortíz (1985) y FitzPatrick (op. cit.), es decir, del 1 al 5%; excepto la muestra 4 (5.347%), que al ser de una zona aledaña a la presa recibe aportes de materia orgánica. Según la Clasificación Tentativa para M.O. propuesta por Moreno (1970), la muestra 3 es Medianamente Pobre en materia orgánica, las muestras 1, 2 y 5 tienen un contenido Mediano de ésta y la muestra 4 es Extremadamente Rica (Ver apéndice II, Tabla D).

Cabe hacer la aclaración de que se encontró una mayor propor--

ción de nodulación en zonas cercanas a la presa, en comparación a las zonas de pastizal, que se encuentran en zonas más altas. Esto - puede asociarse al hecho de que éstas zonas poseen un mayor aporte de agua debida a la acción de capilaridad en el suelo, favoreciendo el establecimiento de leguminosas y rizobios en el suelo, auspician do la relación simbiótica.

Por lo que respecta a los resultados expresados en la Tabla 3, tanto las características macro como microscópicas observadas en - los cultivos puros, coinciden con las expresadas por Vincent (1970), es decir, son bacilos Gram Negativos, que forman colonias blancas o ligeramente rosadas en medio ELMARC, éstas son de forma circular y aspecto liso. Acerca de las pruebas bioquímicas realizadas, el comportamiento mostrado por las cepas, concuerda con las características expresadas por Bergey (op. cit.) y que a continuación se mencionan (Koneman, 1983).

Todas las cepas a excepción de FN 10 produjeron  $H_2S$  en medio - SIM y TSI (éste último no aparece en la Tabla 3, sin embargo, se - menciona como corroboración del primero).

Movimiento detectado para todas las cepas en el medio SIM.

La no utilización de citrato como única fuente de carbono por ninguna cepa.

La no licuefacción de la Gelatina por parte de ninguna cepa.

En la misma fuente se menciona un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones; para comprobar esto se hicieron varias pruebas, con los siguientes resultados; respuesta - negativa por parte de todas las cepas en el medio Agar Nitrado - (no hay reducción de nitrato a nitrito); la no producción de ácido en los medios TSI y Prueba de Rojo de Metilo (indican que no se realizó fermentación), resultado negativo en la Prueba de Voges-Proskauer (no hay degradación fermentativa de la glucosa), respuesta po

sitiva a la Prueba de la Catalasa (indica la presencia de catalasa, enzima presente en bacterias aerobias y anaerobias facultativas).

La Prueba del Rojo de Fenol, es positiva para FN 4 (producción de ácido) y negativa para las demás cepas (reacción neutra o básica); esto indica la mayor diferencia entre las cepas y coloca a -- FN 4 dentro del grupo I, mientras las demás se ubican dentro del - grupo II.

No hay producción de ácido a partir de carbohidratos, como se ve en la respuesta negativa a gas en medio TSI, esto tiene relación directa también con el metabolismo aerobio, que no produce ácidos - tan fuertes como en una fermentación.

Por último, esta la prueba del Indol, que fué negativa en todos los casos (carencia de la enzima triptofanasa).

Todos estos resultados aunados a los de nodulación, que muestran la infección de FN 4 solamente en Phaseolus vulgaris, mientras que Crotalaria pumila, es infectada por las cepas FN 10, FN 15 y - FN 19, llevan a afirmar que FN 4 es una cepa perteneciente a la especie Rhizobium phaseoli, mientras que las restantes cepas utilizadas pertenecen a la especie Rhizobium caupi.

Como puede observarse a partir de la Tabla 4, la mayor parte de los ejemplares colectados durante el período de muestreo pertenecen al estrato herbáceo, debido principalmente a la facilidad que - presentan éstas para su prensado, extracción de nódulos, transporte y manejo en general, en comparación con los individuos pertenecientes al estrato arbustivo y arbóreo. Asimismo es importante mencionar que para árboles y arbustos de esta familia por el hecho de ser perennes, presentan un período de floración y fructificación anual más temprano (Sanchez, op. cit.). Esto provocó que no se reconocieran algunos individuos arbustivos y arbóreos como ejemplares pertenecientes a la familia en estudio, además de que por tratarse de á-

reas de pastizal y de cultivo, existe una baja distribución de los individuos de éstos estratos.

