

14  
zej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" Z A R A G O Z A "

" EVALUACION BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO, DE LA FIJACION DE N<sub>2</sub> EN DIFERENTES CÉPAS DE Rhizobium sp ASOCIADAS A LEGUMINOSAS SILVESTRES "

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O S :  
P R E S E N T A N ,

GUILLERMO GONZALEZ MARTINEZ  
MA. ISABEL L. URRIETA AVALOS

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	2
1.- Planteamiento del problema	2
2.- Marco teórico	-
a.- Importancia del Nitrógeno	4
b.- Fijación del Nitrógeno	5
c.- Fijación Simbiótica de Nitrógeno	7
d.- Infectividad, Especificidad y Efectividad entre <u>Rhizobium</u> -Leguminosa	8
e.- Criterios considerados para la clasificación de <u>Rhizobium</u>	13
f.- Tipos y distribución de nódulos	16
g.- Alternativas de uso para las leguminosas	18
h.- Métodos de inoculación	21
3.- Antecedentes. Trabajos previos efectuados <u>en</u> el área de estudio.	23
II.- HIPOTESIS	26
III.- OBJETIVOS	27
IV.- DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	28
V.- METODOLOGIA	
1.- Trabajo de campo.	31
2.- Trabajo de laboratorio.	
a.- Aislamiento, purificación y conservación de cepas de <u>Rhizobium sp</u> a partir de nódulos radiculares colectados en campo.	31
b.- Determinación de las cepas.	33
c.- Desarrollo del experimento	33

d.- Observación de la nodulación	37
e.- Determinación de Nitrógeno	37
VI.- RESULTADOS Y ANALISIS	
a.- Ejemplares de leguminosas	39
b.- Banco de semillas	41
c.- Cepario	42
d.- Nodulación	44
e.- Porcentaje de Nitrógeno en el suelo	46
f.- Porcentaje de Nitrógeno en tallos y hojas	50
g.- Calidad de las leguminosas	51
VII.- CONCLUSIONES	53
VIII.- PROPUESTAS	54
IX.- ANEXOS	
1.- Grupos de inoculación cruzada y asociaciones de <u>Rhizobium</u> -leguminosa	55
2.- Grupos efectivos de cultivos de leguminosas	57
3.- Características diferenciales del género - <u>Rhizobium</u> según la clasificación por Taxono mía Numérica	62
4.- Técnicas para la determinación de <u>Rhizobium</u>	65
5.- Clasificación Taxonómica de las Leguminosas	68
6.- Método Kjeldhal para determinación de Nitró geno total	70
7.- Análisis Estadístico general	76
8.- Clasificación de suelos en base al % Nitró- geno total	104
9.- Recuperación Estadística de datos experimen tales	105

X.- APENDICES

1.- Por ciento de Proteína en tallos y hojas	106
2.- Resultados de análisis físicos y químicos - del suelo del área de estudio	107
XI.- BIBLIOGRAFIA CITADA	108
XII.- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	112

## RESUMEN

La atmósfera, mezcla gaseosa, es la fuente más importante de nitrógeno. Este elemento es esencial para los organismos, sin embargo son pocos los que pueden asimilarlo directamente y dentro de éstos se encuentran las bacterias del género Rhizobium. Se asocian simbióticamente con las leguminosas formando estructuras llamadas nódulos, en donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno, ésta se encuentra regida por factores físicos, químicos y ambientales.

El objetivo de éste estudio fué la evaluación bajo condiciones de invernadero, de la fijación de nitrógeno en diferentes cepas de Rhizobium asociadas a leguminosas silvestres procedentes de un pastizal localizado en el área de San Luis Taxhimay, Edo. de México.

Se efectuó una colecta de semillas, nódulos radiculares y suelo del área de estudio. Se llevó a cabo el aislamiento, purificación y conservación de cepas de Rhizobium. Se formaron asociaciones Rhizobium-Leguminosas en base a un diseño bifactorial de clasificación doble con muestras compuestas. Se cuantificaron: la pérdida de nitrógeno en suelo, la acumulación de nitrógeno en tallos y hojas y el número de nódulos.

Se encontró que las cepas de Rhizobium son infectivas, no específicas e infectivas. Sin embargo, se observó una relación directa en cuanto al nitrógeno perdido en el suelo con respecto al nitrógeno acumulado en tallos y hojas para Medicago polymorpha.

Lupinus sp., Crotalaria rotundifolia y M. polymorpha son susceptibles de uso agropecuario, no obstante, dadas sus características, M. polymorpha es la especie más recomendada para su incorporación en un sistema de apropiación intensivo.

## I.- INTRODUCCION

### 1.- Planteamiento del problema.

Es indudable la importancia que hoy en día merecen la agricultura y la ganadería, puesto que tales actividades constituyen la base alimenticia de México. Así pues, el apoyo científico y tecnológico que se brinde al sector agropecuario repercutirá positivamente en el desarrollo socioeconómico de nuestra Nación.

Toledo (1984) afirma que nos enfrentamos actualmente, a una tendencia cada vez más irracional de apropiación de los recursos naturales en donde lo importante es el mayor rendimiento que éstos pueden ofrecer a corto plazo, sin hacer caso de las consecuencias ecológicas desastrosas que puedan haber a futuro. México no es la excepción, en nuestro país el problema se acentúa más dado el alto número de ecosistemas y riquezas potenciales existentes que ha llevado a abusar de los recursos naturales y a no valorar el potencial alimenticio y económico que de las especies animales y vegetales se puede obtener.

El Edo. de México también ha sufrido los efectos de esta apropiación irracional. Hoy en día grandes extensiones de bosque de las serranías del Estado han sido taladas parcial o totalmente, quedando el suelo a merced de la erosión y constituyendo uno de los problemas más graves de la entidad y del país.

Si bien las áreas boscosas pueden ser regeneradas, en muchos casos el daño es irreversible. Es entonces cuando deben surgir alternativas de uso del suelo y entre éstas la creación de praderas artificiales para la actividad ganadera, en donde se incluyan especies vegetales seleccionadas. Por otro lado, existen zonas en las cuales es difícil la implementación de la agricultura dado que los suelos son pesados; por el alto contenido de arcillas, no obstante los pastos pueden soportar estas condiciones y son susceptibles de uso pecuario. Este es el caso concreto de la región estudiada.

Existen dos términos que son de importancia y se refieren al tipo de apropiación que se hace de un recurso natural; se habla de una "Apropiación extensiva" cuando se hace uso completamente irracional, esto es que no existe una planeación y la apropiación se mantiene mientras exis

ta el recurso. Por otro lado la "Apropiación intensiva" supone una planeación bien definida del empleo del recurso, en donde se hacen estudios de índole científico, tecnológico y económico cuyos costos deben verse compensados por las ganancias que represente la apropiación y lo que es más importante, que el costo ecológico sea reducido considerablemente y el recurso en cuestión sea susceptible de mayor tiempo de uso.

Al proponer el uso intensivo de un pastizal, se debe iniciar el trabajo conociendo las principales especies vegetales que los constituyen y dentro de éstas merecen especial atención las Leguminosas, que se asocian simbióticamente con las bacterias del género Rhizobium, de esta manera las bacterias fijan nitrógeno ( $N_2$ ) que se traduce en proteínas enriqueciendo el follaje de estas plantas y sumado a otras características pueden hacer que adquieran un alto valor forrajero. La asociación puede aportar  $N_2$  excedente al suelo, con lo cual se benefician otras familias vegetales, como las gramíneas y/o las compuestas que pueden tener también un alto valor forrajero. Si las leguminosas no son apetecibles por el ganado, pero tienen altos contenidos de  $N_2$ , pueden emplearse como abono verde para mejorar el rendimiento de suelos agrícolas sensiblemente empobrecidos por la constante extracción de nutrientes.

Se debe recalcar la importancia que tiene el hacer estudios con especies vegetales y cepas bacterianas silvestres, ya que están "adaptadas" a las condiciones climáticas y edáficas características de cada región, que en ciertos casos llegan a ser extremas. La región de San Luis Taxhimy, Edo. de México, presenta suelos arcillosos difíciles para la agricultura con extensas áreas de pastizal inducido y una gran variedad de leguminosas silvestres y cepas rizobiales. Estas asociaciones, de alguna manera, están funcionando bajo tales condiciones y están fijando  $N_2$  atmosférico. El reto constituye averiguar en que proporción está siendo fijado tal elemento y bajo que condiciones se almacena. Además no se puede olvidar la repercusión económica que esto representa, puesto que proporciona una alternativa en el uso de especies leguminosas domesticadas, como la alfalfa y el trébol, cuyo cultivo es costoso y difícilmente accesible a un campesino de la región, además de que los resultados pueden ser desfavorables y con graves pérdidas económicas. Por lo expuesto se debe valorar la riqueza potencial de los pastizales y el uso racional del recurso antes de que se pierda definitivamente.



## 2.- MARCO TEORICO

### a) Importancia del Nitrógeno.

El nitrógeno atmosférico es un gas diatómico cuya fórmula química es  $N_2$ . Es prácticamente inerte puesto que tiene tres enlaces químicos que unen a los dos átomos en forma fuerte y estable, de tal modo que se requiere gran energía para romperlos.

El  $N_2$  recibió el nombre de "azoe" -sin vida- de Antonio Laurent Lavoisier, debido a su incapacidad para sostener el metabolismo de los organismos vivos. Pero este nombre es irónico, ya que es un constituyente esencial de las proteínas y todos los seres vivos lo requieren en grandes cantidades. Tanto para las plantas como para los animales el  $N_2$  es probablemente el mayor limitante del crecimiento, y agregado en forma adecuada a los campos de cultivo es un fertilizante de primer orden, Brill (1977).

El  $N_2$  se absorbe generalmente en las plantas como iones nitrato ( $NO_3^-$ ) o iones amonio ( $NH_4^+$ ), aunque el  $NO_3^-$  es rápidamente reducido, probablemente a  $NH_4^+$  por medio de una enzima que contiene molibdeno (Mo). Los iones  $NH_4^+$  y parte de los carbohidratos sintetizados en las hojas son convertidos en aminoácidos, principalmente en la misma hoja verde; de aquí que tan pronto como el aporte de  $N_2$  asciende en comparación con el de otros nutrientes, las proteínas producidas en exceso permiten a las hojas de la planta alcanzar mayor tamaño y con ello tener una mayor superficie asequible a los procesos de fotosíntesis.

Este efecto del  $N_2$  de incrementar el desarrollo foliar no es el único que ejerce sobre la hoja; cuanto mayor es el aporte de  $N_2$ , más rápidamente se convierten en proteínas y en protoplasma los carbohidratos sintetizados y más pequeña es la proporción que queda para su conversión en material para la pared de la célula, la cual consta principalmente de carbohidratos carentes de nitrógeno como pectato de calcio, celosanas y ligninas.

El  $N_2$  por consiguiente, aumenta la razón protoplasma-materiales de la pared celular, y esto tiene varias consecuencias: aumenta el -

tamaño de las células y les ocasiona una pared más delgada, haciendo a las hojas más succulentas y menos ásperas, eleva también la proporción de agua y disminuye la de calcio en relación al peso seco. lo primero porque el protoplasma es más acuoso y lo segundo porque tiene menos calcio que los materiales de la pared celular. Cantidades excesivas de  $N_2$  dan hojas con células tan grandes y de pared tan delgada que son fácilmente atacadas por insectos y hongos patógenos y dañadas por condiciones climatológicas desfavorables como las sequías y heladas. Por el contrario, una provisión muy baja de  $N_2$  da hojas con células pequeñas y paredes gruesas y en consecuencia, duras y fibrosas, Russell (1968).

b) Fijación del Nitrógeno.

El ciclo del Nitrógeno (FIGURA 1) es típico de nutrientes gaseosos el principal depósito es la atmósfera terrestre.

Los cuatro procesos especiales que intervienen en éste ciclo son los siguientes:

- \* Fijación del Nitrógeno.
- \* Amonificación.
- \* Nitrificación.
- \* Desnitrificación.

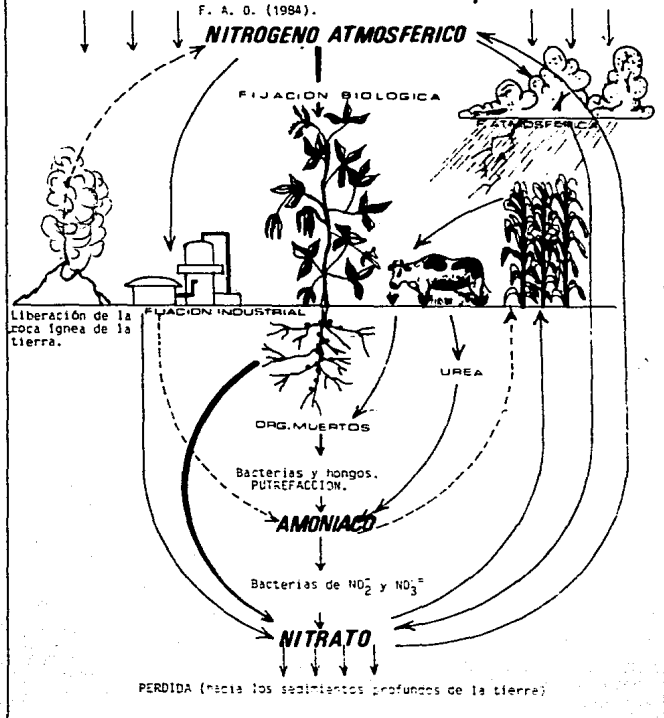
Existen tres formas de fijar el nitrógeno:

- \* Fijación atmosférica.
- \* Fijación industrial.
- \* Fijación biológica.

c) Fijación biológica.

Los suelos contienen numerosos organismos fijadores de  $N_2$  que viven libremente, y aunque la mayoría de las investigaciones se refieren a dos grupos de bacterias y a algunas algas verdeazules, las técnicas modernas basadas en el uso de aire enriquecido con el isótopo

FIGURA 1.-Ciclo del Nitrógeno. Sutton y Harmon (1976), Brill (1977),  
F. A. O. (1984).



po estable  $N^{15}$  o el radiactivo  $N^{13}$  han demostrado de modo concluyente que otros organismos pueden convertir el nitrógeno ( $N_2$ ) atmosférico en compuestos orgánicos. Excluyendo las algas verdeazules y las bacterias fotosintéticas, los organismos fijadores de  $N_2$  son:

- \* Bacterias del género Azotobacter, especies edáficas comunes son chroococcum, beijerinckii y vinelandii.
- \* Bacterias del género Beijerinckia y Clostridium.
- \* Se ha demostrado recientemente que ciertas bacterias comunes en el suelo pertenecientes a los géneros Aerobacter, Achromobacter y Pseudomonas, pueden fijar  $N_2$  en pequeña proporción.
- \* Dos levaduras, una Saccharomyces y una Rhodotorula. Russell. 1968.
- \* Fijación biológica por simbiosis.

c) Fijación simbiótica de  $N_2$ .

La fijación simbiótica de  $N_2$  se realiza en especies vegetales pertenecientes a otras familias además de las leguminosas. Un grupo que se ha investigado ampliamente son plantas típicas de terrenos húmedos, incluyen Alnus glutinosa, Myrica gale, especies de los tres géneros de la familia Elaeagnaceae, a saber: Hippophae rhamnoides, especies de Sheppardia y de Elaeagnus, y los géneros Coriario, Ceanothus y el subtropical y tropical Casuarina. Los nódulos se asemejan a los de las leguminosas en el color rojo interior aunque éste se debe a una antocianina y no a una leghemoglobina. Difieren de las leguminosas en que el simbiote o simbiosis no crecen en cultivos puros; tampoco se sabe con certeza a que grupo de organismos pertenecen. Russell (1968).

Las bacterias del género Rhizobium presentes en el suelo se caracterizan por ser las únicas con la habilidad de infectar las raíces de las leguminosas e inducir la formación de nódulos capaces de fijar  $N_2$  atmosférico. Son aeróbicas, gram-negativas y no producen esporas, generalmente requieren condiciones nutricionales simples; algunas cepas necesitan biotina, tiamina o ácido pantoténico otras más alguna vitamina. Sin embargo la mayoría pueden crecer en un medio de

cultivo simple a base de sales minerales y un azúcar. la sacarosa es la fuente de carbohidratos preferida por la mayoría de las cepas. - aunque se usan otros azúcares y azúcares-alcoholes. Nutman, 1969.

Las células de Rhizobium son móviles y se multiplican por simple división celular. Los rangos en el tiempo de generación de las colonias van de 2 a 4 hrs. para las llamadas de "crecimiento rápido" las cuales son relativamente grandes (de 2 a 4 mm de diámetro); las de "crecimiento lento" se desarrollan a las 6 u 8 hrs. y a los 6 o 7 días alcanzan un diámetro de 1 mm. La temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 30 °C, F. A. O., 1984, aunque algunas toleran temperaturas a bajo de 5°C y otras arriba de 40 °C, Berkun and Bohlool-1980. Algunas especies son muy sensibles a pH bajos y no se pueden establecer los hilos de infección radiculares en suelos ácidos. Los iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) inhiben la formación de nódulos a relativamente bajas concentraciones, ibidem.

d) Infectividad, Especificidad y Efectividad entre Rhizobium-Leguminosa

No todos los rizobios son capaces de invadir plantas leguminosas, de manera que la infectividad: capacidad de una cepa para nodular un hospedero dado, es de considerable importancia económica. Más aún, entre las cepas infectivas, la capacidad de las bacterias de los nódulos para llevar a cabo la fijación  $\text{N}_2$  en conjunto con las plantas varía mucho. La capacidad relativa de la asociación Legumino-Bacteria, una vez establecida, para asimilar  $\text{N}_2$  se conoce como efectividad. Muchas cepas de Rhizobium son muy efectivas mientras que otras son muy o completamente inefectivas. Una cepa que no permite fijación a una tasa suficiente que cubra la demanda del hospedero es parcialmente efectiva o totalmente inefectiva. Consecuentemente, la mera presencia de nódulos no es una garantía de que un cultivo de leguminosas pueda beneficiarse con  $\text{N}_2$ . No están bien establecidas las razones bioquímicas por las que las cepas inefectivas son incapaces de asimilar  $\text{N}_2$ , cuando se localizan en la estructura nodular.

Las bacterias inefectivas de los nódulos de las raíces producen un mayor número de nódulos que los cultivos efectivos, pero los nódulos son más pequeños en tamaño y tienden a estar más ampliamente distribuidos en el sistema radicular. Por otra parte una soja cepa mi -

crobiana puede ser inefectiva o parcialmente efectiva en un hospedero que esté además asociado con la fijación activa de  $N_2$  en otra variedad o especie de leguminosa. Más aún, las cepas bacterianas que parecen efectivas en ciertos hospederos pueden alcanzar el parasitismo en otros. Por consiguiente, no es posible concluir que una cepa dada es efectiva o inefectiva en términos absolutos. Alexander (1984)

Cuando Rhizobium únicamente nodula a la leguminosa de la cual fué aislada se dice que es Específica, González y Urrieta (1986).

Durante la formación de los nódulos, inicialmente las raíces de la planta secretan compuestos específicos los cuales atraen a la bacteria de la rizosfera y ahí la bacteria se multiplica. El Triptofano es secretado por las raíces de la planta y se oxida hasta ácido Indolacético (IAA) por Rhizobium. El IAA, junto con otros cofactores no bien conocidos probablemente provenientes de las raíces de la planta hospedera, inician el curvamiento de los pelos radiculares. Estos, crecen alrededor de las células bacterianas. Los rizobios secretan un polisacárido con el cual se induce la formación de poligalacturonasa por las raíces de la planta. La acción de éste compuesto permite a la bacteria la invasión al ablandar los tejidos radiculares de la planta.