En el Listado A, se presentan características más detalladas de todas las especies colectadas, aún de aquellas que no fueron determinadas hasta especie.

En la Tabla 5, se muestran las características de desarrollo de las plantas en el invernadero, tales como la germinación de las semillas; así por ejemplo, Phaseolus sp. no germinó en las macetas inoculadas con su cepa respectiva (FN 10), el mismo caso de Dalea - citriodora con FN 19. En general durante esta fase del proyecto, se registro un bajo porcentaje de germinación (16.7%), lo que redujo - las dimensiones de la determinación de la efectividad de las cepas.

En cuanto a las causas posibles de la baja germinación de las semillas, Duffus y Slaughter (1980), mencionan que; ..."en la mayor parte de las leguminosas, el endospermo es de corta duración y antes de la madurez se reduce a una delgada capita que envuelve los - cotiledones, y/o al embrión"...; por lo tanto, es posible que al momento de coleccionar las semillas en campo, éstas no estuvieran totalmente maduras, hecho que afectó el desarrollo total del endospermo y por lo tanto la viabilidad de las semillas.

Cabe mencionar aquí el texto de la U.S.D.A. (1962), que a la - letra dice; ..."las cubiertas de las semillas tienden a ser duras y quebradizas y con frecuencia impermeables al agua. Durante los procesos de limpieza y selección a veces se maltratan las semillas al rajarse o descascararse su cubierta"... ; esto sirve para justificar dos hechos; el primero, referente al tratamiento de escarificación dado a las semillas a fin de facilitar la germinación; el segundo, relacionado a que tal vez, ese procedimiento no fue del todo eficaz, y pudieron haber ocurrido dos fenómenos; uno, la escarificación no fué efectiva y por lo tanto el agua no pudo penetrar al in-

terior de las semillas y dos, el tratamiento pregerminativo pudo haber dañado el endospermo de la semilla y/o el embrión.

Es probable que el problema de germinación se encuentre también relacionado con el efecto de la temperatura, ya que, según Bidwell (op. cit.), las mejores temperaturas previas a la germinación se encuentran entre 0 y 10°C, y las semillas utilizadas en el presente trabajo, se mantuvieron guardadas en el laboratorio, protegidas de los cambios de temperatura, evitando que las semillas cumplieran con su período de horas frío requeridas para desarrollar su complejo hormonal, propiciando los resultados ya mencionados.

Cabe mencionar un fenómeno que se presentó en el estudio y es que las plantas noduladas incrementaron en general el período de su desarrollo vegetativo en comparación con las que no nodularon, con el desarrollo en éstas últimas de frutos, incluso antes de la época de cosecha. Otro hecho importante es que las plantas noduladas poseían de 1 a 5 nódulos y su desarrollo radicular fue pobre, sobre todo en C. pumila y D. citriodora, debido a que el suelo vaciado en las macetas, por las características que le confiere la alta proporción de arcilla que contiene y que fueron discutidas con anterioridad, obstruyó el desarrollo de las raíces de las especies mencionadas; en cuanto a Phaseolus sp. y Phaseolus vulgaris (la primera es una planta que presenta una semilla pequeña pero forma tubérculo, mientras que la segunda posee una semilla grande y vigorosa), aún cuando el desarrollo radicular se vio afectado, este hecho no influyó tanto en el desarrollo de las plantas.

En cuanto a los datos de nodulación, se pudo notar que FN 4 es una cepa específica y que sólo pudo infectar a Phaseolus vulgaris, que es la leguminosa de donde se obtuvo dicha cepa.

Por su parte FN 10 mostró inoculación cruzada con C. pumila, lo que lleva a suponer una baja especificidad, sin embargo, debido

a los problemas de germinación no se pudo constatar este hecho en - las demás especies inoculadas con esta cepa.

La cepa FN 15 mostró un hecho interesante ya que se observa in - fectividad en P. vulgaris, que es una especie de interés económico alimenticio e indica potencialidad para obtener una cepa con alta - efectividad a partir de otros trabajos; además también muestra nodu - lación con la misma leguminosa de donde fué obtenida (C. pumila), - ambos hechos ayudaron a la determinación de la especie bacteriana.