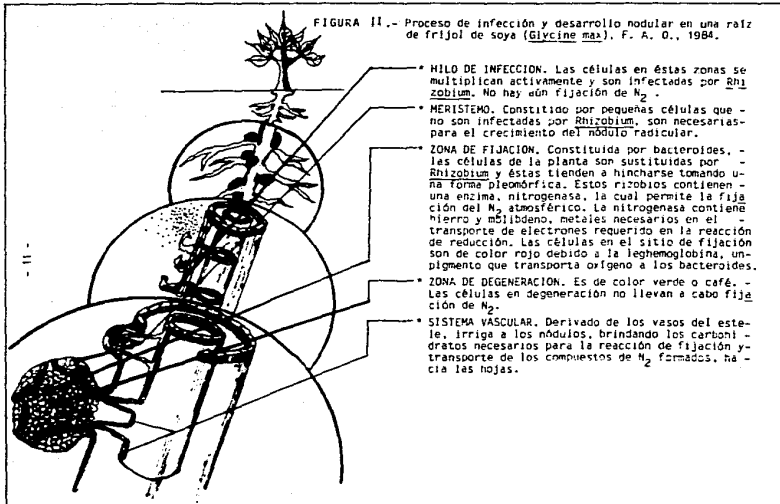
Recientemente las lecitinas han sido identificadas como mediadores específicos en la unión de Rhizobium con pelos radiculares susceptibles. Las lecitinas reaccionan específicamente con carbohidratos unidos a sitios sobre la superficie de las células de Rhizobium, son también mitogénicas y en los sitios prospectivos a la infección pueden funcionar incrementando la tasa de división celular; unen a Rhizobium a los sitios donde se inicia la nodulación. La infección de los pelos radiculares se inicia normalmente con el punto de curvamiento. La invasión en los pelos de las raíces ocurre mostrando una invaginación de Rhizobium por la deformación de éstos. Mostrándose entonces la penetración en la pared de las raíces primarias, la infección de la raíz por Rhizobium se da por el desarrollo de un tubo de infección (hilo) el cual está constituido por celulosa, está formado por células de Rhizobium acomodadas dentro de una matriz de po

lisacáridos. El hilo de infección penetra a través y entre las células del cortex de la raíz. Conforme éste crece, se acumula citoplasma alrededor de los núcleos, los cuales se mueven y dirigen el desarrollo del mismo. El desarrollo inicial del nódulo ocurre cerca del protoxilema. Las primeras células involucradas en la formación de los nódulos contienen el doble del número normal de cromosomas. Las células tetraploides se dirigen a la parte central del nódulo donde se desarrolla Rhizobium y se produce la fijación de  $N_2$ . La asociación de células normales con las anteriores unifican el tejido de soporte el cual, conecta al nódulo con el sistema vascular de la raíz. El tamaño y forma de los nódulos varía según las especies de leguminosas, Berkun and Bohlool (1980), (FIGURA 11).

Una vez liberado el hilo de infección dentro del citoplasma, Rhizobium puede adquirir una morfología peculiar: una forma celular que se ha denominado Bacteroide. Morfológicamente los bacteroides que se encuentran dentro del nódulo están hinchados e irregulares, apareciendo frecuentemente en forma de estrellas, de bastón o ramificados. Los bacteroides varían en tamaño y forma, y aquellos formados por R. leguminosarum, por ejemplo, son apreciablemente diferentes de los de R. trifolii. Muchas autoridades no restringen el término bacteroide a los microorganismos de forma peculiar encontrados en los nódulos de muchas leguminosas y usan la palabra para designar a las bacterias presentes en todos los tipos de nódulos, aunque los rizobios presenten o no la singular morfología, Alexander (1984).

Bohlool y Schmidt de la Universidad de Minesota en 1974, citado por Brill (1977), descubrieron el primer elemento del mecanismo responsable del reconocimiento para el proceso específico en el cual, cada leguminosa se asocia con una especie particular de Rhizobium. Ellos identificaron una proteína en el frijol de soya que se fija a las células de R. japonicum, especie bacteriana que infecta al frijol de soya pero no a otras especies de leguminosas. Más tarde Dazzo y Hubbell, de la Universidad de Florida, citado por Brill, ibidem encontraron otra proteína que parece tener la misma relación para el trébol y el R. trifolij, es decir, la bacteria que infecta la raíz-

FIGURA II.- Proceso de infección y desarrollo nodular en una raíz de frijol de soya (*Glycine max*). F. A. O., 1984.

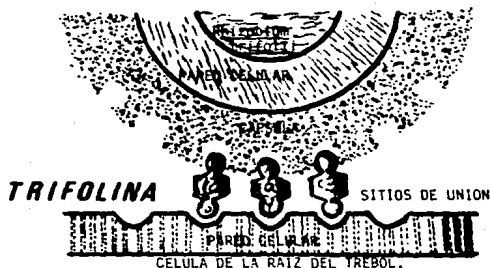




del trébol a la cual nombraron Trifolina.

Dazzo en el Centro de Estudios para la Fijación del Nitrógeno-- en la Universidad de Wisconsin, ha demostrado recientemente que la Trifolina se encuentra sobre la superficie de las raíces adventicias del trébol, que es el sitio inicial de la infección. (FIGURA III).

FIGURA III.



---

El reconocimiento de Rhizobium por una leguminosa, parece estar mediado a través de una proteína que une a la bacteria con la raíz adventicia. En el caso del trébol, esta proteína se llama "Trifolina". Los sitios de unión de ésta con la pared celular de la planta y la capsula bacteriana se relacionan antigénicamente. El sitio de unión de la bacteria se ha desarrollado por la imitación de las plantas; este mimetismo pudo destruir las defensas de la planta contra la invasión por organismos extraños.

---

Dazzo ha mostrado que la Trifolina se une a un polisacárido sobre la superficie del organismo infectante R. trifolii, pero no a los polisacáridos de la superficie de otras especies de Rhizobium.

Una hipótesis plausible derivada de estos experimentos es que la Trifolina actúa como un enlace entre la bacteria y la planta.

Estudios posteriores utilizando moléculas de anticuerpos marcados han dado información preliminar sobre los sitios donde la Trifolina se une a la raíz de la planta y a la superficie bacteriana. Los dos sitios de unión son antigénicamente parecidos, esto es, que tienen afinidad por las mismas moléculas de anticuerpos. El significado de esta similitud no se entiende todavía aunque se sabe de casos análogos. Por ejemplo, las superficies de algunas bacterias patógenas son estructuralmente similares a las superficies de las células de los mamíferos, Brill (1977).

e) Criterios considerados para la clasificación de Rhizobium.

El género Rhizobium está asociado con Agrobacterium y Chromobacterium en la familia Rhizobiaceae, dentro del orden Eubacteriales, Vincent (1974). Los rizobios son muy similares a Agrobacterium radiobacter, una bacteria que difiere de la bacteria de los nódulos de las raíces en ciertos rasgos menores de cultivo y en su incapacidad para infectar las raíces de las leguminosas. Los medios para diferenciar las especies de Rhizobium de las bacterias relacionadas son poco satisfactorias pues se basan en la capacidad de los organismos para nodular plantas experimentales.

La delimitación de un grupo microbiano con base en una relación ecológica particular no es satisfactoria, pues una bacteria que vive libre en el suelo usualmente no es examinada por su capacidad de infectar o nodular un hospedero dado más aún, un esquema de clasificación de este tipo es inadecuado, pues un aislamiento individual no puede incluir una especie del género Rhizobium, hasta que se haya probado su capacidad para nodular todas las especies de leguminosas.

No obstante, el significado agronómico de los rizobios estable

ce que debe desarrollarse algún sistema de diagnóstico útil, por -- pragmático que sea . Existen claras diferencias entre cepas de bacterias, de los nódulos de raíces, pero son raras las pruebas de laboratorio estándar para su diferenciación en especies. La separación en especies dentro del género está basada completamente, al menos en la actualidad, en la especificidad por el hospedero, pues las bacterias están limitadas en los grupos de plantas que infectan. La característica en la cual está basada la clasificación es la capacidad de un cultivo de Rhizobium para invadir las raíces de un número restringido de especies de plantas, además de la leguminosa de la cual se obtuvo el microorganismo. A causa del limitado número de hospederos se han establecido grupos llamados de "Inoculación cruzada".

Un grupo de inoculación cruzada se refiere a un conjunto de especies de leguminosas que desarrollan nódulos cuando se exponen a bacterias obtenidas de los nódulos de cualquier miembro de ese grupo particular de plantas. Consecuentemente, un solo grupo de inoculación incluye idealmente todas las especies de hospederos que son infectadas por una sola cepa bacteriana. Se han establecido más de 20 grupos de inoculación cruzada de los cuales solo 7 han resultado ser de importancia y no más de 6 se han delimitado lo suficiente para que la bacteria responsable logre la posición de especie. El esquema de clasificación que se ha aceptado, basado en los grupos de inoculación cruzada, se presenta en el ANEXO I. Sin embargo, muchas leguminosas de importancia agrícola, así como plantas no cultivadas, no son noduladas por bacterias de los 6 principales grupos. Lotus corniculatus (trébol pata de pajarero), Robinia pseudoacacia (acacia negra), Sesbania exaltata (cañamo sesbania) y otros, requieren de cepas bacterianas claramente diferentes, que no se ajustan dentro de la categoría establecida. Solo un pequeño porcentaje de las especies de leguminosas que se han reportado en la literatura botánica está incluido dentro de los 6 grupos de inoculación cruzada definidos.

Las 6 especies de Rhizobium no son completamente distintas. Por ejemplo, los grupos bacterianos de la soya y caupí, comúnmente considerados por separado, contienen muchas cepas bacterianas similares y los organismos aislados de los nódulos de la soya frecuente -

mente infectan caupies y viceversa. Estos resultados sugieren que al menos algunos de los rizobios de caupí pueden ser variedades de R. japonicum. Más aún, ciertas cepas de R. lupini poseen un grado de similitud con el tipo caupí-soya. Se puede hacer una distinción razonablemente entre los rizobios que pueden tener tiempo de generación de 2 a 4 hrs. y producir ácido en medios de cultivo, y aquellos con tiempo de generación comúnmente de 6 a 8 hrs. y que crean condiciones alcalinas en cultivo. El primer grupo incluye R. leguminosarum, R. meliloti, R. phaseoli y R. trifolii y el último incluye R. japonicum y R. lupini.

La validez del sistema de inoculación cruzada se ha puesto en discusión, ya que muchas leguminosas son noduladas por rizobios de otros grupos hospedero-bacteria. Las cepas bacterianas que invaden leguminosas fuera de su clase particular y plantas que son infectadas de este modo son ejemplos de un fenómeno denominado "Promiscuidad simbiótica". Ocasionalmente, un hospedero es infectado por microorganismos normalmente clasificados en un número determinado de diferentes grupos planta-bacteria. Las clases de inoculación cruzada no son por consiguiente, completamente adecuadas para la descripción de la capacidad de nodulación de muchos organismos. Los ejemplos de simbiosis fuera de las clases de inoculación cruzada establecidas son a menudo incapaces de fijar nitrógeno. Más aún, la importancia agrícola de éstos grupos aún permanece como un rasgo clave del sistema taxonómico establecido y, aunque se proponga un nuevo esquema se debe considerar el existente ya que es la base para la inoculación de leguminosas en la práctica agrícola. Alexander (1984).

La F. A. O. 1984, establece que el estudio de las respuestas de numerosas especies de leguminosas a diferentes cepas de Rhizobium ha sido amplio, habiéndose notado que ciertas plantas tienden a responder similarmente a cepas particulares de Rhizobium. En otras palabras, una cepa de Rhizobium que nódula y fija una gran cantidad de  $N_2$  en asociación con alguna especie puede entonces hacerlo en asociación con algunas otras. Esto debe ser verificado y las leguminosas que demuestren esta tendencia a responder similarmente a cepas particulares de Rhizobium son consideradas "Grupos efectivos".

Los grupos efectivos de especies de leguminosas aparecen en el ANEXO 2. Un inoculante puede ser preparado por un grupo efectivo completo de plantas, mejor que por especies de plantas individuales, F. A. O., (1984).

Un sistema de clasificación para las especies de Rhizobium basado en la Taxonomía Numérica ha sido desarrollado, y se presenta en la 9ª edición del Berge's (Manual para la determinación Bacteriológica), Krieg (1984).

Krieg establece que las clasificaciones previas de las bacterias que nodulan a las raíces de las leguminosas estuvieron basadas durante mucho tiempo en el concepto de grupos de inoculación cruzada bajo esta suposición las leguminosas caían dentro de un grupo de infección particular que era nodulado por una particular especie de Rhizobium. Con repetida evidencia de anomalías en torno a la infección cruzada y los diferentes grupos de plantas, esta clasificación ha perdido credibilidad gradualmente y actualmente ha sido reemplazada por una en la cual se toman en cuenta las más recientes informaciones basadas en técnicas destinadas a examinar amplias porciones del genoma bacteriano. Es muy posible que esta clasificación cambie gradualmente conforme se avance en el número de leguminosas y bacterias estudiadas. Actualmente únicamente el 8 o 9 % de las 14 000 o más especies de leguminosas conocidas han sido examinadas en cuanto a la nodulación, y menos del 0.5 % han sido relativamente estudiadas en cuanto a la relación simbiótica con los nódulos bacteroidales. La mayoría de las plantas examinadas son de uso agrícola y la gran reserva de leguminosas tropicales apenas empieza a ser estudiada.

Las diferentes características de las especies de Rhizobium consideradas en la clasificación por taxonomía numérica se presentan en el ANEXO 3

f) Tipos y distribución de nódulos.

Los nódulos efectivos son generalmente largos, presentan un fuerte color rojo y están distribuidos sobre las raíces primarias de la planta. El máximo desarrollo de los nódulos está determinado por el peso o volumen que normalmente presentan después del estado de -

floración. En contraste, los nódulos inefectivos son pequeños, numerosos y usualmente distribuidos en todo el sistema radical.

El pigmento rojo que da color a los nódulos (Leghemoglobina) es tá asociado con la fijación activa de  $N_2$ , no forma parte de la nitro genasa, enzima de la fijación de  $N_2$ , pero el control del oxígeno es necesario para la actividad de ésta. Algunos nódulos efectivos pueden ser negros debido a la presencia de melanina.

Cuando los nódulos envejecen la leghemoglobina se torna verde, y se desprenden. Un mismo nódulo efectivo puede mostrar coloraciones blanca, roja y verde simultaneamente durante el estado de crecimiento, esto indica respectivamente, áreas de crecimiento nodular, fijación activa de  $N_2$  y senescencia. Los nódulos inefectivos son blancos o verde claros y no cambian de color en ningún estado de desarrollo.

Cuando las leguminosas son fertilizadas con  $N_2$  los nódulos producidos por cepas efectivas de Rhizobium permanecen pequeños y exhiben las mismas características que los producidos por cepas inefectivas. Cuando el  $N_2$  del suelo se agota los nódulos usualmente vuelven a su tamaño y función normal, F. A. O., (1984).

En un nódulo se pueden diferenciar 4 zonas principales: el cortex, la zona meristemática, el sistema vascular y la zona bacteroidal.

La longevidad de un nódulo usualmente refleja el hábito de crecimiento del hospedero. Los nódulos de las leguminosas herbáceas son relativamente frágiles, y funcionan por un período de tiempo relativamente corto que comprende el desarrollo vegetativo de la planta, estos se pueden desprender por condiciones desfavorables de humedad, disminución de la fotosíntesis, y ataque por nemátodos, insectos u hongos. Las especies perenes pueden producir nuevos nódulos estacionalmente, aunque los nódulos persisten la mayoría de las veces por muchos años.

La necrosis de los nódulos comienza en el área más antigua de la zona bacteroidal. La autólisis empieza con la desintegración de las células del hospedero y el colapso de sus paredes, pero los restos de bacteroides desaparecen rápidamente, Vincent (1974).

g) Alternativas de uso para las Leguminosas.

Las plantas forrajeras tropicales son muy numerosas y permiten la creación de auténticos cultivos anuales o semiperenes y en todo caso la formación de praderas artificiales más o menos duraderas.

Algunas de ellas, a causa de su plasticidad, se han hecho cosmopolitas, pues el hombre las ha introducido en todos los continentes, han sido ensayadas en condiciones ecológicas muy diversas e incluso se ha procedido a su selección e hibridización en Estaciones Experimentales.

Otras son exclusivas de ciertas regiones o están adaptadas a condiciones extremas. De éste modo, gracias a tales especies, es posible planificar la producción de forraje con vistas a remediar sequías prolongadas o a revalorizar determinados suelos salinos, aluminosos o poco fértiles.

Finalmente, las hay que sirven para rehacer suelos empobrecidos bien protegiéndolos de la erosión, bien aportándoles notables cantidades de materias húmicas mediante sus productos de corte.

Como se puede observar, el ganadero, en una situación dada tendrá siempre a su disposición las plantas adaptadas a tal situación y susceptibles de permitirle mantener a su ganado durante todo el año.

Para asegurar este sustento es forzoso que el ganadero establezca praderas artificiales formadas por gramíneas y leguminosas, en asociación o en cultivo puro. De éste modo, revalorizará sus pastos y aumentará el peso vivo por Ha., sobre todo si utiliza, como se practica ahora en muchos lugares de la zona tropical, el sistema de rotación rápida. Al disponer de una reserva integrada por heno o ensilaje, quedará a cubierto de la subproducción de materias verdes en épocas de sequía. Havard (1979).

Las leguminosas pueden contribuir grandemente a la producción de pastos, al proveer forraje con alto contenido de proteína, especialmente durante la estación seca cuando la calidad de los pastos es pobre. Durante el crecimiento de las leguminosas se incorpora poco nitrógeno al suelo, sin embargo sobre el suelo hay aporte de éste -

elemento, principalmente por leguminosas que sufren defoliación, - las hojas verdes son entonces pisoteadas por los animales que pastorean, la orina de los animales que se alimentan de leguminosas y sus heces fecales contribuyen también significativamente, Whitney (1970).

Las leguminosas son las únicas plantas superiores que logran desarrollarse bien en un suelo que ha recibido materia orgánica bruta rica en celulosa. Esto se debe a que las bacterias nodulares de sus raíces fijan  $N_2$  atmosférico, por lo cual las leguminosas ya no dependen exclusivamente del  $N_2$  del suelo para satisfacer sus requerimientos nutritivos. Este  $N_2$  lo gana el suelo cuando se descomponen las sustancias ricas en carbohidratos, y la eficiente simbiosis que se realiza entre las bacterias y las leguminosas hace aumentar el contenido de éste elemento. Si existe suficiente  $N_2$  en el suelo las leguminosas lo utilizarán, pero habrá muy poca o ninguna formación de nódulos radiculares; éste hecho es de gran importancia, por que si se entierran las leguminosas con pocos nódulos en sus raíces el suelo recibirá muy poco  $N_2$  asimilable, Teuscher (1975).

Convendrá tomar en cuenta que casi las tres cuartas partes del  $N_2$  proteico que acumulan las leguminosas con ayuda de las bacterias nodulares, se almacena en el follaje, más no en las raíces. Si el follaje se corta para hacer heno y únicamente se entierran las raíces, puede haber una pérdida leve de  $N_2$  del suelo y no existir ganancia - después de todo. En condiciones normales y siempre que se entierre la planta total, el aumento en el contenido de  $N_2$  producido por una leguminosa se calcula en unos 112 Kg/Ha, pero en condiciones óptimas un suelo muy deficiente puede obtener hasta 450 Kg/Ha en forma de compuestos orgánicos y eventualmente  $NH_3$ , Teuscher, ibidem.

Los beneficios que obtienen las no leguminosas por su asociación con las leguminosas en suelos pobres en  $N_2$  (caso de la avena y guisantes), se debe a la excreción de éste elemento por las raíces de las leguminosas. Lipman, citado por Teuscher, 1975, pudo demostrar que la excreción de la raíz es la principal responsable del  $N_2$  presente en el suelo. Para ello trató arena pura de cuarzo con todos los nutrientes esenciales excepto  $N_2$ ; en una maceta pequeña sembró



avena y en otra de mayor tamaño, guisantes, colocando a continuación la maceta pequeña dentro de la grande. Como la maceta pequeña era porosa y dejaba pasar los solutos, la avena se desarrolló normalmente y al ser analizada se apreció en sus tejidos abundante  $N_2$ . Pero cuando el tiesto interior se cubrió con una capa impermeable de pintura, la avena creció muy pobremente y el análisis reveló que poseía muy poco  $N_2$ . El experimento de Lipman ha sido repetido por numerosos investigadores con resultados idénticos y con ello queda demostrado la conveniencia de sembrar simultáneamente leguminosas y no leguminosas cuando el suelo es deficiente en  $N_2$ .

Las leguminosas, tanto las que se cultivan por su semilla como las forrajeras, con muy importantes desde el punto de vista económico en el mercado debido a su alto contenido en proteínas, el cual varía en un rango de 17 a 40 %, Norman (1979).