La cepa FN 19 presenta nodulación con C. pumila, pero no hubo germinación en los lotes de Phaseolus sp. y Dalea citriodora, por - lo tanto también presenta la alternativa de efectividad para C. pu - mila al comparar este aspecto en los lotes.

Por último es esta misma tabla se anotan los promedios de Tem - peratura Máxima (34.9°C) y Mínima (13.2°C), los cuales pueden consi - derarse adecuados para el desarrollo de las plantas (Bidwell, op. - cit.).

Por otro lado, en la Tabla 6(a) se muestran los resultados de la determinación de Nitrógeno Total en el suelo. Para P. vulgaris, el lote que más nitrógeno aportó al suelo fue FN 4, seguido en or - den decreciente por FN 15, FN 19, FN 10 y Testigo, lo que concuerda precisamente con los datos de nodulación y que lleva a suponer que las cepas FN 4 y FN 15 son las más efectivas.

Al analizar los resultados de contenido de nitrógeno en plan - tas de P. vulgaris, se nota que en orden decreciente se tiene a - FN 15, FN 4, FN 19, FN 10 y Testigo. La diferencia entre este orden y el orden dado para nitrógeno en suelo se relaciona al hecho de - que el lote inoculado con FN 15 había empezado a formar frutos en - tanto que el lote inoculado con FN 4, estaba en etapa vegetativa; esto significa que la formación de vaina en FN 15 eleva los resulta

dos de contenido de Nitrógeno Total, ya que como se sabe las semillas de leguminosas tienen altos contenidos de proteínas (Allen, - 1981); sin embargo, una planta vigorosa y con buen desarrollo vegetativo (como las del lote FN 4), es posible que sostengan una producción más alta de semillas, y que un mayor aporte de nutrimentos al suelo sea obtenido al darse el proceso de descomposición de los tejidos vegetales en comparación con una planta que no se desarrolla mucho, aunque fructifique más rápido, si bien esto último puede ser una ventaja adaptativa en climas no muy adecuados para la planta - (Bidwell, op. cit.).

En resumen se tiene que la cepa más efectiva para P. vulgaris es FN 4, seguida de FN 15, y al no haber nodulación en los demás ca sos no tiene sentido mencionar la efectividad para esos lotes.

Al analizar la cantidad de Nitrógeno Total en plantas para C. pumila (Tabla 6(b)), se tiene que la cepa más efectiva es FN 19, se seguida de FN 10, Testigo, FN 4 y FN 15; la razón por la que el lote Testigo mostró un contenido más alto de este elemento que FN 4 y - FN 15, es que la única planta que germinó en aquel lote, detuvo su desarrollo vegetativo antes de la época de cosecha y formó frutos y semillas maduros, éstas tienen altos contenidos de nitrógeno y por eso los resultados se vieron alterados.

Al comparar el orden de las cantidades de nitrógeno en plantas con la cantidad de Nitrógeno Total en suelo para C. pumila, hay algunas diferencias, siendo mayor la cantidad de nitrógeno en el lote FN 4 que en el lote FN 19; sin embargo, esto se puede atribuir al - número de individuos germinados por maceta, ya que en el primer caso se tuvieron hasta 5 individuos por repetición y en el segundo ca so solamente 1 individuo en cada repetición, este factor en combinación con los datos de nitrógeno en plantas indica la verdadera efec

tividad de las cepas, así por ejemplo, el lote de la cepa FN 19 que es la más efectiva en los análisis de tejidos vegetales, esta por arriba de la cepa FN 4, que tuvo el mayor número de individuos germinados por maceta, pero que no nodularon, esto la coloca arriba del lote FN 10 que sí presentó nodulación y por supuesto arriba del lote Testigo, éstos dos últimos lotes presentaron un sólo individuo - germinado por maceta.