Norman, *ibidem*, señala que en términos generales y a nivel mundial, las plantas contribuyen aproximadamente con el 70% y los animales con el 30% de requerimiento proteico de la población, pero en los países en desarrollo la proporción de proteína animal consumida puede ser menor al 10%. En éstos países generalmente, los cereales aportan el 68% del total de proteína vegetal consumida, los granos de leguminosas el 18.5% y las raíces, tubérculos, frutas y vegetales el 13.5% (las leguminosas como vegetales contribuyen sustancialmente en ésta proporción).

Las leguminosas forrajeras más ampliamente cultivadas en América Latina son el trébol y la alfalfa. No obstante hay otros grupos de leguminosas de pastoreo, de los cuales se tiene poca información agronómica. Nos referimos a Medicago, Onobrychis, Ornithopus (carretilas) y las famosas Adesmias de Uruguay y Argentina. La importancia de éstas y otras leguminosas nativas se desprende de un estudio sobre una pradera natural de Uruguay después de una sequía muy severa, Rosengurtt, 1946., citado por Alba (1971), Adesmia bicolor (babo sita) mostraba mucho vigor y mayor poder de recuperación ante el pastoreo abusivo de muchas de las gramíneas. Las peculiaridades de la pradera uruguaya se hacen también evidentes por la presencia en esas condiciones de una gramínea francamente tropical, Paspalum nota

tum y de otra típica de agostaderos desérticos, Andropogon saccharoides. En agostaderos del desierto se encuentran algunas leguminosas-arbustivas muy valiosas, tales como Acacia berlandieri (guajillo) y Calliandria criophylla.

En muchas praderas de los volcanes de Costa Rica y de Rio Grande Sul (Brasil) se encuentra Lotus corniculatus (cornesuelo), muy adaptada al pisoteo y con un consumo voluntario por el ganado no inferior al de la alfalfa.

Por cierto que muchos investigadores consideran que el consumo de alfalfa aunque muy bueno, es superado por varias leguminosas y algunas mezclas, las cuales son muy valiosas por combinar alta digestibilidad y mayor consumo. Alba (1971).

#### h) Métodos de inoculación.

En muchos suelos, las bacterias nodulares no son adecuadas ya sea en número o calidad. Bajo éstas condiciones se hace necesaria la inoculación de la semilla o del suelo con cultivos de rizobios altamente efectivos.

Las bacterias nodulares son cultivadas en el laboratorio y combinadas con un adecuado material de transporte, tal como turba, composta o barro filtrado, constituyendo así el "inoculante". El proceso por el cual se incorpora éste inoculante a la semilla o al suelo es llamado inoculación..

Los inoculantes de leguminosas son generalmente de dos tipos: aquellos destinados para su aplicación en semillas y aquellos destinados para su aplicación directamente en el suelo. Los inoculantes para semilla son los más comunes porque son de fácil aplicación y generalmente efectivos bajo condiciones normales. La aplicación de inoculantes directamente al suelo puede ser necesaria para obtener nodulación efectiva cuando se plantan semillas de leguminosas en seque, suelos altamente ácidos, calientes o bajo condiciones atmosféricas adversas, cuando las semillas son tratadas con sustancias químicas tóxicas para el rizobio o cuando el suelo alberga una gran co-

blación de Rhizobium altamente inefectivos.

La inoculación es necesaria cuando se introducen nuevos cultivos de leguminosas en áreas o regiones no cultivadas. La inoculación es a menudo benéfica cuando se desarrollan o introducen cultivos de leguminosas. no obstante éstas mismas especies pudieron haberse desarrollado anteriormente. La especificidad de Rhizobium por el hospedero es frecuentemente desarrollada por los nuevos cultivos o variedades de leguminosas.

Muchos suelos tienen cepas inefectivas de Rhizobium capaces de inducir la nodulación con otros hospederos. Bajo tales condiciones, un inóculo de cepas de Rhizobium competitivas y altamente efectivas debe ser incorporado para contrarrestar el efecto de los rizobios nativos.

Al formar un inoculante, los cultivos de Rhizobium que crecen en el laboratorio son mezclados con varias sustancias inertes, sólidos finamente pulverizados tales como turba, composta, barro filtrado, bagazo o algún otro medio de transporte adecuado. Esta formulación es usualmente aplicada a las semillas de leguminosas antes de que sean sembradas, desarrollándose entonces nódulos efectivos y las plantas tendrán un suplemento de  $N_2$  seguro. Un método alternativo es la aplicación del inoculante directamente al suelo. Esto es necesario bajo ciertas condiciones aunque puede resultar muy costoso. F. A. O., 1984.

3.- Antecedentes. Trabajos previos efectuados en el área de estudio.

De la C. 1982, encontró que el control en el desarrollo de los microorganismos está en relación a la disminución e inhibición de la producción de los nódulos y las micorrizas, puesto que al agregar diferentes concentraciones de fósforo (P) y nitrógeno ( $N_2$ ) la inhibición se da gradualmente y en relación a la concentración..

La formación de la simbiosis hongo-raíz es del tipo ectomicorrizico (vescículo-arbuscular). A pesar de ésto el área de Taxhimay posee un suelo con microorganismos endémicos los cuales, con técnicas adecuadas de mutación pueden ser provechosos para la mayor producción de maíz y frijol reduciendose el costo por concepto de fertilizantes.

Benitez (1982), realizó estudios en invernadero inoculando cultivos de alfalfa con cepas bacterianas clasificadas y nativas (testigos). Las cepas de laboratorio no tuvieron ninguna influencia sobre el rendimiento de la alfalfa dado que no tuvieron buen desarrollo en talla y peso, así como baja nodulación.

Los cultivos testigo, tuvieron resultados semejantes a los de las cepas clasificadas, encontrandose nodulación en las plantas, lo que hace evidente la existencia de bacterias fijadoras de  $N_2$  en el área de estudio.

En 1983, Rodríguez evaluó la fertilidad de un suelo cultivado bajo condiciones de invernadero, empleando la relación simbiótica - Rhizobium-Leguminosa y fertilizante químico. Encontró que no hay diferencia significativa entre la aplicación de bacterias fijadoras de  $N_2$  y fertilizante, sin embargo por la economía del uso de inoculantes, es posible usuarios como alternativa para sustituir o complementar el suministro de  $N_2$  en el suelo.

Romero, 1983, probó el efecto que tiene un plaguicida (Mala -- thión) en la formación de nódulos de Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum observando que se ve favorecido principalmente en la etapa -

de floración, pero también en la fase vegetativa, de acuerdo a la comparación de los datos que obtuvo en los diferentes tratamientos, - la nódulación disminuye pero no se inhibe.

De acuerdo al análisis estadístico, concluyó que el pesticida - Malathión afecta de un 40 a un 50 % la formación de nódulos en la raíz de Pisum sativum.

González y Urrieta, iniciaron estudios tendientes a mejorar la calidad de los pastos de la región de San Luis Taxhimay Edo. de México. Sobre ésta línea han efectuado algunos trabajos:

En 1985, efectuaron un estudio de campo en donde se observó la distribución y abundancia de las 3 principales familias características de un pastizal: Gramíneas, Leguminosas y Compuestas. Así como el efecto de las condiciones edáficas sobre su establecimiento.

Encontraron que existe una relación pronunciada entre las leguminosas y las gramíneas, además de una competencia entre éstas últimas con las compuestas. Macroptilium gibbosifolium fué la especie más abundante y su presencia no se ve limitada por las condiciones del suelo, por el contrario una especie de la subfamilia Mimosidae - prefiere condiciones del suelo con textura de migajón arcilloso y su presencia es mayor en zonas cultivadas.

Las propiedades del suelo cuantificadas (APENDICE 2), no presentan diferencias significativas por lo que éstas no son un factor limitante en el establecimiento de las especies vegetales y en particular de las leguminosas.

En 1986, evaluaron la fijación de  $N_2$  en tres cepas nativas de Rhizobium sp asociadas a dos leguminosas silvestres: Prosopis sp y Crotalaria rotundifolia, y Medicago sativa (alfalfa). El estudio se efectuó bajo condiciones de invernadero.

Se encontró que las 3 cepas de Rhizobium sp estudiadas no son específicas para las especies de leguminosas consideradas presentan algunas asociaciones efectivas y con aporte de  $N_2$  al suelo, sobresale Prosopis sp - Rhizobium aislado de Medicago sativa.

Parte fundamental de éste trabajo fueron las pruebas de coloración (indicadores: rojo congo y azul de bromocresol) y microscópicas con las cuales se infirió que las cepas estudiadas pertenecen al género Rhizobium.

Así mismo, en 1986 efectuaron un estudio bibliográfico sobre la distribución, explotación y legislación de pastizales en la República Mexicana.

Encontraron que aproximadamente hay 85.7 Ha de pastizal en la República Mexicana, Rzedowski (1978). El cual puede ser de diferente índole de acuerdo a su origen: natural o inducido, el número de especies que lo constituyen es muy amplio y su potencial de uso es limitado. Lo anterior debería permitir que se llevara un uso intensivo de éste para obtener un máximo de aprovechamiento.

En la realidad esto no sucede y nos enfrentamos a un gran número de incongruencias. México posee una de las mejores legislaciones agropecuarias del mundo, con Secretarías de Estado encargadas de salvaguardarlas, tales como la de la Reforma Agraria y la de Agricultura de Recursos Hidráulicos. La última tiene una estructura bien definida con Organos encargados de la conservación, uso y distribución de los recursos naturales de que se valen los sectores productivos.

Se concluyó que en México existe un serio problema, "el burocratismo" que sumado al "compadrazgo", falta de comunicación entre quienes deberían de estar informados y la falta de responsabilidad a nivel individual como de Organismo Público ocasionan que los beneficios de las leyes y reglamentos no lleguen a su objetivo final que es precisamente el sector productivo, con el consiguiente retraso en el desarrollo del País.

## II.- HIPOTESIS

Mediante el establecimiento de grupos de Rhizobium-Leguminosas silvestres agrupados entre sí, se encontrará una asociación en la cual la fijación biológica de Nitrógeno sea óptima.

### III.- OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el  $N_2$  aportado por las diferentes asociaciones Rhizobium-Leguminosa silvestres procedentes de un pastizal inducido de San Luis-Taxhimay, Edo. de México, bajo condiciones de invernadero.

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Evaluar la infectividad, la especificidad y la efectividad de las diferentes cepas de Rhizobium con las diferentes especies de leguminosas silvestres consideradas.
- 2.- Determinar la cantidad de Nitrógeno en hojas y tallos de las leguminosas de cada asociación simbiótica estudiada.
- 3.- Proponer con base a la información obtenida la posible alternativa de uso de cada asociación estudiada.



#### IV.- DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.

##### a) Localización.

La región se ha delimitado como un rectángulo entre las coordenadas 19° 51' 25" de latitud norte y los 99° 23' 45" de longitud oeste, dentro de ésta se encuentra un área de pastizal situada al norte de la Presa y del poblado de San Luis Loma Alta y S. Luis Taxhimay, Edo. de México. Aquí se ubica la zona de estudio del presente trabajo, Carta Geológica, DETENAL, SPP. (MAPA 1).

##### b) Clima.

En base a la clasificación climática dada por Köppen, modificada por García, 1964, la región de San Luis Taxhimay, Edo. de México, tiene un clima C (W<sub>1</sub>)(w) bg; templado subhúmedo con lluvias en verano con una temperatura media anual de entre 12 y 18° C, un porcentaje de lluvias invernales menor del 5% anual. Las temperaturas del mes más caliente y frío se encuentran entre los 22 y 6.5° C respectivamente. La precipitación media anual es de 790.9 mm, la altitud aproximada es de 2220 msnm.

##### c) Suelo.

Se observa predominio de vertisol Pélico asociado con Feozem húmico, sobre el litosol. En términos generales son suelos someros y muy pesados (arcillosos), limitados por un estrato endurecido y presentan cierta pedregosidad. Al oeste de la Presa se localizan zonas con erosión hídrica bien representada.

##### d) Geología.

El tipo de roca que se encuentre en el área es mayormente sedimentaria del tipo conglomerado, aunque también se presenta roca ígnea del tipo de la andesita.

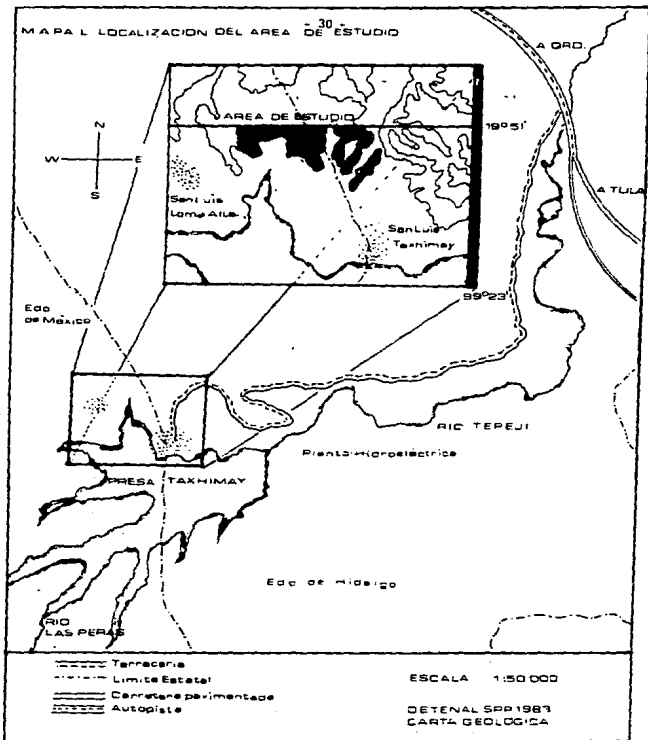
##### e) Uso del suelo.

Hacia la parte norte de la Presa se encuentran localizados los-

poblados de Loma Alta y San Luis Taxhimay, el uso del suelo está destinado principalmente a cultivos de temporal permanente anual (Atpa) con erosión hídrica moderada y fuerte (Eh m- f). Bordeando a la presa en la parte sur y suroeste se encuentran zonas de bosque natural de latifoliadas (Quercus sp) y pastizal inducido. Entretanto que en la zona este encontramos el mismo tipo de vegetación asociado con vegetación secundaria de chaparral (Acacia sp).

Al oeste de la Presa en las partes bajas, se localizan zonas con una erosión hídrica fuerte en las que se presenta pastizal inducido y agricultura de temporal permanente anual, con una pequeña zona provista de riego.

Alejándose en dirección este de la presa, se encuentran fajas de vegetación secundaria de chaparral con bosque natural de encino alternándose con fajas de pastizal inducido.



## V.- METODOLOGIA

### 1.- Trabajo de campo.

Se llevaron a cabo salidas a campo de forma regular cada mes durante un año, en el área de pastizal ya señalada, con la finalidad de observar los cambios en la estructura y fisonomía de la cubierta vegetal, el ciclo de vida de las leguminosas, así como efectuar colectas de:

- \* Ejemplares de leguminosas.- Los cuales fueron colectados y prensados para su posterior identificación en el Herbario, para su montaje y para mostrarlos en su momento a las personas del lugar y averiguar si estas plantas tienen propiedades forrajeras.
- \* Semillas de leguminosas.- Las vainas de las leguminosas fueron transportadas en papel secante al laboratorio en donde se extrajeron las semillas y se colocaron en bolsas de papel encerado, eliminando las parasitadas o dañadas, formandose el Banco de semillas.
- \* Nódulos radiculares de leguminosas.- Se extrajeron las plantas con la mayor precaución, se eliminó la mayor cantidad de suelo y los nódulos fueron colocados en frascos debidamente etiquetados y conteniendo una solución salina al 5% lo que permitió conservarlos hasta su posterior manejo en el laboratorio.
- \* Colecta de suelo.- Se transportaron aproximadamente 100 Kg. de suelo de la zona de estudio para el establecimiento de las unidades experimentales. El suelo fué obtenido de los mismos puntos de muestreo realizados en los trabajos previos a éste. González y Urrieta (1985-86). En los cuales se analizó física y químicamente las condiciones del suelo (APENDICE 2).

### 2.- Trabajo de laboratorio.

- a) Aislamiento, purificación y conservación de cepas de Rhizobium sp. a partir de nódulos radiculares colectados en campo, Vincent (1975).

Se utilizaron dos técnicas bacteriológicas fundamentales:

- \* Esterilización de los medios de cultivo y material de vidrio por medio de presión de vapor en autoclave (15 atm./15 ').

- Exclusion de contaminantes al efectuar cultivos, subcultivos y otras operaciones.

Una vez levadas las raíces con agua, se extrajeron los nódulos esterilizándolos con cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) al 0.1% ligeramente acidulado con 5 ml. de ácido clorhídrico concentrado (HCl), durante 2 a 5 min. según el tamaño de los nódulos. Posteriormente se lavaron con agua destilada varias veces y se maceraron en un vidrio de reloj. A partir de éste macerado se prepararon varias diluciones en tubos - de ensayo estériles. (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000), tomando con el asa bacteriológica una muestra y sembrándola en medio de cultivo por el método de estries. El medio de cultivo se preparó de acuerdo a la fórmula dada a continuación. Vincent(1975):

#### CALDO DE LEVADURA - MANITOL.

$K_2HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10.0 g
Agua de levadura	100.0 cc
Agua destilada	900.0 cc
Agar bacteriológico	20.0 g
Colorante	Como colorante selectivo para estas bacterias se utilizó Rojo Congo, agregando 10 cc de una solución acuosa de 1/400 esterilizada por separado, a cada litro de medio de cultivo.

Para la purificación se efectuaron múltiples subcultivos hasta obtener a Erizobium sp libre de contaminantes.

Para su conservación se utilizaron medios de agar inclinado entubos de ensaye, que son los más adecuados para el manejo de la bacteria, conservados a bajas temperaturas (2°C), lo que permite almacenarlos por tiempo indefinido, con intervalos de resiembra de 4 a 6 meses recomendándose un intervalo aproximado de 3 1/2 meses, para que las colonias permanezcan en óptimas condiciones.

b) Determinación de las cepas.

Este apartado se refiere a las pruebas de laboratorio que se llevaron a cabo para comprobar de forma cualitativa que las bacterias aisladas pertenecen al género Rhizobium. Entre las que se encuentran:

- Técnica de Gram
  - Morfología
  - Forma y consistencia de las colonias
  - Desarrollo en el medio de cultivo.
- (ANEXO 4)

c) Desarrollo del experimento.

• Planteamiento del diseño experimental.

Para el cumplimiento de los objetivos, fué planteado un diseño bifactorial de clasificación doble con muestras compuestas (FIGURA IV).

• Establecimiento de los lotes y unidades experimentales.

• Preparación del suelo.

El suelo colectado en campo se esterilizó utilizando calor húmedo a 15 atm. durante 3 hrs. Vincent, 1975. Después fué colocado en bolsas de polietileno negro con capacidad de 1 Kg. cada una. Al conjunto de repeticiones se les colocó en un microinvernadero (FIGURA V), montado dentro del Invernadero de la Institución.

• Preparación de plántulas.

Los géneros de leguminosas elegidos para el trabajo experi-

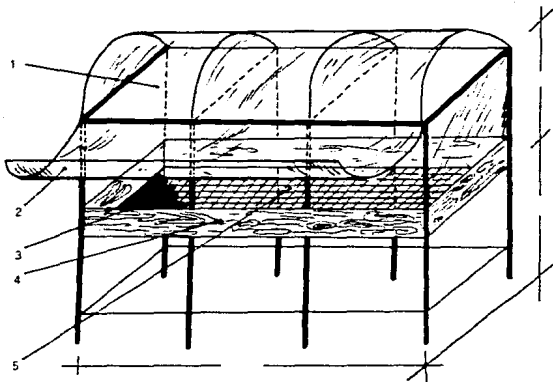
FIGURA IV.- Diseño experimental. Muestra la combinación de las leguminosas y las cepas de Rhizobium obtenidas de éstas.

LEGUMINOSAS		A	B	C	D	E	F
		CEPAS					
1		A1	B1	C1	D1	E1	F1
2		A2	B2	C2	D2	E2	F2
3		A3	B3	C3	D3	E3	F3
4		A4	B4	C4	D4	E4	F4
5		A5	B5	C5	D5	E5	F5
6		A6	B6	C6	D6	E6	F6
7		A7	B7	C7	D7	E7	F7

Especificaciones del Diseño Experimental.