En la Tabla 7, estan los resultados del análisis estadístico de los datos del contenido de nitrógeno del lote experimental de la fase de invernadero. Cabe mencionar que el análisis estadístico es usado aquí sólo como un auxiliar a las observaciones hechas durante el desarrollo del trabajo. En esta tabla se establece una comparación entre cada una de las cepas para verificar si todas presentan cantidades similares de nitrógeno o alguna de ellas tiene diferencias significativas con respecto a la fijación de este elemento. Ma nejando un nivel de confianza de 0.95 se puede afirmar que para P. vulgaris, ninguna de las muestras presenta diferencias significativas con respecto a la fijación de nitrógeno, aún cuando son comparadas con el lote testigo; hecho que se atribuye principalmente al bajo número de individuos que se compararon.

Sin embargo, para el caso de C. pumila, existen diferencias - significativas en cuanto a la fijación de nitrógeno entre las cepas, teniendo FN 10 menor contenido de nitrógeno que FN4 cuando son comparados los contenidos de nitrógeno en suelo; esto se atribuye a la mayor cantidad de plantas germinadas que tuvieron desarrollo vegetativo y que por lo tanto aportaron mayor cantidad de tejidos radiculares en las macetas inoculadas con FN 4, debido a esto, el con tenido promedio de nitrógeno en las macetas de este lote fue mayor que el contenido promedio de nitrógeno determinado para las macetas

inoculadas con FN 10, no habiendo una diferencia real debida a la efectividad de la cepa.

Por el contrario, al comparar el contenido de nitrógeno en - plantas, se encontró una diferencia significativa entre los individuos inoculados, teniendo que entre FN 19 y FN 4 la diferencia es - atribuible a la efectividad de la primera cepa, ya que el lote de - la misma presenta la mayor cantidad de nitrógeno fijado. El resto - de las cepas no presentaron diferencias significativas en cuanto a la fijación de nitrógeno para la planta analizada, tal vez se deba como en el caso anterior al bajo número de individuos de que se disponía para el análisis estadístico.

Por último puede decirse que el conteo de bacterias por inóculo superó el límite de 300 colonias por caja a  $10^{-7}$  (Vincent, op. - cit.), esto hace necesario la realización de más diluciones, pero - también indica una sobrevivencia alta de rizobios en el mismo inóculo, lo, lo que podría hacerlo un medio adecuado para este fin.

## X.- C O N C L U S I O N E S .

- Se elaboró el listado de leguminosas encontrando 35 especies, incluyendo 2 cultivadas, habiendo determinado 20 de ellas hasta especie y 15 hasta género.
- De las leguminosas encontradas 30 pertenecen al estrato herbáceo, 4 al arbustivo y 1 al arbóreo.
- La germinación de semillas de leguminosas silvestres es muy baja, siendo necesario aplicar diferentes métodos de escarificación.
- Se obtuvieron 16 cultivos puros de Rhizobium de las leguminosas presentes en la zona de estudio, determinando 4 de éstos hasta especie.
- Las características físicas y químicas del suelo estudiado (pH, % de Materia Orgánica, Textura, Densidad Aparente y Real, % de Espacio Poroso y Nitrógeno Total) en conjunto presentan condiciones adecuadas para el desarrollo de las bacterias del género Rhizobium.
- La cepa FN 4 pertenece a la especie Rhizobium phaseoli y no muestra inoculación cruzada con Crotalaria pumila.
- Las cepas FN 10, FN 15 y FN 19 son de la especie Rhizobium caupi, las tres presentaron nodulación con Crotalaria pumila, además FN 15 presentó nodulación con Phaseolus vulgaris.
- Para Phaseolus vulgaris la cepa más efectiva es FN 4 seguida de FN 15.
- Para Crotalaria pumila la cepa más efectiva es FN 19 seguida de FN 10.
- Bajo las condiciones del presente estudio, el inóculo se mostró adecuado.

XI.- L I T E R A T U R A     C I T A D A .

- 1.- Allen, E.K. y Allen, U.N. (1981). "The Leguminosae. A Source - Book of Characteristics, Uses and Nodulation". The University of Wisconsin Press. U.S.A.
- 2.- Alexander, M. (1980). "Introducción a la Microbiología del Suelo". AGT Editores, S.A. México.
- 3.- Azcón, G. de Aguilar. (1983). "Simbiosis Rhizobium-Leguminosa". Investigación y Ciencia, Num. 82.
- 4.- Bergey, D.H. (1974). "Bergey's Determinative Bacteriology" Academic Press. Great Britain.
- 5.- Bidwell, R.G.S. (1979). "Fisiología Vegetal". AGT Editores S.A. México.
- 6.- Brill, W.J. (1977). "Fijación Biológica del Nitrógeno Atmosférico". Ciencia y Tecnología. Julio.
- 7.- Bonner, J. y Varner, J.E. (1976). "Plant Biochemistry". Academic Press. U.S.A.
- 8.- CETENAL. "Carta Climatológica Tepeji del Río". Clave: E-14-A-18. S.P.P. México.
- 9.- ——— "Carta Edafológica Tepeji del Río". Clave: E-14-A-18. S.P.P. México.
- 10.- ——— "Carta Geológica Tepeji del Río". Clave: E-14-A-18. S.P.P. México.
- 11.- ——— "Carta de Vegetación y Uso de Suelo Tepeji del Río". Clave: E-14-A-18. S.P.P. México.
- 12.- Duffus, C.M. y Slaughter, J.C. (1980). "Las Semillas y sus Usos". AGT. Editores S.A. México.
- 13.- FitzPatrick, E.A. (1984). "Suelos". ed. C.E.C.S.A. México.
- 14.- García, A.T. (1981). "Experimentos en Microbiología del Suelo". ed. C.E.C.S.A. México.

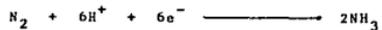
- 15.- Gaucher, G. (1971). "El Suelo y sus Características Agronómicas". ed. Omega. España.
- 16.- Jackson, M.L. (1982). "Análisis Químico de Suelos". 4ª edición. ed. Omega. España.
- 17.- Koneman, W.E. (1983). "Diagnóstico Microbiológico". ed. Panamericana. México.
- 18.- Larcher, R. (1977). "Ecofisiología Vegetal". ed. Omega. España.
- 19.- Martínez, M. (1955). "Las Leguminosas del Estado de México". - Gobierno del Estado de México. México.
- 20.- Mishustin, E.N. y Shilnikova, V.K. (1971). "Biological Fixation of Atmospheric Nitrogen". The Pennsylvania State University Press. U.S.A.
- 21.- Moreno, D.R. (1970). "Clasificación Tentativa para Materia Orgánica". INIA, SARH. México.
- 22.- Nutman, P.S. (1976). "Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants". Cambridge University Press. Great Britain.
- 23.- Ortiz, V.B. (1985). "Problemas de Fertilidad y Nutrición de Plantas en Suelos Arcillosos". En: Primer Reunión sobre manejo de Suelos Arcillosos y su implicación en la Agricultura. Memorias. U.A.CH. México.
- 24.- Postgate, J. (1981). "Fijación del Nitrógeno". ed. Omega. España.
- 25.- Quispel, A. (1974). "The Biology of Nitrogen Fixation". North Holland Publishing Co. Holland.
- 26.- Rzedowski, J. (1979). "Flora Fanerogámica del Valle de México". ed. C.E.C.S.A. México.
- 27.- Sanchez, O.S. (1979). "La Flora del Valle de México". 5ª edición. ed. Herrero. México.
- 28.- Sokal, R.R. (1969). "Biometria". H. Blume ediciones. México.

- 29.- Spiegel, R.M. (1970). "Estadística". ed. Mc. Graw Hill. México-co.
- 30.- Stumpf, P.K. y Conn, E.E. (1980). "The Biochemistry of Plants". Vol. 5. Academic Press. Great Britain.
- 31.- U.S.D.A. (1962). "Semillas". ed. C.E.C.S.A. México.
- 32.- Vargas, de R.E. (1969). "Aspectos Microbiológicos de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno por el Rhizobium". Instituto Geog. Agustín Codazz. Colombia.
- 33.- Vincent, L.M. (1970). "A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria". Great Britain.
- 34.- Yates, M.G. (1980). "Biochemistry of Nitrogen Fixation". En: - The Biochemistry of Plants. Vol. 5. ed. Stumpf, P.K. y - Conn, E.E. Academic Press. Great Britain.