- a.- Cada unidad experimental tuvo 3 repeticiones.
- b.- El lote N°. siete es testigo por lo cual no se realizó la inoculación de ninguna leguminosa.
- c.- Donde:
- |   |                               |                                   |     |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-----|
| 1 | Representa la cepa aislada de | <u>Lupinus sp.</u>                | (A) |
| 2 | " " " "                       | <u>Cologetia bronssonetii</u>     | (B) |
| 3 | " " " "                       | <u>Crotalaria rotundifolia</u>    | (C) |
| 4 | " " " "                       | <u>Medicago polymorpha</u>        | (D) |
| 5 | " " " "                       | <u>Macroptilium gibbosifolium</u> | (E) |
| 6 | " " " "                       | <u>Zornia thymifolia</u>          | (F) |

**FIG.V.- MICROINVERNADERO.**

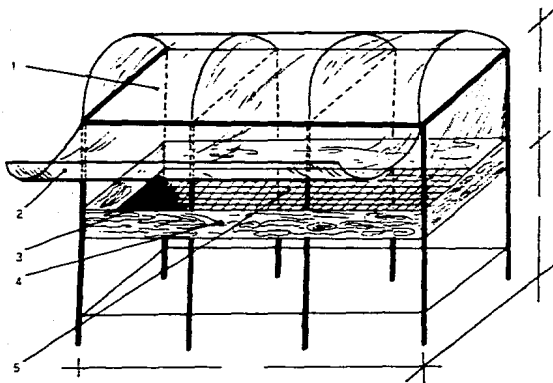


**DESCRIPCION:**

- 1.- Cubierta plástica transparente
- 2.- Cubierta plástica plegable
- 3.- Base de plástico negro (Cubre la totalidad del bancal)
- 4.- Bancal
- 5.- Area para la colocación de unidades experimentales.



**FIG.V.- MICROINVERNADERO.**



**DESCRIPCION:**

- 1.- Cubierta plástica transparente
- 2.- Cubierta plástica plegable
- 3.- Base de plástico negro (Cubre la totalidad del bancal)
- 4.- Bancal
- 5.- Area para la colocación de unidades experimentales.

mental son los siguientes:

- A.- Lupinus sp
- B.- Cologetia brunssonetii
- C.- Crotalaria rotundifolia
- D.- Medicago polymorpha
- E.- Macroptilium gibbosifolium
- F.- Zornia thymifolia

Estos géneros se eligieron en base a las siguientes consideraciones:

- + De acuerdo al total de géneros determinados y las cepas aisladas, se eligieron aquellos que se encontraban más alejados entre sí taxonómicamente (ANEXO 5) para obtener una mejor respuesta de las asociaciones consideradas en el diseño experimental, esto es, que al ser inoculadas las cepas aisladas de las leguminosas señaladas, permitan observar el grado de especificidad.
- + Por encuestas realizadas en campo, mediante las cuales, se recopiló información de los habitantes de la zona como una contribución para definir sus propiedades forrajeras.
- + Por los muestreos que se hicieron en campo a lo largo del período de trabajo, en donde se comprobó que las especies señaladas y el género Lupinus son los que tienen la más amplia distribución en el pastizal.

El porcentaje de germinación para las semillas de estas leguminosas fué bajo (5-10 %), por lo cual se trabajó con plántulas, obtenidas de la manera siguiente:

Se lavaron las semillas perfectamente con hipoclorito de calcio  $Ca(ClO)_2$  al 3% y se enjuagaron con agua estéril 3 veces. Se colocaron en grupos según el género, en cajas petri previamente esterilizadas, conteniendo algodón y papel filtro ligeramente húmedos. La siembra se llevó a cabo en condiciones estériles. Las cajas petri se colocaron en una estufa a 25°C hasta la germinación total.

Una vez obtenidas las plántulas y con el suelo de los cepellones a capacidad de campo, se procedió al trasplante de las mismas en cada unidad experimental según el diseño establecido (FIGURA IV). Dejando un lapso de 17 días para observar la sobrevivencia de las plántulas en las condiciones de microinvernadero, y de ser necesario hacer la sustitución de las plántulas.

④ Preparación del inoculante.

El inoculante se preparó usando un medio de cultivo líquido de levadura-manitol, cuya preparación es idéntica a la citada para la conservación de la bacteria, únicamente que en éste caso no se agrega agar bacteriológico ni colorante. En el inoculante así-preparado y en condiciones estériles se siembra la bacteria y se deja en incubación a 27 °C durante 3 días en agitación constante, hasta lograr la sobresaturación.

④ Inoculación.

Se adicionaron a cada una de las unidades experimentales 2 ml de medio de cultivo líquido sobresaturado estando el suelo a capacidad de campo. Se realizaron 3 inoculaciones a intervalos de 5 días, de acuerdo a lo especificado en el diseño experimental.

d) Observación de la nodulación.

Las raíces obtenidas de las plantas al final del período de experimentación se lavaron perfectamente con agua corriente, se observaron en el estereoscópio y se cuantificaron los nódulos de cada asociación Leguminosa-Rhizobium.

e) Determinación de Nitrógeno.

A intervalos de 45 días se tomaron muestras de suelo de cada unidad experimental a una profundidad de 3 cm, y de 5 g aproximadamente cada muestra. Los muestreos incluyeron, 1 inicial, 2 intermedios y 1 final a los 135 días.

Al final del período de experimentación se extrajeron las plantas de cada unidad experimental, se trasladaron al laboratorio. Tallos y hojas se colocaron en papel secante.

Tanto las muestras de suelo como los tallos y hojas, perfectamente deshidratados, se maceraron para la determinación por triplicado de nitrógeno total por el Método MicroKjeldhal, Grande, 1974 (ANEXO 6).

VI.- RESULTADOS Y ANALISIS

a) Ejemplares de leguminosas.

Las leguminosas que se encuentran en la LISTA A, son las -  
muestreadas en el área específica de trabajo. Hay ejemplares no de-  
terminados debido a que en el momento de la colecta no se encontra-  
ron con los órganos florales necesarios, unos por inmaduros y o -  
tros por haber sido dañados por el ganado.

---

LISTA A.- Ejemplares de leguminosas colectadas en campo durante el pe-  
riodo de estudio y determinadas en el Herbario del Institu-  
to de Biología de la U. N. A. M.

---

LETRA

NOMBRE CIENTIFICO

a	<u>Cologania angustifolia</u> . Kunth var. angustifolia.
b	<u>Cologania bronssonetii</u> . (Balb) Dc.
c	<u>Brongniartia intermedia</u> . Moric.
d	No determinada.
e	<u>Cologania biloba</u> (Lindl)
f	No determinada.
g	<u>Desmodium sp</u>
h	<u>Zornia thymifolia</u> HBK
i	<u>Astragalus oxyrrhynchus</u> . Henise.
j	<u>Medicago polymorpha</u> . var. vulgaris (benth) Shimers.
k	<u>Trifolium amabile</u> . HBK
l	No determinada.
m	<u>Dalea redinata</u> (Cov) Willd.
n	No determinada.
o	<u>Crotalaria sp</u>

---

LISTA A. Continuación.

---

LETRA	NOMBRE CIENTIFICO
p	<u>Dalea sp</u>
q	<u>Mimosa sp</u>
r	<u>Lupinus sp</u>
s	<u>Crotalaria rotundifolia.</u> var. vulgaris Windler.
t	<u>Macroptilium gibbosifolium.</u> (G.Ort.) (A. Delgado)
u	No determinada
v	<u>Crotalaria sp</u>
w	<u>Dalea sp</u>
x	<u>Coloqania sp</u>
y	<u>Calliandra reticulata</u> Gray.

Determinadas por el Dr. Alfonso Delgado, jefe del Herbario del Instituto de Biología de la U. N. A. M.

---

Los parámetros físicos y químicos del suelo del área de trabajo no influyen en el establecimiento de las leguminosas. González y Urrutieta (1985), APENDICE 2. Es importante considerar que el pastizal estudiado es inducido, en él se han originado una gran cantidad de alteraciones antropógenas, entre las cuales son fundamentales la agricultura y la ganadería. En el área de estudio se encontraron varias parcelas en las cuales se intentó practicar la agricultura, sin embargo, fueron abandonadas dadas las características impropias del suelo, en donde es determinante la textura (MIGAJON ARCILLOSO Y ARCILLAS). Puesto que los terrenos fueron abandonados, se propició el desarrollo de géneros de leguminosas sin competencia con otras especies del pastizal, son ejemplos Macroptilium gibbosifolium y Lupinus sp.

Se localizaron zonas de intenso pastoreo dada la gran cantidad de excretas de ganado ovino y caprino. Esto trae como consecuencia - que las leguminosas se restringan sólo a ciertas zonas, sobre todo a aquellos potreros en descanso, aquí predominan los géneros Crotalaria - Dalea y Cologania.

b) Banco de semillas.

El banco de semillas que aparece en la LISTA B, se formó a lo largo de las colectas realizadas en campo, aún así no fué posible - formar un banco en que estuvieran incluidos todos los géneros colectados. Cabe destacar que se observaron daños en las semillas en alto grado, tanto por insectos como por el ganado.

---

LISTA B.- Banco de semillas de leguminosas colectadas durante el período de estudio. (Clave establecida por los autores)

---

CLAVE	NOMBRE CIENTIFICO
SLA	<u>Astragalus oxyrrhynchus</u> . Henise.
SLC1	<u>Calliandra reticulata</u> Gray
SLC3	<u>Cologania bronssonetii</u> . (Balb) Dc.
SLC4	<u>Cologania sp</u>
SLCr1	<u>Crotalaria sp</u>
SLCr2	<u>Crotalaria sp</u>
SLCr3	<u>Crotalaria rotundifolia</u>
SLD1	<u>Dalea redinata</u> (Cov) Willd.
SLD2	<u>Dalea sp</u>
SLD3	<u>Dalea sp</u>
SLL	<u>Lupinus sp</u>
SLMa	<u>Macroptilium gibbosifolium</u> . (G. Ort) (A. Delgado)
SLMe	<u>Medicago polymorpha</u> . var. <u>vulgaris</u> (Benth) Shmers.

---

LISTA B.- Continuación.

---

SLMi	<u>Mimosa</u> sp
SLND1	No determinada
SLND5	No determinada
SLT	<u>Trifolium amabile</u> HBK
SLZ	<u>Zornia thymifolia</u> HBK

---

c) Cepario.

Algunas leguminosas en el momento de la colecta no presentaron nódulos, por lo tanto no se incluyen en el cepario bacterias de todos los géneros. (LISTA C)

Para la confirmación de las especies de Rhizobium es necesario realizar una identificación meticulosa, que incluya pruebas de campo, bioquímicas, serológicas y de invernadero.

Las especies de Rhizobium que aparecen en la lista corresponden a la clasificación establecida por la F. A. O., 1984., de acuerdo a los denominados grupos efectivos de cultivos de leguminosas.

---

LISTA C.-Lista de bacterias de Rhizobium aisladas en el laboratorio de Edafología de la E. N. E. P. Zaragoza.

---

CLAVE	LEGUMINOSA DE LA QUE FUE AISLADA	ESPECIE DE <u>RHIZOBIUM</u>
ENEPZ-RI	<u>Astragalus oxyrhynchus</u> . Henese.	<u>R. spp</u> ( <u>Astragalus</u> sp)



## LISTA C.- Continuación.

CLAVE	LEGUMINOSA DE LA QUE FUE AISLADA	ESPECIE DE RHIZOBIUM
ENEPZ-RI	<u>Brongniartia intermedia</u> . Moric.	<u>Rhizobium sp</u>
ENEPZ-RE	<u>Cologania biloba</u> (Lindl)	<u>Rhizobium sp</u>
ENEPZ-RO	<u>Crotalaria sp</u>	<u>R. spp</u> (Tipo del Caupi)
ENEPZ-RV	<u>Crotalaria sp</u>	<u>R. spp</u> (Tipo del Caupi)
ENEPZ-RS	<u>Crotalaria rotundifolia</u> var. vulgaris Windler.	<u>R. spp</u> (Tipo del Caupi)
ENEPZ-RM	<u>Dalea redinata</u> (Cov) Willd.	<u>R. spp</u> (Varios)
ENEPZ-RP	<u>Dalea sp</u>	<u>R. spp</u> (Varios)
ENEPZ-RW	<u>Dalea sp</u>	
ENEPZ-RG	<u>Desmodium sp</u>	<u>Rhizobium sp</u>
ENEPZ-RR	<u>Lupinus sp</u>	<u>R. lupini</u>
ENEPZ-RT	<u>Macroptilium gibbosifolium</u> (G. Ort.) (A. Delgado)	<u>R. spp</u> (Tipo del Caupi)
ENEPZ-RJ	<u>Medicago polymorpha</u> , var. vul- garis (Benth) Shimers	<u>R. meliloti</u>
ENEPZ-RF	No determinada.	
ENEPZ-RL	No determinada.	
ENEPZ-RK	<u>Trifolium amabile</u> HBK	<u>R. trifolii</u>
ENEPZ-RH	<u>Zornia thymifolia</u> HBK	<u>Rhizobium sp</u>

Es necesario hacer notar que una vez obtenidas las cepas de Rhizobium, éstas no pudieron ser ubicadas en ninguna de las clasificaciones taxonómicas propuestas en la revisión bibliográfica; básicamente por las características mismas de cada clasificación y por la respuesta que se obtuvo de las cepas experimentales (infectividad y especificidad). Sin embargo, por lo observado en campo; coloración, forma, número y tamaño de los nódulos, es muy posible que las cepas aisladas en el laboratorio correspondan a las especies establecidas en la Clasificación por Grupos Efectivos.

d) Nodulación.

La cantidad de nódulos obtenida es baja (1 - 9 nódulos /planta), dichos nódulos no tuvieron el desarrollo esperado, en su mayoría fueron de color blanco, pequeños y por consiguiente inefectivos. Los factores edáficos no son impedimento en campo y no debieron serlo en el invernadero para el desarrollo de Rhizobium.

Se efectuó el análisis de varianza correspondiente para comprobar la infectividad y especificidad de las cepas de Rhizobium. La estimación de las varianzas muestra significancia para las variedades- [Fc-5.3B/Ft(1%)/5.36], más no para los tratamientos y la interacción de ambos.

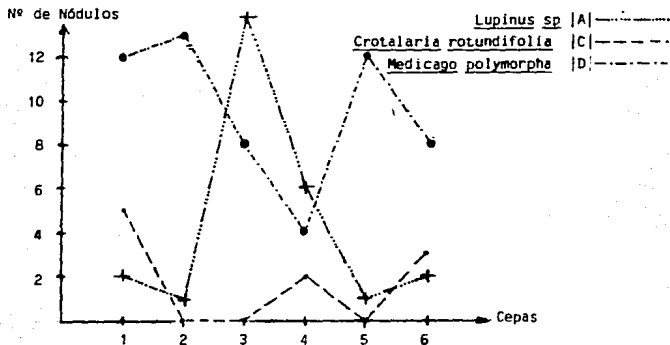
En base a la prueba de Duncan, se tiene que Medicago polimorpha (variedad D) determina la significancia, por consiguiente y dado que no hay efecto de los tratamientos (cepas bacterianas), es posible que M. polimorpha ejerza una mayor atracción bioquímica por las cepas rizobianas y por lo tanto se puede considerar que las cepas estudiadas no están del todo diferenciadas en especies taxonómicas.

Por los resultados obtenidos en la prueba de Duncan, no se puede plantear la especificidad entre las cepas estudiadas, debido a que no se encontró ninguna que halla nodulado únicamente a la leguminosa de la cual fué aislada.

La GRAFICA I, presenta la baja nodulación observada en Lupinus sp (A) y Crotalaria rotundifolia (C). Únicamente la asociación A-3 no sigue esta tendencia, lo que se debe posiblemente a la atracción bioquímica de Lupinus sp por la cepa 3 aislada de C. rotundifolia. Este comportamiento no significa que exista especificidad de la bacteria hacia la leguminosa y viceversa, ya que la especificidad se refiere a la capacidad que tiene la bacteria para nodular a la leguminosa de la cual fué aislada y no a otra. Lo anterior explica que la asociación A-3 tenga la mayor significancia en la prueba de Duncan.

En la GRAFICA I se observa el comportamiento con tendencia más homogénea y valores más altos en la nodulación de M. polimorpha (D) como variedad y no como asociación.

GRAFICA I.-Número de nódulos por asociación Bacteria-Leguminosa cuantificados al final del período de experimentación, a los 135 días.



De existir especificidad de la leguminosas y las cepas estudiadas los picos maximos de nodulación en la GRAFICA I, hubieran correspondido a las asociaciones A- 1, C-3 y D-4.

El análisis previo permite afirmar que no se presentó nodulación efectiva en ninguna de las asociaciones simbióticas propuestas, por lo que no se puede establecer que halla existido un aporte de  $N_2$  al suelo vía fijación biológica.

e) Porcentaje de Nitrógeno en el suelo.

El diseño experimental (FIGURA IV) contempla inicialmente el empleo de 6 géneros diferentes de leguminosas, sin embargo esto no fué posible debido a dos razones fundamentales:

- \* Las semillas de Macroptilium gibbosifolium (E) y Zornia thymifolia (F) presentaron problemas de germinación, aún empleando métodos de preacondicionamiento. Dado que todos los lotes de semillas fueron puestas a germinar al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, llegó el momento en que se tuvieron que trasplantar a los cepellones las plántulas de los 4 géneros en que sí hubo germinación, quedando fuera los géneros ya mencionados.
- \* Cologania bronssonetii (B) presentó daños severos por hongos durante el período de experimentación, como se observa en los datos de las TABLAS XI a XIII (ANEXO 7) los resultados para el género B (C. bronssonetii) desaparecen paulatinamente por la muerte de los ejemplares. Por ello no se consideran en el análisis estadístico.

De éste modo, el diseño experimental quedó conformado por 6 cepas de Rhizobium:

- 1.- aislada de Lupinus sp
- 2.- " " Cologania bronssonetii
- 3.- " " Crotalaria rotundifolia
- 4.- " " Medicago polymorpha
- 5.- " " Macroptilium gibbosifolium
- 6.- " " Zornia thymifolia

Y tres géneros de Leguminosas:

- A.- Lupinus sp
- C.- Crotalaria rotundifolia
- D.- Medicago polymorpha

A pesar de que la esterilización del suelo, disminuye el  $N_2$  total debido a la hidrólisis que sufre la materia orgánica y la consiguiente volatilización del  $N_2$  disponible en forma de amonio ( $NH_4^+$ ), - González y Urrieta, 1986, los lotes experimentales presentan concentraciones de  $N_2$  total del orden de 0.13 a 0.52 % lo cual, y de acuerdo a la clasificación propuesta por el Dpto. de Suelos del I. N. I.- A. , 1970 (ANEXO 8), los hace de rico a extremadamente rico. Este hecho determina la baja nodulación que se presentó en todos los lotes experimentales, Alexander, 1984., Berkun and Bohlool, 1980., F.- A. D., 1984.

Las variaciones en la concentración de  $N_2$  de los lotes experimentales, depende básicamente del metabolismo de las leguminosas. La estimación de las varianzas para la pérdida de  $N_2$  en el suelo señala significancia para las variedades [Fc-6.26/Ft(1%)-5.39], no habiendo efecto de los tratamiento ni de la interacción de ambos.

La prueba de Duncan señala que la variedad D (Medicago polymorpha), extrae más  $N_2$  del suelo .

C-4 (Crotalaria rotundifolia-Rhizobium aislado de Medicago polymorpha) aparece con alta significancia, como caso aislado. esto se explica porque dentro del lote experimental es la única asociación - que presenta un buen desarrollo foliar (TABLA XXII), por lo cual - requirió más  $N_2$  del suelo.

M. polymorpha es por consiguiente el género que más asimiló el  $N_2$  del suelo debido básicamente a sus características fisiológicas y metabólicas, pudiendo asimilar  $N_2$  amoniacal ( $NH_3$ ), ya que está probado que el  $NH_3$  puede ser usado directamente por las plantas sin que sea necesario la nitrificación; esta forma de  $N_2$  se encuentra normalmente en el suelo en reducida cantidad, pero su proporción aumenta - en circunstancias agronomicas desfavorables (mala estructura, exceso de humedad o de acidez), así pues la aptitud de una absorción preferente de  $NH_3$  dependerá del metabolismo de la planta, de su edad y de las condiciones del medio (pH), Gaucher, 1971.

La GRAFICA II representa la pérdida de  $N_2$  en el suelo. La asociación A -6 (Lupinus sp - Rhizobium aislado de Zornia thymifolia) -

TABLA XXII.- Longitud de las plantas (en centímetros) medidas al final del período experimental, 135 días.

A1a	9.0	C1a	18.0	D1a	28.0
A1b	8.5	C1b	9.0	D1b	20.5
A1c	8.5	C1c	14.5	D1c	44.0
A2a	12.0	C2a	22.0	D2a	28.0
A2b	12.5	C2b	12.0	D2b	25.0
A2c	14.4	C2c	10.0	D2c	20.0
A3a	8.5	C3a	--	D3a	24.0
A3b	12.5	C3b	--	D3b	21.5
A3c	10.0	C3c	29.0	D3c	32.5
A4a	9.0	C4a	15.0	D4a	50.0
A4b	11.0	C4b	27.5	D4b	34.0
A4c	7.0	C4c	26.0	D4c	38.5
A5a	8.5	C5a	22.0	D5a	35.0
A5b	12.5	C5b	--	D5b	38.5
A5c	7.0	C5c	--	D5c	35.0
A6a	10.0	C6a	14.0	D6a	23.0
A6b	12.0	C6b	13.0	D6b	47.0
A6c	5.5	C6c	25.0	D6c	29.0

muestra un comportamiento no homogéneo, aporta  $N_2$  al suelo a causa de la defoliación de ésta unidad experimental ocasionada por un severo ataque de ácaros. El  $N_2$  proveniente del follaje fué por lo tanto cuantificado con el  $N_2$  del suelo.

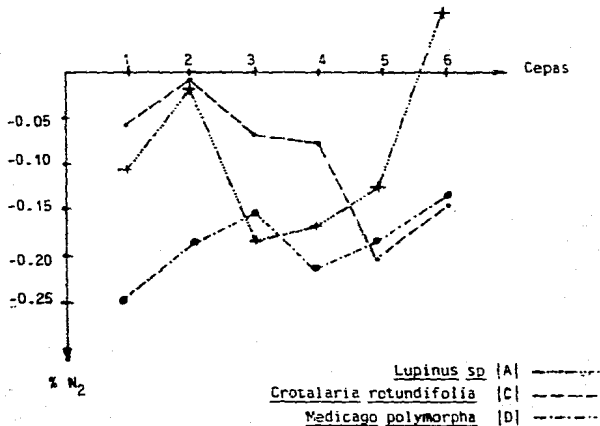
Medicago polymorpha tiene un comportamiento más homogéneo en relación a las otras especies, además de que la pérdida de  $N_2$  del suelo

es evidentemente mayor.

Las asociaciones no siguen una tendencia que permita relacionar las, porque como se estableció no hay ninguna significancia para los tratamientos.

La pérdida de  $N_2$  en el suelo se determinó por la diferencia de los valores para el análisis inicial y final. La varianza en éste caso, no incluye los testigos (lote 7) ya que en su mayoría éstas unidades experimentales se perdieron. Estadísticamente no es posible recuperar un número excesivo de datos.

GRAFICA II.- Pérdida de Nitrógeno del suelo por asociación Bacteria-Leguminosa.

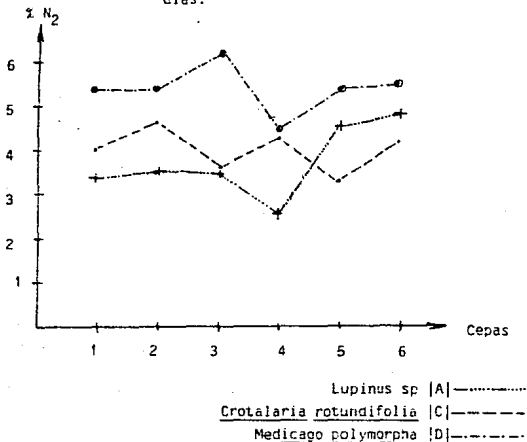


f) Porcentaje de Nitrógeno en tallos y hojas.

La estimación de las varianzas presenta una alta significancia, la cual es ejercida por las variedades no habiendo ninguna para los tratamientos o la interacción de ambos [Fc=11.39/Ft(1%)=5.42].

Mediante la prueba de Duncan se establece que el género Medicago polymorpha (D) ejerce la significancia, es decir que éste género acumula una mayor cantidad de  $N_2$  en tallos y hojas a diferencia de Lupinus sp y Crotalaria rotundifolia. El comportamiento señalado se observa detalladamente en la GRAFICA III, en donde además se aprecia una tendencia semejante en el proceso de acumulación de  $N_2$  para los 3 géneros, aunque no en la misma proporción.

GRAFICA III.- Porcentaje de Nitrógeno en tallos y hojas, determinado al final del período de experimentación, a los 135 días.





De acuerdo al análisis para la pérdida de  $N_2$  en el suelo y su acumulación en tallos y hojas, se estima que hay una relación directa entre ambas variables. Se considera directa por que en los 3 géneros estudiados la pérdida de  $N_2$  en el suelo es compensada por su acumulación en tallos y hojas, en estos términos la relación sigue el orden: Medicago polymorpha-Lupinus sp-Crotalaria rotundifolia.

La varianza para la acumulación de  $N_2$  en tallos y hojas no muestra diferencias cuando en el análisis se incluyeron los testigos -  $|Fc-14.81/Ft(1\%)/5.31|$ . Este comportamiento, sumado a que no se presentó nodulación efectiva, hace más evidente la posibilidad ya planteada, de que el  $N_2$  presente en las partes aéreas de las leguminosas estudiadas es función únicamente de su metabolismo.

g) Calidad de las Leguminosas.

La siguiente tabla, muestra los porcentajes de nutrimentos digeribles totales en la alfalfa (Medicago sativa). En g/100 de alfalfa-seca al aire, Alba (1971).

---

Proteínas	10.60
Grasas	1.44
Fibra	12.47
Extracto no nitrogenado	25.85
Total	50.36

---

Para estimar el contenido de proteína cruda de una muestra, se multiplica el valor de  $N_2$  por 6.25, al cual se le llama factor de  $N_2$  y significa que cada unidad de  $N_2$  está contenida en 6.25 unidades de proteína. Sosa, 1981. De éste modo se puede transformar los valores de  $N_2$  experimentales a por ciento de proteína, obteniéndose los siguientes resultados:

<u>Lupinus sp</u>	21.68
<u>Crotalaria rotundifolia</u>	24.09
<u>Medicago polymorpha</u>	43.00

APENDICE I :

Este análisis permite establecer que los 3 géneros estudiados - tienen mayor proporción de proteína con respecto a Medicago sativa; - lo que sumado a las entrevistas realizadas con 3 personas de la comunidad acerca de la palatabilidad, posible toxicidad y el interés por la propagación de las especies de leguminosas colectadas, permite - proponer usos concretos para los 3 géneros considerados.

Lupinus sp puede ser empleado como abono verde más no como forraje, ya que se ha comprobado que algunas especies de éste género son tóxicas. Stamm, 1979. C. rotundifolia y M. polymorpha pueden ser usadas como abono verde o como forraje dado que son apetecibles por el ganado en la zona de trabajo. Sin embargo M. polymorpha presenta la ventaja de tener un ciclo de vida más corto en relación a los otros 2 géneros. Este género completó su ciclo de vida a los 90 días de experimentación, mientras que Lupinus sp y C. rotundifolia aún habiendo terminado el período experimental a los 135 días, no presentan indicios de floración.

De éste modo M. polymorpha es la especie más recomendada para su posible incorporación en un sistema de apropiación intensivo.

## VII.- CONCLUSIONES

- a) De 25 Géneros de leguminosas silvestres colectadas en campo, fueron determinados 20. Se obtuvo un Banco de semillas de 18 géneros y un Ceparío con 17 cepas de Rhizobium.
- b) A pesar de la baja nodulación (1 - 9), y dado que no se presentaron nódulos en los Testigos experimentales, se considera que las cepas de Rhizobium estudiadas son INFECTIVAS. Presentando significancia Medicago polymorpha |Fc-5.38/Ft(1%)-5.36|.
- c) Debido a que no se encontró ninguna bacteria que halla nodulado únicamente a la leguminosa de la cual fué aislada, se considera que las cepas de Rhizobium estudiadas no son ESPECIFICAS.
- d) No se presentó nodulación efectiva en ninguna de las asociaciones simbióticas propuestas, por lo tanto no se presentó aporte de N<sub>2</sub> al suelo vía fijación biológica. Las cepas de Rhizobium son INEFECTIVAS.
- e) Medicago polymorpha extrae significativamente más N<sub>2</sub> del suelo |Fc-6.26/Ft(1%)-5.39|. De la misma manera es el género que acumula más N<sub>2</sub> en tallos y hojas (3.64 - 7.70%) con respecto a Crotalaria rotundifolia (2.24 - 4.92%) y Lupinus sp (0.19 - 8.12%).
- f) Las dos especies, C. rotundifolia y M. polymorpha así como el género Lupinus sp son susceptibles de uso agropecuario, ya sea como abono verde y/c forraje. Por sus características (ciclo de vida corto, palatabilidad, calidad), M. polymorpha es la especie más recomendada para su incorporación en un sistema de uso intensivo.

IX.- ANEXOS

1.- Grupos de inoculación cruzada y asociaciones de Rhizobium - Leguminosa, Alexander, 1984.

Grupo de inoculación cruzada	Especies de <u>Rhizobium</u>	Género hospedero	Leguminosas incluidas
De la alfalfa	<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago</u> <u>Melilotus</u>	Alfalfa Trébol dulce
Del trébol	<u>R. trifolii</u>	<u>Trigonella</u> <u>Trifolium</u>	Ajbolva Tréboles
Del chícharo	<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pasum</u> <u>Vicia</u> <u>Lathyrus</u> <u>Lens</u>	Chícharo Algarroba Almorta Lenteja
Del frijol	<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus</u>	Frijol
Del altramuз	<u>R. lupini</u>	<u>Lupinus</u> <u>Ornithopus</u>	Altramuз Serradela o pie de pájaro.
DE la soya	<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine</u>	Soya
Del caupí	-----	<u>Vigna</u> <u>Lespedeza</u>	Caupí Trébol del J.

---

Grupo de inoculación cruzada	Especies de <u>Rhizobium</u>	Género hospedero	Leguminosas incluidas
		<u>Crotalaria</u>	Crotalaria
		<u>Pueraria</u>	Kudzu
		<u>Arachis</u>	Cacahuate
		<u>Phaseolus</u>	Frijol lima.

---

- 
- 2.- Grupos efectivos de cultivos de leguminosas.  
Leguminosas que tienden a responder simiilarmente cuando son inoculadas con la misma cepa de Rhizobium.
- 

F. A. O. 1984.

---

<u>Especies de Rhizobium</u>	Grupos Efectivos	Especies de Leguminosas.
<u>R. meliloti</u>	1	<u>Medicago sativa</u> , <u>M. falcata</u> , <u>M. minima</u> , <u>M. tribuloides</u> , <u>Melilotus denticulata</u> , <u>M. alba</u> , <u>M. officinalis</u> , <u>M. indica</u> .
	2	<u>Medicago arabica</u> , <u>M. hispida</u> , <u>M. lupulina</u> , <u>M. orbicularis</u> , <u>M. scutellata</u> , <u>M. polymorpha</u> , <u>M. rotata</u> , <u>M. rigidula</u> , <u>Trigonella foenum-graecum</u> .
	3	<u>Medicago laciniata</u>
	4	<u>Medicago rugosa</u>
<u>R. trifoli</u>	5	<u>Trifolium incarnatum</u> , <u>I. subterraneum</u> , <u>I. alexandrinum</u> , <u>I. hirtum</u> , <u>I. arvense</u> , <u>I. angustifolium</u> .
	6	<u>Trifolium pratense</u> , <u>I. repens</u> , <u>I. hybridum</u> , <u>I. fragiferum</u> , <u>I. procumbens</u> , <u>I. nigrescens</u> , <u>I. glomeratum</u> .

Especies de <u>Rhizobium</u>	Grupos Efectivos	Especies de Leguminosas.
	7	<u>Trifolium vesiculosum</u> , <u>T. berytheum</u> , <u>T. bocconeii</u> , <u>T. boissieri</u> , <u>T. leucanthum</u> .
	8	<u>Trifolium ruepellianum</u> , <u>T. tembense</u> , <u>T. usamarense</u> , <u>T. africanum</u> , <u>T. pseudostriatum</u> .
	9	<u>Trifolium semipilosum</u> , <u>T. maseiense</u> , <u>T. ruepellianum</u> .
	10	<u>T. medium</u> , <u>T. sarosiense</u> , <u>T. alpes</u>
	11	<u>T. ambiguum</u>
	12	<u>T. heldreichianum</u>
	13	<u>T. masalense</u>
	14	<u>T. reflexum</u>
	15	<u>T. rubens</u>
	16	<u>T. semipilosum</u>
<u>R. leguminosarum</u>	17	<u>Pisum sativum</u> , <u>Vicia villosa</u> , <u>V. hirsuta</u> , <u>V. faba</u> , <u>V. tenuifolia</u> , <u>V. tetrasperma</u> , <u>Lens sculenta</u> , <u>Lathyrus aphaca</u> , <u>L. cicera</u> , <u>L. hirsutus</u> , <u>L. sylvestris</u> .

Especies de <u>Rhizobium</u>	Grupos efectivos	Especies de Leguminosas
	18	<u>Lathyrus ochrus</u> , <u>L. tuberosus</u> , <u>L. szenitzii</u> .
	19	<u>Lathyrus sativus</u> , <u>L. clymenum</u> , <u>L. tingitanus</u> .
	20	<u>Vicia faba</u> , <u>V. narbonensis</u> .
	21	<u>Vicia sativa</u> , <u>V. amphicarpa</u> .
<u>R. phaseoli</u>	22	<u>Phaseolus vulgaris</u> , <u>P. coccinetus</u> , <u>P. angustifolius</u> .
<u>R. Lupini</u>	23	<u>Lupinus alba</u> , <u>L. albiifrons</u> , <u>L. albus</u> , <u>L. angustifolius</u> , <u>L.</u> <u>arboreus</u> , <u>L. argenteus</u> , <u>L. bentonia</u>
	24	<u>Lupinus densiflorus</u> , <u>L. vallicola</u> .
	25	<u>Lupinus nanus</u> .
	26	<u>L. polyphyllus</u> .
	27	<u>L. subcarinosus</u> .
	28	<u>L. succulentus</u> .
<u>R. japonicum</u>	29	<u>Glycine max.</u>
<u>Rhizobium spp.</u> (grupo del caupi)	30	<u>Vigna unguiculata</u> , <u>V. sesquipedalis</u> , <u>V. luteola</u> , <u>V. cylindrica</u> .



---

Especies de <u>Rhizobium</u>	Grupos Efectivos	Especies de Leguminosas
		<u>V. angularis</u> , <u>V. radiata</u> , <u>V. mungo</u> , <u>Desmodium</u> sp., <u>Alysicarpus</u> <u>vacina-</u> <u>lis</u> , <u>Crotalaria</u> sp., <u>Macroptilium</u> - <u>lathiroides</u> , <u>M. gibbosifolium</u> , - <u>Pseudocarpus</u> sp.
	31	<u>Phaseolus</u> <u>limensis</u> , <u>P. lunatus</u> , <u>P.</u> <u>lunatus</u> , <u>P. aconitifolius</u> , <u>Canava-</u> <u>lia ensiformis</u> , <u>C. lineata</u> .
	32	<u>Arachis</u> <u>hypogaea</u> , <u>A. globrata</u> , <u>Cya-</u> <u>mopsis tetragonoloba</u> , <u>Lespedeza</u> <u>se-</u> <u>ricea</u> , <u>L. japonica</u> , <u>L. bicolor</u> .
	33	<u>Centrosema</u> <u>pubescens</u> , <u>Galactia</u> sp.
	34	<u>Lotononis</u> <u>bainesii</u> .
	35	<u>Lotononis</u> <u>angolensis</u> .
<u>Rhizobium</u> spp (lotus)	36	<u>Lotus</u> <u>corniculatus</u> , <u>L. tenuis</u> , <u>L.</u> <u>angustissimus</u> , <u>L. tetragonolobus</u> , <u>L. creticus</u> , <u>L. edulis</u> , <u>L. frondo-</u> <u>sus</u> , <u>L. subpinnatus</u> , <u>L. welleri</u> , <u>Dorvenium</u> <u>hirsutum</u> , <u>D. rectum</u> , <u>D.</u> <u>suffructicosum</u> , <u>Anthyllis</u> <u>vulnera-</u> <u>ria</u> , <u>A. lotoides</u> .
	37	<u>Lotus</u> <u>uliginosus</u> , <u>L. americanus</u> , <u>L.</u> <u>scoparius</u> , <u>L. strictus</u> , <u>L. strigosus</u> , <u>Ornithopus</u> <u>sativus</u> , <u>Lupinus</u> <u>angusti-</u> <u>folius</u> , <u>L. albus</u> , <u>L. luteus</u> .

Especies de <u>Rhizobium</u>	Grupos Efectivos	Especies de Leguminosas
<u>Rhizobium spp</u> Coronilla, Petalostemon-Ono- brychis	38  38	<u>Coronilla varia</u> , <u>Onobrychis viciifolia</u> , <u>Petalostemon purpureum</u> , <u>P. candidum</u> , <u>P. microphyllum</u> , <u>P. multiflorus</u> , <u>P. villosum</u> , <u>Leucaena leucocephala</u> , <u>L. retusa</u> .
<u>Rhizobium spp</u> (varios)	39 40 41 42 43	<u>Dalea alopecuroides</u> . <u>Strophostyles helvola</u> . <u>Robinia pseudoacacia</u> , <u>R. hispida</u> . <u>Amorpha canescens</u> . <u>Caragana arborescens</u> , <u>C. frutescens</u> .
<u>Rhizobium spp</u> <u>Astragalus sp</u>	44	<u>A. cicer</u> , <u>A. falcatus</u> , <u>A. canadensis</u> , <u>A. mexicanus</u> , <u>A. orbiculatus</u> .

NOTA ACLARATORIA.- Todos los nombres bajo el rubro "Especies de Leguminosas" son nombres científicos.

---

3.- Características diferenciales del género Rhizobium según la clasificación por Taxonomía numérica.

---

Bergey's. Manual of systematic Bacteriology. Vol I. Krieg, N. R., 1984.

a.- Características para diferenciar a los géneros: Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacterium, Phyllobacterium, Pseudomonas.

- \* Arreglo de los flagelos
  - Monotricos
  - lofotricos
  - peritricos
- \* Producción de nódulos radicuales.
- \* Producción de nódulos en lashojas.
- \* Grado de actividad de la nitrogenasa.
- \* Producción de 3-Ketolactosa.
- \* Rapidez de crecimiento sobre medio YMA.
- \* Reacción alcalina en medio dulce.
- \* Producción de H<sub>2</sub>S.
- \* Respuesta a la biotina.
- \* Producción de beta-2 glucano en goma extracelular.
- \* Mol % G + C de ADN.

b).- Características para diferenciar Rhizobium leguminosarum, R. meliloti y R. loti.

- \* Arreglo de los flagelos
  - Monotricos
  - Peritricos
- \* Aglutinación con antisueros.

- \* Crecimiento en presencia de NaCl al 2 %.
- \* Crecimiento a 39 - 40 °C.
- \* Requerimiento de Tiamina.
- \* Requerimiento de pentofenato.
- \* Precipitado sobre medio de Ca-glicerofosfato.
- \* Reacción ácida en "leche de tornasol".

c).- Otras características de Rhizobium leguminosarum, R. meliloti, R. loti.