A P E N D I C E I .

T A B L A A .

REACCIONES CATALIZADAS POR LA NITROGENASA.



OTROS SUSTRATOS REDUCIDOS INCLUYEN:  $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $\text{HC} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \end{array} \text{CH}$ ,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCN}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{CN}$ .

$\text{CH}_3\text{NC}+\text{CHCN}$ ,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CN}$ ,  $\text{t}-\text{CH}_3\text{HC}+\text{CHCN}$ ,  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH})_3\text{CN}$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9\text{CN}$ .

Tomado de Yates (1981).

T A B L A B .

SISTEMAS BIOLÓGICOS QUE FIJAN NITRÓGENO.

LIQUENES	<u>Nostoc</u> , <u>Anabaena</u> , <u>Tolypothryx</u> . (*)
ANGIOSPERMAS (Gunnera)	<u>Nostoc</u>
AZOLLA	<u>Anabaena azollae</u> .
PASTOS TROPICALES	<u>Azotobacter paspali</u> , <u>Azospirillum</u> sp. Leguminosas + <u>Rhizobium</u> .
NODULOS RADICULARES	No-Leguminosas + <u>Frankia</u> (Actinomyceto)
	<u>Nostoc</u> , <u>Anabaena</u> , <u>Plectonema</u> , <u>Trichodesmium</u> , <u>Gleocapsa</u> , etc (*)
AEROBICOS	<u>Azotobacter</u> , <u>Beijerinckia indica</u> , <u>Derxia gummosa</u> , <u>Mycobacterium</u> ( <u>flavum</u> , <u>roseoalbum</u> , <u>azot-absorptum</u> ). Bacterias que oxidan metano (ej. <u>Methylococcus capsulatus</u> ). <u>Xantobacter autotrophicum</u> , <u>Azospirillum lipoferum brasiliense</u> .
FACULTATIVOS	<u>Klebsiella pneumoniae</u> , <u>Bacillus polymyxa</u> , <u>Aquaspirillum (perigrinum)</u> . <u>Escherichia coli</u> (a), <u>Citrobacter freundii</u> , <u>Erwinia herbicola</u> .
ANAEROBICOS	<u>Rhodospirillum</u> , <u>Rhodopseudomonas</u> (*). <u>Clostridium</u> ( <u>pasteurianum</u> , <u>butyricum</u> , <u>butylicum</u> , <u>kluyvertii</u> , etc.). <u>Desulfotomaculum</u> , <u>Desulfovibrio</u> . <u>Chromatium</u> , <u>Chlorobium</u> (*).

(\*) FOTOSINTÉTICOS

(a) POR TRANSFERENCIA GENÉTICA DE "nif" DE Klebsiella pneumoniae.

Tomado de Yates (1981).

T A B L A C .

CARACTERISTICAS GENERALES DE Rhizobium.

GRUPO	PRODUCCION DE	NUMERO DE FLAGELOS	POSICION	TIENPO DE GENERACION	ESPECIES
I	ACIDOS	2-6	PERITRICOS	2-4 HORAS	<u>R. leguminosarum</u> <u>R. phaseoli</u> <u>R. meliloti</u> <u>R. trifolii</u>
II	ALCALIS	1	SUBPOLAR O POLAR	4-6 HORAS	<u>R. japonicum</u> <u>R. lupini</u> <u>R. caupi</u>

Tomado de Quispel (1974).

A P E N D I C E    I I .

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS BIO-  
QUIMICAS PARA DETERMINACION DE BACTERIAS.

AGAR NITRATADO INCLINADO.

Extracto de Carne ----- 3g  
Peptona ----- 50g  
KNO<sub>3</sub> ----- 0.25g  
Agar ----- 12g  
Agua Destilada ----- 1 litro

A)  $\alpha$ -Naftilamina al 0.5% en Acido Acético 5N.

B) Acido sulfanilico al 0.8% en Acido Acetico 5N.

1 ml. de A + 1 ml. de B.

AGAR GLUCOSADO.