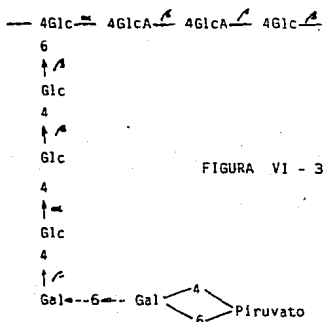
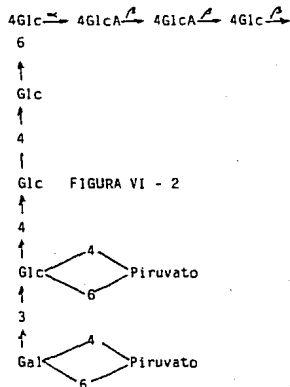
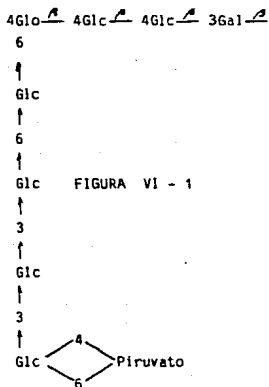
- \* Rapidez de crecimiento en medio de cultivo de extracto de levadura-manitol-agar.
- \* Producción de ácido en medio simple.
- \* Producción de Penicilinas.
- \* Respuesta a la biotina.
- \* Requerimiento externo de niacina, pirodoxina, ácido p-aminobenzoico, inositol, B<sub>12</sub> y riboflavina.
- \* Utilización de glucosa, galactosa, fructuosa, arabinosa, maltosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa, manitol, fumarato, citrato y piruvato.
- \* Habilidad para crecer en medios salinos básicos contienen do sacarosa y arabinosa en presencia de:
  - 20 mM de citrato.
  - 20 mM de piruvato.
  - 20 mM de lactato.
  - 20 mM de Glioxilato.
- \* Utilización de dextrina.
- \* Utilización dulcitol.
- \* Crecimiento a pH 3.5 - 9.5.
- \* Actividad con fosfatasa alcalina.

d).- Composición de polisacáridos extracelulares de R. leguminosarum y R. meliloti.

- \* Heteropolisacárido ácido:
  - Estructura tipo 1
  - Estructura tipo 2

- Estructura tipo 3 (FIGURA VI)

- \* Presencia de ácido glucurónico
- \* Presencia de Melilato (azúcar)
- \* Glucanos neutrales (-1,2; -1,3; -1,2)



---

4.- Técnicas para la determinación de Rhizobium.

---

a) Coloración de Gram. Vincent, 1975.

La coloración de Gram puede aplicarse de varias maneras. El siguiente método, que incluye una modificación en la decoloración de alcohol da muy buenos resultados.

**Materiales:** Portaobjetos limpio, flameado y enfriado.

**Reactivos de Gram:**

**A. Solución cristal violeta**

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Etanol	100 cc
Agua destilada	400 cc

**B. Solución de yodo**

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 cc
Agua destilada	100 cc

**C. Alcohol (yodado)**

Solución de yodo (B)	5 cc
Etanol	95 cc

**D. Colorante de contraste**

2.5 % safranina en etanol	10 cc
Agua destilada	100 cc

**Procedimiento:**

- 1.-Preparar y fijar el frotis lo mismo que para coloración simple.
- 2.-Teñir con solución cristal violeta (A) durante un minuto.
- 3.-Enjuagar suavemente con agua y escurrir el exceso de ésta.

- 4.-Cubrir con solución yodada (B), escurrir, restituir el yodo y dejar actuar durante un minuto.
- 5.-Ecurrir la solución yodada y decolorar con alcohol yodado (C) durante cinco minutos.
- 6.-Lavar con agua y escurrir el exceso.
- 7.-Teñir con el colorante de contraste safranina (D) durante cinco minutos.
- 8.-Lavar con agua, eliminar el exceso y secar.
- 9.-Examinar directamente por inmersión en aceite . Las células gram positivas toman un color violeta oscuro; las gram negativas son de color rojo claro.

**Nota**

Los frotis muy densos suelen dar resultados no uniformes a causa de su decoloración irregular.

- b) Caracterización del crecimiento de Rhizobium. Somasegaran, P. Hoben, H., Halliday, J. 1981.

Las cepas de Rhizobium pueden describirse de acuerdo a su crecimiento tanto en medio líquido como en medio sólido. El tamaño, forma, color y textura de las colonias y la habilidad de alterar el pH del medio son características generalmente estables útiles para definir cepas o aislamientos. Se describe abajo la información típica para estas características cuando las cepas crecen en medios estándar de levadura-Manitol.

Forma: Comúnmente colonias redondas variando desde formas planas hasta convexas y a veces cónicas sobre superficie de agar. Cuando crecen subsuperficialmente dentro del agar, las colonias se presentan típicamente en forma de luna.

Color y textura: Las colonias pueden variar desde blanco opaco o lechoso hasta translúcida acuosa. El desarrollo colonial opaco comúnmente es firme con algo de goma, mientras que las colonias menos den

son a menudo gomosas y blandas. Las colonias pueden ser brillantes o mate, igualmente opacas o translúcidas, pero pueden desarrollar centros oscuros de marcados salientes con la edad. No son comunes - las colonias rojas o rosas (ej. Lotononis) y amarillas (ej. De Stylosanthes).

Grado de crecimiento: Generalmente 3-5 días (ej. Leucaena, Psoralea, Sesbania), 5-7 días (ej. Macroptilium, Desmodium, Galactia), 7-12 días (ej. algunas Stylosanthes, Lupinus) para lograr el tamaño máximo colonial sobre medios de agar o el crecimiento en medio líquido.- El tiempo real varía de acuerdo con la temperatura de incubación (6p 26 - 30°C), origen (cultivo o nódulo), aireación (en cultivo líquido) y composición del medio.

Tamaño: Cuando las colonias se encuentran bien separadas sobre placas de agar, varía desde 1 mm para muchas cepas de crecimiento lento (ej. Stylosanthes, Zornia, Aeschynomene, Lupinus) hasta 4-5 mm para cepas de crecimiento rápido (ej. Leucaena, Psoralea, Sesbania). En placas que están llenas de colonias éstas permanecen pequeñas y separadas pero se unen para confluir en un crecimiento colonial masivo.

Pruebas con colorantes: Rhizobium tiene tendencia a no absorber el rojo congo y permanecer blanco, opaco u ocasionalmente rosa. Los microorganismos contaminantes comúnmente se presentan de color rojo - oscuro. Esta no es una característica estable, sin embargo, depende de la concentración de rojo congo, edad del cultivo y si las placas fueron expuestas a la luz.

Placas con agar-levadura-manitol recién preparadas conteniendo azul de bromotimol tienen pH 6.8 y son verdes. Como características típicas, rizobia tropical de crecimiento lento produce álcali en este medio, tornando la coloración azul, mientras que rizobia templada de crecimiento rápido producen ácido, tornando el medio amarillo. - Los microorganismos que no concuerdan con lo anterior probablemente no son Rhizobium.



---

5.- Clasificación taxonómica de las Leguminosas.

---

Sanchez, 1978

FAMILIA: LEGUMINOSEAE.

SUBFAMILIA I:

Mimosoideae. GENEROS :

- 1.- Desmanthus
- 2.- Mimosa
- 3.- Prosopis
- 4.- Acacia
- 5.- Pithecolobium
- 6.- Calliandra

SUBFAMILIA II:

Caesalpinioideae

- 1.- Krameria
- 2.- Cassia
- 3.- Caesalpinia

SUBFAMILIA III:

Papilionoideae

- 1.- Zornia .....(\*)
- 2.- Desmodium
- 3.- Crotalaria .....(\*)
- 4.- Lupinus .....(\*)
- 5.- Melilotus
- 6.- Medicago .....(\*)
- 7.- Trifolium
- 8.- Centrosema
- 9.- Cologania .....(\*)
- 10.- Erythrina
- 11.- Canavalia
- 12.- Phaseolus
- 13.- Minkeliersia
- 14.- Vicia

- 15.- Lathyrus
- 16.- Mosackia
- 17.- Indigofera
- 20.- Dalea
- 21.- Eysenhardtia
- 22.- Brongniartia
- 23.- Astragalus
- 24.- Sesbania

(\*).- Géneros utilizados en el presente trabajo.

---

6.- Método Kjeldhal para determinación de Nitrógeno total.

---

a) Material y equipo:

- Equipo digestor y destilador Microkjeldhal LABCONCO- OHAIO. U.S.A.
- Matraces Microkjeldhal de 100 ml
- Bureta de 25 ml
- Papel filtro Whatman Nº 1 de 11 cm de diámetro
- Embudo de tallo largo de 7.5 cm de diámetro
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Papel aluminio
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos con nuez

b) Reactivos:

Mezcla de digestión. A 1 000 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro se agrega una mezcla catalizadora constituida por 5 g de selenio metálico y 32 g  $\text{CuSO}_4$  anhidro, mezclando perfectamente. Debe tenerse la precaución de no calentar ni destapar sin necesidad, debido a que el selenio es volátil y sumamente tóxico.

Hidróxido de sodio al 40%. Disolver 3 000 g de NaOH comercial en 4 500 ml de agua, agitando constantemente mientras se agrega con objeto de que no se forme una masa sólida en el fondo del recipiente.

Indicador. Disolver 1.0 g de verde de bromocresol y 0.2 g de rojo de metilo en 100 ml de alcohol étílico al 95%. Neutralizar ésta solución hasta color intermedio que es verde obscuro, pH = 4.

Ácido sulfúrico concentrado. Densidad = 1.87.

Ácido bórico al 20%. Pesar 20 g de ácido bórico, disolverlo y aforar a 1 000 ml.

Ácido sulfúrico 0.25 N (Teórico). 0.37. 0.20 N (Real).

c) Procedimiento:

Observaciones:

- 1.- Pesar (en balanza granataria para suelos y en balanza analitica para tejido vegetal y turba), la cantidad indicada de material para analizar.

Suelo ..... 0.2 g

(\*).....Tallo y hojas..... cantidades varias.

- 2.- Colocar la muestra en un papel filtro, envuelvala conveniente mente, y pásela a un matraz Mikrokjeldhal de 100 ml.

Se envuelve la muestra en papel filtro con objeto de evitar que se quede algo en las paredes del cuello del matraz.

- 3.- Agregue 5g (con una cucharita) de mezcla digestora, por medio de un embudo al matraz.

Es recomendable usar un embudo de tallo largo.

- 4.- Añadir 15ml de ácido sulfurico-concentrado desde el cuello del matraz de modo que las sales adheridas a las paredes sean arrastradas hacia el fondo.

- 5.- Arremoline suavemente con un movimiento rotatorio, con objeto de que el suelo y el ácido se mezcle completamente.

Tener la precaución de que no quede suelo en las paredes del matraz.

- 6.- Colocar el matraz en el digestor mikrokjeldhal, haciendo funcionar el extractor de gases.

Observar que el sistema de gases funcione bien, pues de lo contrario se corre el riesgo de que el  $SO_2$  y  $SO_3$  se acumulen en el laboratorio.

- 7.- Digerir a bajo calor.

Si se calienta demasiado al principio de la digestión, -

8.- Continuar hasta que se haya destruido completamente la materia orgánica, esto se lleva a cabo - despues de 3 hrs. para tejidos de plantas y para suelo. se observa por la aparición de un color pardo-gris transparente.

9.- Cierre la fuente de calor, saque el matraz e inmediatamente tape lo con papel aluminio. Deje en - friar hasta que pueda agregar agua sin riesgo de explosiones o proyecciones.

10.- Mientras el ácido sulfurico se - enfría coloque 25 ml de  $H_2SO_4$  y cuatro gotas de indicador verde de bromocresol-rojo de metilo, - dentro de un vaso de precipita - dos de 250 ml.

11.- Ponga en funcionamiento el micro destilador. Conecte las mangueras del sistema refrigerante, agregue agua destilada al baño y regule cuidadosamente la temperatura.

(\*).12.- Cuando el material del matraz se - ha enfriado, se agregan cuidado-

puede formarse espuma abundante. Pérdida de  $NH_3$  en forma de  $(NH_4)SO_4$ .

No es conveniente aplicar - más calor que el necesario - para mantener una ebullición lenta, porque pueden ocurrir cambios en la reacción del ácido con la materia orgánica antes que empiecen a desprenderse gases de  $SO_2$  y  $SO_3$ .

No agregue agua al  $H_2SO_4$  concentrado y caliente, hasta - que la solución esté lo bastante fría para formar un terron consolidado en el fondo del matraz.

No es preciso conocer la concentración exacta del  $H_2SO_4$ , debido a que el borato de amonio se titula posteriormente.

Si el sistema refrigerante - no se conecta puede perderse algo de  $N_2$  en forma de  $NH_3$ . Es necesario usar agua destilada para el baño porque de lo contrario se forman carbonatos difíciles de eliminar en el aparato.

Hay que agregar el agua lentamente porque la solución -

samente tantos ml. de agua como-- sean necesarios para aforar hasta 30 ml. de mezcla, agitando vigorosamente.

(\*)....13.- Vacíe con sumo cuidado la mezcla aforada, a través de la "Copa" superior del microdestilador, hasta que toda quede contenida en el depósito inmerso en el baño del aparato.

14.- Cuando la mezcla aforada esté en ebullición, agregue NaOH al 40% con el mayor cuidado, regulando su entrada al depósito con la llave de teflón correspondiente. Se agregará la cantidad de NaOH que sea necesario para que se de el vire de, verde agua a café muy intenso. Este cambio de coloración es muy notorio.

15.- Simultáneamente a los pasos 13 y 14 se deben mantener el vaso de precipitados que contiene ácido bórico y extremo inferior del refrigerante en contacto.

(\*)....16.- Incremente el calor en forma conveniente; hasta ebullición uniforme, y dejar hasta que se haya destilado aproximadamente 75 ml. observar que no se forme espuma; si esto sucediere la fuente de calor.

17.- Desconecte el tubo receptor del destilador, y cierre la fuente de calor. Deje el vaso de precipitados

se calentará si el agua se añade en forma brusca, pudiendo ocurrir explosiones.

El ácido y el NaOH se deben mezclar lentamente, ya que de lo contrario habrá desprendimiento de  $N_2$  en forma de amoniaco con las consiguientes pérdidas.

Si el tubo del refrigerante no esta inmerso en el ácido-bórico habra pérdidas de amonio.

La mayor parte de  $N_2$  se destila en los primeros minutos, pero se prolonga el tiempo de destilación para recobrar las últimas trazas de  $N_2$ .

Nunca cierre la fuente de calor antes de desconectar el tubo receptor del destilador.

- abajo del destilador para recoger - el goteo final. ya que algo de solución puede succionarse.
- 18.- Retire el vaso de precipitados y - titule la solución con ácido sulfúrico previamente valorado, hasta - que desaparezca el color azul. Una gota adicional cambia la solución a un color rosado.- El pH del punto final es 4.6.
- 19.- Incluya un blanco a través de to - do el procedimiento. Este indica la cantidad de -  $N_2$  que contienen los reactivos.

(\*)..... - Modificaciones efectuadas por los autores.

d) Cálculos:

$$\% \text{ de } N_2 = \frac{(T-B) 1.4 N}{S}$$

en donde :

T = ml. de ácido empleados en la titulación de la muestra.

B = ml. de ácido empleados en la titulación del blanco. (sin suelo).

N = Normalidad del ácido valorado.

S = Peso de la muestra en gramos.

e) Ecuaciones de las reacciones que se llevan a cabo en el Método Micro - kjeldhal. Hanis, 1970., citado por, Sosa 1981.

1.- Redox

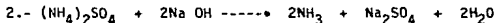
Oxidante fuerte  $H_2SO_4$

Sustancias Nitrogenadas

Orgánicas e Inorgánicas +  $2H_2SO_4$  -----  $CO_2 + SO_2 + (NH_4)_2SO_4 + H_2O$

Que es una digestión. Los compuestos que contienen carbono son

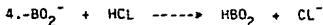
oxidados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y éste se reduce a  $\text{SO}_2$ , compuesto que reduce el  $\text{N}_2$  proveniente de compuestos orgánicos e inorgánicos a  $\text{NH}_3$ ; éste  $\text{NH}_3$  en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se transforma en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Esta reacción se efectúa en presencia de una mezcla catalizadora de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , compuesto que se emplea para incrementar el punto de ebullición del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  que acelera la reacción.



El  $\text{NH}_3$  obtenido que es un gas, se destila por arrastre de vapor y se recibe en una solución de  $\text{HBO}_2$ .



El  $\text{HBO}_2$  cede un proton al  $\text{NH}_3$  que es una base y se forma el ión amonio y el ión borato. En virtud de que por cada átomo de nitrógeno presente se forma un ión  $\text{BO}_2^-$ , este puede neutralizarse con una solución valorada de  $\text{HCl}$  y en forma indirecta conocer el  $\text{N}_2$ .



Cuando todo el  $\text{BO}_2^-$  ha sido neutralizado se termina la reacción-cuyo punto final es señalado por un indicador.



---

7.- Análisis estadístico general.

---

Generalidades sobre el Método Estadístico empleado.

La estimación biométrica de medias muestrales no se limita a la comparación entre dos muestras, cuyo comportamiento difiere a causa del efecto de un solo factor. Muy amenudo, en la experiencia biológica hay que trabajar con series de muchas variantes y se deben tomar en cuenta los efectos producidos por varios factores.

Al analizar estadísticamente casos de este tipo, fallan los métodos tradicionales, por dos razones:

- \* Un número creciente de variantes experimentales aumenta notablemente la cantidad de diferencias comparables entre las medias muestrales.

Teóricamente se podría pensar en un análisis biométrico mediante una serie de pruebas de  $t$ , realizadas una tras otra, cada vez con dos medias, en todos los apareamientos posibles; pero, con tal procedimiento se perdería mucho tiempo.

- \* Proceder de esta forma, no sería matemáticamente correcto. La prueba de  $t$  (Student) se ha desarrollado para comparar dos muestras de distribución normal, y representa el método más eficaz para este caso. Pero, al comparar varias medias muestrales entre sí, la prueba de  $t$  pierde mucho de su selectividad y no se puede emplear.

"Se aplica el análisis de varianza para comparar más de dos muestras de distribuciones normales".

El problema fundamental es el siguiente:

De una cantidad  $r$  de muestras (en distribución normal) resultan distintas medias. ¿ Hay diferencias significativas entre estas

medias muestrales?.

El análisis estadístico se realiza en dos pasos:

- \* Comparación de las desviaciones.
- \* Cálculo de las varianzas.

Hay dos tipos de desviaciones. Dentro de cada muestra, es decir, diferencias entre los datos particulares y su media correspondiente, estas diferencias son casuales y representan la variabilidad natural dentro de las muestras. Desviaciones entre las muestras, las cuales se manifiestan por las diferencias entre las medias muestrales. Para estas diferencias se repite la alternativa principal de la evaluación biométrica, es decir las diferencias pueden resultar casuales o significativas, esto último a causa del efecto de las condiciones experimentales.

Una vez determinadas las desviaciones, se pueden calcular las varianzas:

- \* Varianza entre las muestras ( $S_E^2$ ). Criterio para estimar las diferencias entre las muestras, a causa de las distintas condiciones del ensayo.
- \* Varianza dentro de las muestras ( $S_D^2$ ). Criterio para estimar la variabilidad natural del material experimental dentro de las muestras.

Se divide  $S_E^2$  entre  $S_D^2$ : el cociente forma el valor calculado de la función F (distribución de Fisher), "Fc". Se compara el valor de Fc con los valores de F obtenidos de tablas, teniendo en cuenta los grados de libertad, y el nivel deseado de significación. En conclusión:

- \* Si Fc es menor o igual que F de tablas, no hay diferencia significativa.
- \* Si Fc es mayor que F de tablas, hay diferencia significativa.

En el primer caso, el cálculo ha terminado. Se puede saber con este resultado que las medias muestrales no difieren estadísticamente entre sí y se puede adoptar la media total como valor representativo para el conjunto de todos los datos en cuestión.

La segunda alternativa sólo comprueba que se debe contar con diferencias significativas entre las medias muestrales, pero no dice cuántas son ni dónde se encuentran; es decir, entre cuáles de las distintas medias muestrales existen las diferencias significativas en cuestión.

Para averiguar este problema hay que comparar separadamente dichas medias muestrales entre sí. Las pruebas de Duncan y Tukey son adecuadas para tal efecto.

Existen diferentes tipos de Análisis de Varianza, de acuerdo a una serie de casos frecuentes. Estos se presentan a continuación:

\* Clasificación simple.

- i) Tamaño igual de muestras.
- ii) Tamaño desigual de muestras.

\* Clasificación doble.

- i) Muestras univalentes.
  - Diseño general.
  - Diseño en bloques al azar.
  - Cuadrados latinos.
  - Rectángulos latinos.
- ii) Muestras compuestas.
  - Diseño general.
  - Diseños bifactoriales.

\* Clasificación triple.

- Diseño general.
- Diseños trifactoriales.

El análisis de varianza en forma de diseños bifactoriales, se utilizan sobre todo, para evaluar:

- \* Datos de experiencias bifactoriales de cualquier tipo, cuando las muestras cuentan con  $\bar{a}$ s de un valor.
- \* Datos de experiencias bifactoriales sobre el rendimiento, en cultivos agrícolas, cuando las muestras están distribuidas en bloques - al azar, donde se produce solamente un valor de cada parcela parcial.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Nodulación por asociación Bacteria - Leguminosa.

TABLA I .- N°. de Nódulos desarrollados al final del tiempo experimental (135 días).

A1a	2	B1a	2	C1a	4	D1a	3
A1b	0	B1b	-	C1b	0	D1b	4
A1c	0	B1c	16	C1c	1	D1c	5
A2a	0	B2a	0	C2a	0	D2a	9
A2b	0	B2b	-	C2b	0	D2b	4
A2c	1	B2c	3	C2c	0	D2c	0
A3a	0	B3a	1	C3a	0	D3a	8
A3b	0	B3b	-	C3b	0	D3b	0
A3c	9	B3c	-	C3c	0	D3c	0
A4a	0	B4a	-	C4a	0	D4a	0
A4b	1	B4b	2	C4b	1	D4b	4
A4c	5	B4c	-	C4c	1	D4c	0
A5a	0	B5a	-	C5a	0	D5a	1
A5b	1	B5b	-	C5b	0	D5b	6
A5c	0	B5c	-	C5c	0	D5c	5
A6a	0	B6a	4	C6a	0	D6a	2
A6b	2	B6b	-	C6b	1	D6b	3
A6c	0	B6c	-	C6c	2	D6c	3

- Ejemplares perdidos.

TABLA II .- ANALISIS DE VARIANZA. Clasificación doble, muestras compuestas.

		T R A T A M I E N T O S						$\Sigma$
		1	2	3	4	5	6	
V A R I A B L E S	A	2	0	0	0	0	0	
		0	0	5	1	1	2	
		0	1	9	5	0	0	
		2	1	14	6	1	2	
	C	4	0	0	0	0	0	
		0	0	0	1	0	1	
		1	0	0	1	0	2	
	D	5	0	0	2	0	3	10
		3	9	8	0	1	2	
	4	4	0	4	6	3		
	5	0	0	0	5	3		
	$\Sigma$		12	13	8	4	12	8
		19	14	22	12	13	13	93

TABLA III .- Cuadrado de los datos particulares.

		T R A T A M I E N T O S						$\Sigma$	
		1	2	3	4	5	6		
V A R I E D A D E S	A	4	0	0	0	0	0		
		0	0	25	1	1	4		
		0	1	81	25	0	0		
	C	4	1	106	26	1	4	142	
		16	0	0	0	0	0		
		0	0	0	1	0	1		
		1	0	0	1	0	4		
		17	0	0	2	0	5		24
		9	81	64	0	1	4		
		16	16	0	16	36	9		
25	0	0	0	25	9				
50	97	64	16	62	22	310			
$\Sigma$		71	98	170	44	63	31	476.5	

TABLA IV .- Recopilación de las sumas.

		T R A T A M I E N T O S						$\sum t$	$\sum t^2$
		1	2	3	4	5	6		
x	A	2	1	14	6	1	2	26	676
	C	5	0	0	2	0	3	10	100
	D	12	13	8	4	12	8	57	3249
$\sum c$		19	14	22	12	13	13	93	4025
$\sum c^2$		361	196	494	144	169	169	1523	8649
$(\sum x)^2$	A	4	1	196	36	1	4	242	
	C	25	0	0	4	0	9	38	
	D	144	169	64	16	144	64	601	
$\sum$		173	170	260	56	145	77	981	

TABLA V .- Sumas de las desviaciones cuadradas.

VARIABILIDAD		S D C	VALDR
1	Tc	$\frac{8649}{54}$	160.16
2a	E	$\frac{881}{3} - 160.16$	133.5
2b		$\frac{4025}{18} - 169.16$	63.45
2c		$V \times Tr$	133.5 - (53.45+9.06)
3	R	316.34 - 133.5	182.84
4	T	476.5 - 160.16	316.34



TABLA VI .- Estimación de las varianzas.

VARIABILIDAD		S D C	gl	S <sup>2</sup>	Fc	Ft		sig
						5%	1%	
E	VAR	63.45	2	31.72	538	3.31	5.36	++
	TRAT	9.06	5	1.81	0.31	2.52	3.68	-
	VxT	60.99	10	6.09	1.03	2.15	2.96	-
R		182.84	31	5.89				
T		316.34	48					

TABLA VII .- PRUEBA DE DUNCAN. Medias muestrales.

VARIETADES	T R A T A M I E N T O S					
	1	2	3	4	5	6
A	0.66	0.33	4.66	2.00	0.33	0.66
C	1.66	0.00	0.00	0.66	0.00	1.00
D	4	4.33	2.66	1.33	4	2.66

TABLA VIII.- PRUEBA DE DUNCAN. Rp

$$\text{ERROR} = \frac{2.29}{3} = 0.87$$

Sx	0.87		gl	31
P	q		Rp	
	5%	1%	5%	1%
2	2.89	3.89	2.51	3.38
3	3.04	4.06	2.64	3.53
4	3.13	4.17	2.72	3.62
5	3.20	4.25	2.78	3.69
6	3.25	4.31	2.82	3.74
7	3.29	4.35	2.86	3.76
8	3.32	4.41	2.88	3.83
9	3.35	4.44	2.91	3.86
10	3.37	4.48	2.93	3.89
11	3.39	4.50	2.94	3.91
12	3.41	4.53	2.96	3.94
13	3.42	4.55	2.97	3.95
14	3.43	4.57	2.98	3.97
15	3.44	4.59	2.99	3.99
16	3.45	4.60	3.00	4.00
17	3.45	4.68	3.00	4.01
18	3.46	4.63	3.01	4.02



Porcentaje de Nitrógeno en suelo por asociación Bacteria - Leguminosa.

TABLA X .- Determinación inicial.

A1a	0.13	B1a	0.13	C1a	0.13	D1a	0.39
A1b	0.13	B1b	0.26	C1b	0.13	D1b	0.39
A1c	0.13	B1c	0.13	C1c	0.13	D1c	0.26
A2a	0.39	B2a	0.13	C2a	0.13	D2a	0.26
A2b	0.13	B2b	0.26	C2b	0.26	D2b	0.26
A2c	0.13	B2c	0.26	C2c	0.19	D2c	0.39
A3a	0.26	B3a	0.26	C3a	0.13	D3a	0.26
A3b	0.26	B3b	0.26	C3b	0.26	D3b	0.39
A3c	0.13	B3c	0.39	C3c	0.13	D3c	0.39
A4a	0.13	B4a	0.26	C4a	0.26	D4a	0.26
A4b	0.39	B4b	0.13	C4b	0.26	D4b	0.39
A4c	- -	B4c	0.26	C4c	0.39	D4c	0.39
A5a	0.13	B5a	0.26	C5a	0.26	D5a	0.39
A5b	0.13	B5b	0.26	C5b	0.26	D5b	0.39
A5c	0.39	B5c	0.26	C5c	0.26	D5c	0.34
A6a	0.26	B6a	0.13	C6a	0.26	D6a	0.41
A6b	0.26	B6b	0.26	C6b	0.39	D6b	0.39
A6c	0.26	B6c	0.39	C6c	0.39	D6c	0.26
A7a	0.13	B7a	- -	C7a	0.39	D7a	0.26
A7b	0.13	B7b	- -	C7b	0.39	D7b	0.52
A7c	0.26	B7c	- -	C7c	0.39	D7c	0.26

TABLA XI .- Primera determinación experimental de  $N_2$ , después de los primeros 45 días, en suelo.

A1a	0.28	B1a	0.28	C1a	0.26	D1a	0.26
A1b	0.28	B1b	0.23	C1b	0.26	D1b	0.34
A1c	0.28	B1c	0.15	C1c	0.26	D1c	0.26
A2a	0.15	B2a	0.15	C2a	0.41	D2a	0.26
A2b	0.28	B2b	0.25	C2b	0.39	D2b	0.34
A2c	0.28	B2c	0.15	C2c	0.34	D2c	0.39
A3a	0.41	B3a	0.23	C3a	0.26	D3a	0.26
A3b	0.28	B3b	0.15	C3b	0.34	D3b	0.64
A3c	0.15	B3c	0.15	C3c	0.26	D3c	0.44
A4a	0.28	B4a	0.28	C4a	0.26	D4a	0.39
A4b	0.28	B4b	0.23	C4b	0.26	D4b	0.39
A4c	0.28	B4c	0.15	C4c	0.26	D4c	0.13
A5a	0.28	B5a	0.28	C5a	0.21	D5a	0.39
A5b	0.28	B5b	0.28	C5b	0.18	D5b	0.39
A5c	0.15	B5c	0.28	C5c	0.26	D5c	0.39
A6a	0.15	B6a	0.21	C6a	0.26	D6a	0.39
A6b	0.15	B6b	0.26	C6b	0.34	D6b	0.39
A6c	0.15	B6c	0.13	C6c	0.34	D6c	0.34
A7a	0.15	B7a	0.13	C7a	0.34	D7a	0.39
A7b	0.23	B7b	0.26	C7b	0.34	D7b	0.39
A7c	0.28	B7c	0.26	C7c	0.18	D7c	0.64

TABLA XII .- Segunda determinación experimental de N<sub>2</sub> en suelo, realizada a los 90 días.

A1a	0.21	B1a	0.26	C1a	- --	D1a	0.34
A1b	0.26	B1b	0.13	C1b	0.21	D1b	0.26
A1c	0.39	B1c	0.13	C1c	0.13	D1c	0.39
A2a	0.26	B2a	- --	C2a	0.13	D2a	0.39
A2b	0.31	B2b	- --	C2b	0.26	D2b	0.21
A2c	0.21	B2c	0.13	C2c	0.13	D2c	0.26
A3a	0.26	B3a	- --	C3a	0.21	D3a	0.13
A3b	0.77	B3b	- --	C3b	0.13	D3b	- --
A3c	0.26	B3c	0.13	C3c	0.05	D3c	0.01
A4a	- --	B4a	0.51	C4a	0.05	D4a	0.39
A4b	0.39	B4b	0.31	C4b	0.21	D4b	0.23
A4c	0.39	B4c	0.31	C4c	0.05	D4c	0.21
A5a	0.39	B5a	- --	C5a	0.21	D5a	0.05
A5b	0.13	B5b	- --	C5b	0.21	D5b	0.02
A5c	- --	B5c	- --	C5c	0.05	D5c	- --
A6a	0.13	B6a	0.26	C6a	0.21	D6a	0.26
A6b	0.26	B6b	- --	C6b	0.13	D6b	0.90
A6c	0.21	B6c	- --	C6c	0.21	D6c	0.26
A7a	- --	B7a	- --	C7a	0.05	D7a	0.07
A7b	0.26	B7b	- --	C7b	0.21	D7b	0.04
A7c	0.26	B7c	- --	C7c	0.05	D7c	0.07

TABLA XIII .- Tercera determinación experimental de N<sub>2</sub> en suelo,  
al final del tiempo experimental (135 días).

A1a	0.02	B1a	0.28	C1a	0.07	D1a	0.14
A1b	0.02	B1b	- - -	C1b	0.0-	D1b	0.14
A1c	0.02	B1c	0.14	C1c	0.14	D1c	0.0-
A2a	0.13	B2a	0.07	C2a	0.14	D2a	0.07
A2b	0.21	B2b	- - -	C2b	0.13	D2b	0.14
A2c	9.21	B2c	0.21	C2c	0.14	D2c	0.11
A3a	0.08	B3a	- - -	* C3a	0.11	D3a	0.14
A3b	0.02	B3b	- - -	* C3b	0.03	D3b	0.21
A3c	0.0-	B3c	0.14	C3c	0.13	D3c	0.21
A4a	0.0-	B4a	- - -	C4a	0.27	D4a	0.08
A4b	0.0-	B4b	0.14	C4b	0.14	D4b	0.14
A4c	0.0-	B4c	- - -	* C4c	0.26	D4c	0.14
A5a	0.0-	B5a	- - -	C5a	0.07	D5a	0.14
A5b	0.11	B5b	- - -	C5b	0.0-	D5b	0.11
A5c	0.14	B5c	- - -	* C5c	0.06	D5c	0.28
A6a	0.35	B6a	0.0-	C6a	0.13	D6a	0.28
A6b	0.28	B6b	- - -	C6b	0.13	D6b	0.25
A6c	* 0.33	B6c	- - -	C6c	0.21	D6c	0.10
A7a	0.14	B7a	- - -	C7a	- - -	D7a	0.21
A7b	- - -	B7b	- - -	C7b	- - -	D7b	0.14
A7c	- - -	B7c	- - -	C7c	0.14	D7c	0.0-

\* Datos recuperados estadísticamente, Ostle, 1965. ANEXO 9

(- - -) Unidades experimentales no recuperables.

TABLA XIV .- ANALISIS DE VARIANZA. Clasificación doble, muestras compuestas. Datos particulares.

		C E P A S						$\Sigma$
		1	2	3	4	5	6	
V A R I A N D E S	A	0.11	0.26	0.18	0.13	0.13	-0.09	
		0.11	-0.08	0.24	0.39	0.02	-0.02	
		0.11	-0.08	0.13	0.00	0.25	-0.07	
		0.33	0.1	0.55	0.52	0.40	-0.18	
	C	0.06	-0.01	-0.02	-0.01	0.19	0.13	
		0.13	0.01	0.23	0.12	0.26	0.21	
		-0.01	-0.04	0.00	0.13	0.20	0.13	
		0.18	0.05	0.21	0.24	0.65	0.47	
	D	0.25	0.19	0.12	0.18	0.25	0.13	
		0.25	0.12	0.18	0.25	0.28	0.14	
		0.11	0.28	0.18	0.25	0.06	0.16	
		0.76	0.59	0.48	0.68	0.59	0.43	
$\Sigma$		1.27	0.74	1.24	1.44	1.64	0.72	7.05



TABLA XV .- Cuadrado de los datos particulares.

		C E P A S						
		1	2	3	4	5	6	
V A R I E D A D E S	A	0.01	0.07	0.03	0.02	0.2	0.008	
		0.01	0.006	0.06	0.15	0.0004	0.0004	
		0.01	0.006	0.01	0.00	0.06	0.004	
		0.04	0.08	0.1	0.19	0.08	0.01	
	C	0.004	0.0001	0.00004	0.0001	0.04	0.1	
		0.02	0.01	0.05	0.01	0.07	0.04	
		0.0001	0.002	0.00	0.02	0.04	0.02	
	D	0.02	0.01	0.05	0.03	0.14	0.08	0.31
		0.06	0.04	0.01	0.03	0.06	0.02	
		0.06	0.01	0.03	0.06	0.08	0.02	
		0.01	0.08	0.03	0.06	0.003	0.02	
	0.14	0.13	0.07	0.16	0.16	0.06	0.72	
		0.2	0.22	0.22	0.38	0.38	0.15	1.55

TABLA XVI.- Revisión de los sumos.

		T R A T A M I E N T O S						$\sum$	$\sum^2$
		1	2	3	4	5	6		
x	A	0.33	0.1	0.58	0.52	0.40	0.18	1.12	0.95
	C	0.16	0.05	0.21	0.24	0.65	0.47	1.8	3.24
	D	0.76	0.59	0.48	0.58	0.59	0.42	3.02	12.46
	$\sum$	1.27	0.74	1.27	1.44	1.64	0.72	7.05	18.65
	$\sum \frac{\sum}{n}$	1.61	0.58	1.54	1.67	2.69	0.52	8.95	49.70
(x) <sup>2</sup>	A	0.11	0.01	0.30	0.27	0.16	0.03	0.88	
	C	0.02	0.002	0.04	0.06	0.42	0.22	0.77	
	D	0.57	0.35	0.23	0.46	0.35	0.18	2.14	
	$\sum$	0.72	0.36	0.57	0.79	0.93	0.43	3.8	

TABLA XVII.- Sumas de las desviaciones cuadradas.

VARIABLES		S D C	VALOR
1	Tc	$\frac{49.70}{54}$	0.92
2a	E	M $\frac{3.8}{3} - 0.92$	0.346
2b		VAP $\frac{18.65}{18} - 0.92$	0.115
2c		TRAT $\frac{8.95}{9} - 0.92$	0.077
2d		V y T $0.346 - (0.115 - 0.077)$	0.154
3	F	$0.22 - 0.346$	0.294
4	T	$1.55 - 0.92$	0.63

TABLA XVIII.- Estimación de las varianzas.

VARIABILIDAD		S D C	gl	S <sup>2</sup>	Fc	Ft		sig
						5%	1%	
E	VAR	0.115	2	0.057	6.26	3.32	5.39	++
	TRT	0.077	5	0.0154	1.69	2.53	3.70	—
	V X T	0.154	10	0.0154	1.69	2.10	2.98	—
R		0.284	31	0.0091				
T		0.63	53					

TABLA XIX.- PRUEBA DE DUNCAN. Medias muestrales.

VARIEDAD	T R A T A M I E N T O S					
	1	2	3	4	5	6
A	0.11	0.3	0.183	0.173	0.133	0.06
C	0.06	0.016	0.07	0.24	0.166	0.156
D	0.253	0.196	0.16	0.226	0.16	0.143

TABLA XX.- PRUEBA DE DUNCAN. Rp

$$\text{ERROR} = \frac{0.0091}{3} = 0.055$$

Sx	0.055		g1	31
P	q		Rp	
	5%	1%	5%	1%
2	2.89	3.89	0.15	0.16
3	3.04	4.06	0.16	0.22
4	3.13	4.17	0.17	0.22
5	3.20	4.25	0.17	0.23
6	3.25	4.31	0.17	0.23
7	3.29	4.31	0.18	0.24
8	3.32	4.41	0.18	0.24
9	3.35	4.44	0.18	0.24
10	3.37	4.48	0.18	0.24
11	3.39	4.50	0.18	0.24
12	3.41	4.53	0.18	0.24
13	3.42	4.55	0.18	0.25
14	3.43	4.57	0.18	0.25
15	3.44	4.59	0.18	0.25
16	3.45	4.60	0.18	0.25
17	3.45	4.62	0.18	0.25
18	3.46	4.63	0.19	0.25



Porciento de Nitrógeno en tallos y hojas por asociación Bacteria-Leguminosa.

TABLA XXIII .- Datos del porciento de N<sub>2</sub> en tallos y hojas despues - de 135 días.

A1a	3.40	C1a	3.22	D1a	6.53
A1b	3.04	C1b	4.92	D1b	6.00
A1c	3.25	C1c	* 3.87	D1c	3.92
A2a	3.75	C2a	4.10	D2a	5.60
A2b	3.37	C2b	5.32	D2b	5.60
A2c	3.37	C2c	4.20	D2c	6.28
A3a	3.12	C3a	* 2.70	D3a	5.94
A3b	3.05	C3b	* 3.60	D3b	4.65
A3c	3.72	C3c	3.78	D3c	7.70
A4a	3.74	C4a	4.20	D4a	4.76
A4b	0.19	C4b	4.10	D4b	3.92
A4c	4.08	C4c	* 3.96	D4c	4.48
A5a	3.49	C5a	4.20	D5a	5.04
A5b	3.54	C5b	* 2.24	D5b	5.04
A5c	6.28	C5c	* 2.81	D5c	5.60
A6a	2.91	C6a	4.00	D6a	5.60
A6b	3.44	C6b	4.38	D6b	4.20
A6c	8.12	C6c	3.78	D6c	6.53
A7a	3.27	C7a	- - -	D7a	5.86
A7b	3.72	C7b	- - -	D7b	3.64
A7c	3.50	C7c	3.64	D7c	6.72

\* Datos recuperados estadísticamente, Ostle, 1965. ANEXO 9

TABLA XXIV .- ANALISIS DE VARIANZA. Clasificación doble. muestras compuestas. Datos particulares.