Glucosa ----- 50g  
Agar ----- 20g  
Rojo de Fenol ----- 0.25g  
Agua Destilada ----- 1 litro

GELATINASA

Extracto de Carne ----- 3g  
Peptona ----- 5g  
Gelatina ----- 120g  
Agua Destilada ----- 1 litro

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS BIO-  
QUIMICAS PARA DETERMINACION DE BACTERIAS.

MEDIO SIN.

Extracto de Carne -----	3g
Peptona -----	30g
H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -----	0.025g
Fe -----	2g
Agua Destilada -----	1 litro

PRUEBA DE LA UREA.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	9.1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	9.5g
Extracto de Levadura -----	0.1g
Rojo de Fenol -----	0.1g
Urea -----	20g
Agua Destilada -----	1 litro

MEDIO TSI.

Peptona -----	20g
Lactosa -----	10g
Sucrosa -----	10g
Glucosa -----	1g
Cloruro de Sodio -----	5g
Sulfato Ferroso de Amonio -----	0.2g
Tiosulfato de Sodio -----	0.2g
Rojo de Fenol -----	0.025g
Agar -----	2g
Agua Destilada -----	1 litro

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS BIO-  
QUIMICAS PARA DETERMINACION DE BACTERIAS.

AGAR CITRATADO.

MgSO <sub>4</sub> -----	0.2g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	1g
Citrato de Sodio -----	3g
NaCl -----	5g
Agar -----	20g
Azul de Bromotimol -----	0.08g
Agua Destilada -----	1 litro

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER.

Glucosa -----	10g
Agua Destilada -----	1 litro

Se adiciona a los tubos con este medio, 0.6 ml. de una solu-  
cion de α-Naftol y 0.2 ml. de una solución de KOH.

PRUEBA DE ROJO DE METILO.

Glucosa -----	5g
Agua Destilada -----	1 litro

0.1g de Rojo de Metilo en 300 ml. de etanol y 200 ml de a-  
gua destilada.

PRUEBA DE LA CATALASA.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -----	30%
-------------------------------------	-----

Nota: Todos los medios hasta aquí mencionados fueron tomados  
de Lynch et-al; 1985.

MEDIOS DE CULTIVO ESPECIALES PARA Rhizobium.

MEDIO ELMARC.

$K_2HPO_4$ -----	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----	0.2g
NaCl -----	0.1g
Manitol -----	10g
Levadura -----	16g
Agar -----	15g
Rojo Congo -----	10 ml. de solución 1/400
Agua Destilada -----	1 litro

MEDIO NUTRITIVO LIQUIDO.

$K_2HPO_4$ -----	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -----	0.2g
NaCl -----	0.1g
Manitol -----	10g
Levadura -----	16g
Agua Destilada -----	1 litro

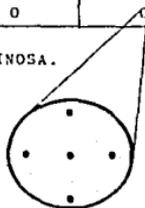
Medios tomados de Vincent, 1970.

FIGURA 1 "a" : ESQUEMA QUE REPRESENTA GRAFICAMENTE EL DISEÑO EXPERIMENTAL USADO PARA LA DETERMINACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA RELACION Rhizobium-LEGUMINOSA.

CEPA \ LEGUMINOSA	FN 4	FN 10	FN 15	FN 19	TESTIGO
<u>Phaseolus vulgaris</u>	0 0 0				
<u>Phaseolus sp.</u>	0 0 0				
<u>Crotalaria pumila</u>	0 0 0				
<u>Dalea citriodora</u>	0 0 0				

0 = MACETA CON 5 SEMILLAS DE CADA ESPECIE DE LEGUMINOSA.

FIGURA 1 "b".  
Orientación de las  
semillas en las ma-  
cetas.



T A B L A D .

CLASIFICACION TENTATIVA PARA MATERIA ORGANICA PROPUESTA POR MORENO  
(1970).

CLASIFICACION	CONTENIDO DE MATERIA ORGANICA (%)
Extremadamente Pobre	Menor de 0.6%
Pobre	0.6 a 1.2%
Moderadamente Pobre	1.21 a 1.8%
Mediano	1.81 a 2.4%
Medianamente Rico	2.41 a 3.0%
Rico	3.01 a 4.2%
Extremadamente Rico	Mayor de 4.2%