		T R A T A M I E N T O S						$\Sigma$
		1	2	3	4	5	6	
V A R I E	A	3.40	3.75	3.12	3.74	3.49	2.91	
		3.04	3.37	3.05	0.19	3.54	3.44	
		3.25	3.37	3.72	4.08	6.28	8.12	
		9.69	10.49	9.89	8.01	13.31	14.47	
D A D E S	C	3.22	4.1	2.70	4.20	4.20	4.0	
		4.92	5.32	3.60	4.1	2.24	4.38	
		3.82	4.20	3.78	3.96	2.81	3.76	
		11.96	13.62	10.08	12.25	9.25	12.16	
	D	6.53	4.76	5.94	4.76	5.04	5.60	
		6.00	5.60	4.66	3.92	5.04	4.20	
		3.92	6.28	7.70	4.48	5.60	6.53	
		16.45	16.64	18.30	13.16	15.58	16.33	
$\Sigma$		38.10	40.75	38.19	33.43	38.24	42.95	232

TABLA XXV .- Cuadros de los datos particulares.

		T R A T A M I E N T O S						
		1	2	3	4	5	6	
V A R I E D A D E S	A	11.56	14.06	9.73	13.99	12.18	8.47	
		9.24	11.36	9.30	0.036	12.53	11.83	
		10.56	11.36	13.84	16.65	39.44	65.93	
		21.36	36.77	32.87	30.67	64.15	86.24	
	C	10.37	16.81	7.29	17.64	17.64	16.00	
		24.21	28.30	12.96	16.81	5.01	19.18	
		14.59	17.64	14.28	15.68	7.89	14.29	
		49.17	62.75	34.53	50.13	30.54	49.47	
	D	42.64	22.66	35.28	22.66	25.40	31.36	
		36.00	31.36	21.71	15.37	25.40	17.64	
		15.37	39.44	59.29	20.07	33.36	42.64	
		94.00	93.46	116.29	58.09	82.16	91.64	
		164.53	192.88	183.69	138.89	176.85	227.35	1087.24



TABLA XXXI.- Recorrido de las sumas.

		T R A T A M I E N T O S						$\sum$	$\sum_{i=1}^n$
		1	2	3	4	5	6		
1	A	9.69	10.49	9.89	9.01	10.31	14.47	59.96	4397.94
	B	11.96	13.62	12.08	12.06	9.26	12.16	69.33	4906.64
	D	16.45	16.64	18.3	13.16	15.68	16.33	97.00	5409.00
	$\sum$	36.1	40.75	38.27	33.23	35.24	42.96	232.29	18693.58
	$\sum_{i=1}^n$	1451.61	1669.56	1458.47	1117.56	1452.09	1645.56	8996.28	53912.19
(2)	A	93.90	112.04	97.91	64.2	177.16	209.4	765.61	
	B	143.04	165.50	191.60	150.31	85.66	147.66	612.88	
	D	270.60	276.90	335.0	173.2	248.9	266.7	1558.3	
	$\sum$	507.54	572.44	634.41	387.7	508.62	523.96	3137.63	

TABLA XXXII.- Sumas de las Desviaciones Cuadradas.

VARIABLES		S D D	VALOR
1	Tc	$\frac{53912.19}{54}$	998.37
2a	E	$\frac{3137.63}{3} - 998.37$	47.50
		$\frac{18583.16}{18} - 998.37$	32.36
2c	E	$\frac{8996.05}{9} - 998.37$	1.19
2c		$47.50 - (32.36 - 1.19)$	13.94
3	R	$85.97 - 47.50$	41.37
4	T	$187.24 - 998.37$	59.57

TABLA XXVIII.- Estimación de las varianzas.

VARIABILIDAD		S D C	gl	S <sup>2</sup>	Fc	Ft		sig
						5%	1%	
E	VAR	32.36	2	16.18	11.39	3.33	5.42	+++
	TRT	1.19	5	0.23	0.16	2.54	3.73	—
	VxT	13.94	10	1.39	0.97	2.18	3.00	—
R		41.47	29	1.42				
T		88.87	46					

TABLA XXIX.- PRUEBA DE DUNCAN. Medias muestrales.

VARIETADES	TRATAMIENTOS					
	1	2	3	4	5	6
A	3.23	3.49	3.29	2.67	4.43	4.82
C	3.98	4.54	3.36	4.08	3.08	4.05
D	5.48	5.54	6.1	4.38	5.22	5.44

TABLA XXX.- PRUEBA DE DUNCAN. Rp

$$\text{ERROR} = \frac{1.42}{3} = 0.69$$

Sx	0.69		g <sub>1</sub>	31
P	q		Rp	
	5%	1%	5%	1%
2	2.89	3.89	1.58	2.68
3	3.04	4.06	2.09	2.80
4	3.13	4.17	2.15	2.88
5	3.20	4.25	2.20	2.93
6	6.25	4.31	2.24	2.97
7	3.29	4.37	2.27	3.01
8	3.32	4.41	2.29	3.04
9	3.35	4.44	2.31	3.04
10	3.37	4.48	2.32	3.09
11	3.39	4.50	2.33	3.10
12	3.41	4.53	2.35	3.12
13	3.42	4.55	2.35	3.14
14	3.43	4.57	2.36	3.15
15	3.44	4.59	2.37	3.16
16	3.45	4.60	2.38	3.17
17	3.45	4.62	2.38	3.18
18	3.46	4.63	2.39	3.19

TABLA XXXI.- Comparación de las medias.

v	VAR	D	D	D	D	A	C	A	D	C	C	C	A	C	A	A	C	A	
A	TRT	2	1	6	5	6	2	5	4	4	6	1	2	3	3	1	5	4	
R	X	5.54	5.48	5.44	5.22	4.82	4.54	4.43	4.38	4.08	4.05	3.98	3.49	3.36	3.29	3.33	3.08	2.67	
D3	6.1	.56	.68	.67	.88	1.26	1.56	1.67	1.72	2.02	2.05	2.12	2.61	2.74	2.84	2.87	3.02	3.43	
D2	5.54		.06	.1	.32	.72	1.0	1.11	1.16	1.46	1.49	1.56	2.05	2.18	2.25	2.31	2.46	2.87	
D1	5.48			.04	.26	.66	.94	1.05	1.1	1.4	1.43	1.5	1.99	2.12	2.19	2.25	2.4	2.81	
D6	5.44				.22	.62	.9	1.01	1.06	1.36	1.39	1.46	1.95	2.08	2.15	2.21	2.36	2.77	
D5	5.22					.4	.68	.79	.84	1.14	1.17	1.24	1.73	1.86	1.93	1.99	2.14	2.55	
A6	4.82						.28	.39	.44	.74	.77	.84	1.33	1.46	1.53	1.59	1.74	2.15	
C4	4.54							.11	.16	.46	.49	.55	1.05	1.18	1.25	1.31	1.46	1.87	
A5	4.43								.05	.35	.38	.45	.94	1.07	1.14	1.2	1.35	1.76	
D4	4.38									.3	.33	.4	.89	1.02	1.09	1.15	1.3	1.71	
C4	4.08										.03	.6	.59	.72	.79	.85	1.0	1.41	
C6	4.05											.07	.56	.69	.77	.82	.97	1.38	
C1	3.98												.49	.62	.69	.75	.9	1.31	
A2	3.49														.13	.2	.26	.41	
C3	3.36															.07	.13	.34	
A3	3.29																.06	.21	
A1	3.23																	.15	
C5	3.08																		
																			.41

TABLA XXXI.- Comparación de las medias.

v	VAR	D	D	D	D	A	C	A	D	C	C	C	A	C	A	A	C	A
A	TRT	2	1	6	5	6	2	5	4	4	6	1	2	3	3	1	5	4
R	X	5.54	5.48	5.44	5.22	4.82	4.54	4.43	4.38	4.08	4.05	3.98	3.49	3.36	3.29	3.33	3.08	2.67
D3	6.1	.56	.68	.67	.88	1.28	1.56	1.67	1.72	2.02	2.05	2.12	2.61	2.74	2.84	2.87	3.02	3.43
D2	5.54		.06	.1	.32	.72	1.0	1.11	1.16	1.46	1.49	1.56	2.05	2.18	2.25	2.31	2.46	2.87
D1	5.48			.04	.26	.66	.94	1.05	1.1	1.4	1.43	1.5	1.99	2.12	2.19	2.25	2.4	2.81
D6	5.44				.22	.62	.9	1.01	1.06	1.36	1.39	1.46	1.95	2.08	2.15	2.21	2.36	2.77
D5	5.22					.4	.68	.79	.84	1.14	1.17	1.24	1.73	1.86	1.93	1.99	2.14	2.55
A6	4.82						.28	.39	.44	.74	.77	.84	1.33	1.46	1.53	1.59	1.74	2.15
C4	4.54							.11	.16	.46	.49	.56	1.05	1.18	1.25	1.31	1.46	1.87
A5	4.43								.05	.35	.38	.45	.94	1.07	1.14	1.2	1.35	1.76
D4	4.38									.3	.33	.4	.89	1.02	1.09	1.15	1.3	1.71
C4	4.08										.03	.6	.59	.72	.79	.85	1.0	1.41
C6	4.05											.07	.56	.69	.77	.82	.97	1.38
C1	3.98												.49	.62	.69	.75	.9	1.31
A2	3.49													.13	.2	.26	.41	.82
C3	3.36														.07	.13	.34	.69
A3	3.29															.06	.21	.62
A1	3.23																.15	.56
C5	3.08																	.41

---

B.- Clasificación de Suelos en base a % de Nitrógeno total.  
(Método Kjeldhal - Gunning)

---

\* Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, S. A. R. H.  
Departamento de Suelos., cit., Miramontes, 1978.

---

CLASIFICACION		% N <sub>2</sub>
Extremadamente pobre	Menor de	0.032
Pobre	0.032	----- 0.063
Medianamente pobre	0.064	----- 0.095
Mediano	0.096	----- 0.126
Medianamente Rico	0.127	----- 0.158
Rico	0.159	----- 0.221
Extremadamente Rico	Mayor de	0.221

---

---

9.- Recuperación estadística de datos experimentales.

---

Ostle, 1965.

Los datos faltantes en un diseño experimental, como consecuencia de alteraciones ajenas al propio diseño, pueden obtenerse de la siguiente ecuación:

$$M = \frac{t T + b B - S}{(T - 1) (b - 1)}$$

Donde:

t = Nº. de tratamientos

b = Nº. de bloques

T = Sumatoria de observaciones con el mismo tratamiento como la observación faltante.

B = Sumatoria de las observaciones en el mismo bloque como la observación faltante.

S = Suma de todas las observaciones reales.

Se deben reducir los grados de libertad asociadas tanto con el error experimental como con el total en 1.

X.- APENDICE 1

Porcentaje de Proteína en tallos y hojas.

A1a	21.25	C1a	20.12	D1a	4.81
A1b	19.00	C1b	30.75	D1b	37.50
A1c	20.31	C1c	24.18	D1c	24.50
A2a	23.43	C2a	25.62	D2a	35.00
A2b	21.06	C2b	33.25	D2b	35.00
A2c	21.06	C2c	26.25	D2c	39.25
A3a	19.5	C3a	16.87	D3a	37.12
A3b	19.06	C3b	22.50	D3b	29.00
A3c	23.25	C3c	23.62	D3c	48.12
A4a	23.37	C4a	26.25	D4a	29.75
A4b	1.18	C4b	25.62	D4b	24.50
A4c	25.50	C4c	24.75	D4c	28.00
A5a	21.81	C5a	26.25	D5a	31.50
A5b	22.12	C5b	14.00	D5b	37.50
A5c	39.25	C5c	17.56	D5c	35.00
A6a	18.18	C6a	25.00	D6a	35.00
A6b	21.50	C6b	27.37	D6b	26.25
A6c	80.75	C6c	26.68	D6c	40.81
$\sum \frac{x}{n}$	21.68		24.09		43.00

Para estimar el contenido de proteína de una muestra, se multiplica el valor de nitrógeno por 6.25 (Factor de  $N_2$ ) que significa que cada unidad de nitrógeno está contenida en 6.25 unidades de proteína.. Sosa, 1981.



APENDICE 2

Resultados de análisis Físicos y Químicos del suelo  
del área de estudio. González y Urrieta 1986.

PARAMETROS CUANTIFICADOS	RESULTADOS
	Arena 35.64 %
Textura	Limo 14.20 %
	Arcilla 49.15 %
	A R C I L L O S O
pH	
a) P. Saturación	6.8
b) 1 : 1	6.0
Materia Orgánica	3.05 %
C. I. C.	11.96 meq/100 g de suelo
Nitrógeno total	0.57 %
Ca <sup>++</sup>	8.45 meq/100 g
Mg <sup>++</sup>	4.60 meq/100 g

XI.- BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 .- Alba, J. de, 1971 "Alimentación del ganado en América Latina" 2ª ed., Ed. La Prensa Médica Mexicana, Mex.
- 2 .- Alexander, M. 1984 "Introducción a la Microbiología de Suelos" 1ª ed., A G T Editorial, Mex.
- 3 .- Benitez, V. A., 1982 "Uso de Biofertilizantes. Simbiosis entre Leguminosas - Hongos - Bacterias para incrementar el rendimiento de la alfalfa en una zona cercana a la presa Taxhimay Edo. de México". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M. Mex., 8º sem.
- 4 .- Berkun, P. Van, Bohlool, B. B., 1980 "Evaluation of nitrogen fixation by Bacteria in association with roots of tropical grasses". - Microbiological Reviews. Vol 44, Nº 3, pp. 491-517.
- 5 .- Brill, J. W., 1977 "Fijación Biológica de Nitrógeno atmosférico". - Ciencia y Desarrollo, Nº 17. Nov- dic, pp. 250-256.
- 6 .- De la O, G. F. J. 1982 "Contribución al estudio de Rhizobium y Micorrizas en el desarrollo de leguminosas (Alfalfa y Frijol)". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M., Mex., 8º sem.
- 7 .- DETENAL, S.P.P. Carta Geológica Nº E-14 - A - 18 (Tepeji del Rio), Mex.
- 8 .- Food and Agriculture Organization., 1984 "Legume inoculante and their use". ONU. Rome, Italy.
- 9 .- García , E., 1973 "Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geofísica, U.N.A.M. Mex.

- 10.- Gaucher, G. 1971. "Tratado de Pedología agrícola, el suelo y sus características agronómicas". Ed. Omega. España.
- 11.- González, M. G., Urrieta, A. I., et al. 1985 "Contribución al estudio del establecimiento de un pastizal mixto en la región de San - Luis Taxhimay, Edo. de México, durante los meses de Junio-Agosto de 1985". Inédito, E.N.E.P. Zaragoza. U.N.A.M. Mex.
- 12.- González, M. G., Urrieta, A. I., 1986. "Evaluación de la fijación de Nitrógeno en tres diferentes cepas de Rhizobium sp. asociadas a las leguminosas: Prosopis sp., Crotalaria ovalis y Medicago sativa, bajo condiciones de invernadero". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M. Mex.
- 13.- González, M. G., Urrieta, A. I., 1986. "Estudio de la distribución, explotación y legislación de Pastizales en la República Mexicana". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza. U.N.A.M. Mex., 8º sem.
- 14.- Grande, L. R.. 1974. "Métodos para análisis físicos y químicos en suelos agrícolas, con fines agroeconómicos y de fertilidad". Dpto. de Suelos U. A. S. P.
- 15.- Havard-Duclos, B. 1979 "Las plantas forrajeras tropicales". Ed. - Blume. España.
- 16.- Krieg, N. R., 1984. "Bergey's. Manual of systematic Bacteriology." Vol. 1. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore/London.
- 17.- Miramontes, F. B., 1978 "Interpretación agronómica de datos de análisis físicos y químicos de suelos y plantas". . SARH. Mex.
- 18.- Norman, M. J. T., 1979 "A role for legumes in tropical agriculture" B.N.F. Technology For Tropical Agriculture. Dpto. of Agronomy and Horticultural Science, Univ. of Sydney, Sydney. 2006 Australia. - pp 9 - 22

- 19.- Nutman, P. S. 1969 "Symbiotic Nitrogen Fixation". Soil Nitrogen - American Society of Agronomy. Chapter 10, pp 360-379.
- 20.- Ostle, B. 1965 "Estadística Aplicada". Ed. Limusa. Mex.
- 21.- Rodríguez, A. J. G. 1983 "Evaluación de la fertilidad de un suelo-cultivado bajo condiciones de invernadero, mediante el empleo de - la relación simbiótica Rhizobium - Leguminosa con fertilizante químico". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M. Mex.
- 22.- Romero, C. J., Esquivel, L. P., Coria, B. E. 1983 "Evaluación de - algunos efectos del plaguicida Malathión en la relación simbiótica Pisum sativa - Rhizobium leguminosarum bajo condiciones de invernadero". Inédito. E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M. Mex.
- 23.- Russell, J. E., Russell, W. E., 1968 "Las condiciones del suelo y - el crecimiento de las plantas". Ed. Aguilar, Madrid, España.
- 24.- Sanchez, S. O., 1978. "La flora del valle de México". Ed. Herrero. S. A., Mex.
- 25.- Somasegaran, H. et. al. 1981 "Ejercicios prácticos de tecnología de Rhizobium - Leguminosa". Chapingo, Mex.
- 26.- Sosa de Pro, E., 1981 "Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal". Chapingo, Mex.
- 27.- Stamm, G. W., 1979 "Manual de ve terinaria para ganaderos". Ed. Concepto. S.A. Mex.
- 28.- Sutton, P., Harmon, P. 1976 "Fundamentos de Ecología". Ed. Limusa. Mex.
- 29.- Teuscher, H., et al. 1975 "El suelo y su fertilidad". Ed. C.E.C.S. A. Mex.

- 30.- Toledo, V. M., 1984 "Ecología y autosuficiencia alimentaria". Ed. SIGLO XXI. Mex.
- 31.- Turk, T., Wittes, W., 1981 "Tratado de Ecología". Ed. Interamericana. Mex.
- 32.- Vincent, J. M., 1974 "The Biology of nitrogen fixation". In. A. - Quispel, ed. North - Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 265-341.
- 33.- Vincent, J. M., 1975. "Manual práctico de Rizobiología". Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Arg.
- 34.- Whitney, A. S. 1970. "The role of legumines in mixed pastures". - B.N.F. Technology for Tropical Agriculture. Dpto. of Agronomy and- Soil Sci., Maui Agricultural Research Center, University of Hawaii. Haw. pp 361 - 367.

XII.- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 .- Bartholomew, V. W., Clark, E. F., 1975. "Soil nitrogen". American Society of Agronomy, Inc. Publisher, Madison, U.S.A.
- 2 .- Bidwell, R. G. S., 1979. "Fisiología vegetal" 2ª Ed. A.G.T. EDITOR Mex.
- 3 .- Blanchoud. H. G., 1968. "Contribución de diferentes especies de Leguminosas y la influencia de la fertilización nitrogenada en la producción de una pradera de gramíneas". F. A. O.
- 4 .- D.G.E.T.A., F.A.O., 1985. "PASTIZALES NATURALES". Manuales para educación agropecuaria. Producción vegetal Nº 20 Ed. Trillas, Mex. 1ª Ed.
- 5 .- Echegaray, A., 1966 "Microbiología de suelos". Chapingo, México.- Práctica A.
- 6 .- "Guía de planeación y control de las actividades pecuarias" 1979.- México, S.E.P./F.C.E.
- 7 .- Jackson, M. L., 1976. "Análisis químico de suelo" Ed. Omega 3ª Ed. Barcelona, Esp.
- 8 .- Kamffer, M.V.B., 1942 "Contribución al conocimiento de las plantas venenosas para el ganado de México". Tomo 1, Nº 2. Inst. Pecuario, Mex.
- 9 .- López, R. J., López, M. J., 1978. "El diagnóstico en suelo y plantas". Ed. Mundiprensa, Madrid, Esp.
- 10.- Mezliak, P., 1976 "Fisiología Vegetal, Nutrición y Metabolismo" Ed. Omega, Barcelona Esp.

- 11.- Millar, C. E., et. al., 1981. "Fundamentos de la ciencia del Suelo" Ed. C.E.C.S.A., Mex.
- 12.- Noubberger, A. Tatum, E. L., 1974. "The Biology of nitrogen fixation" North-Holland publishing Co. Amsterdam Oxford.
- 13.- Rzedowski, J., 1978. "Vegetación de México". Ed. Limusa, Mex.
- 14.- Whyte, R. O., 1958. "Prospección e introducción de especies vegetales". F. A. O.