

73 2ci



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"LA SIMBIOSIS AZOLLA SP.
ANABAENA SP. Y SU IMPORTANCIA
EN LA AGRICULTURA"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A
MARIA LUISA LIMAS BERNAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

1.-INTRODUCCION.

2.-REVISION DE LA LITERATURA.

2.1.-Clasificación Botánica de *Azolla*.

2.2.- Taxonomía, Distribución y Características Botánicas.

2.2.1.- Subgénero ó Sección *Azolla*.

2.2.2.- Subgénero ó Sección *Rhizosperma*.

3.- CICLO VITAL DE *Azolla*.

4.- MICROSIMBIONTE *Anabaena azollae*.

5.- FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE *Azolla*.

5.1.- Temperatura.

5.2.- Luz.

5.3.- Humedad.

5.4.- pH del Medio.

5.5.- Cantidad de Agua.

5.5.1.-Calidad del Agua.

5.6.- Interacción de *Azolla* y el Medio Ambiente.

5.7.- Requerimientos Nutricionales.

6.- TASA DE CRECIMIENTO.

7.- FIJACION DE NITROGENO.

7.1- Introducción.

7.2- Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno Atmosférico.

7.2.1- Fijación de Nitrógeno en el Heterocisto y Células Vegetativas de la cianobacteria

7.2.2- Composición Química de la Nitrogenasa.

7.2.3- Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno, de la Actividad Nitrogenasa y de la Glutamina Sintetasa.

7.3.- Actividad de la Nitrogenasa.

7.4.- Técnicas en la medición de Fijación de Nitrógeno.

7.4.1.- Reducción de Acetileno.

7.4.2.- Método ¹⁵N₂.

8.- FERTILIZACION FOSFATADA.

9.- DESCOMPOSICION DE *Azolla* EN LOS SUELOS.

10.- RELACION C:N EN EL BIOFERTILIZANTE *Azolla*.

11.- COLECCION, MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE *Azolla*.

11.1.- Introducción.

11.2.- Colección.

11.2.1.- Preparación y Embarque de Germoplasma.

11.3.- Mantenimiento.

11.3.1- Colección de Germoplasma.

11.3.2.- Invernaderos para Sistemas de Producción masiva.

11.4.- Cultivo.

11.4.1.- Invernaderos y Multiplicación en el Campo.

11.4.2.- Cultivo del Campo e Incorporación.

11.5.- Factores Ambientales que Afectan el Crecimiento de *Azolla*.

11.6.- Manejo de los Factores que Afectan *Azolla*.

11.6.1.- Inoculación.

11.6.2.- Monocultivo.

11.6.3.- Intercultivo.

12.- USOS DE *Azolla*.

12.1.- Como Abono Verde.

12.2.- Sistemas de Incorporación de *Azolla* en el Cultivo de Arroz.

12.3.- Incorporación de *Azolla* en el Maiz.

12.4.- Tasa de Crecimiento.

- 12.5.- Practicas de Manejo.
 - 12.5.1.- Densidad de Siembra.
 - 12.5.2.- Control de Agua.
 - 12.5.3.- Materiales de Incorporación y de Inoculo de *Azolla*.
- 12.6.- *Azolla* como una Mala Hierba.
- 12.7.- *Azolla* como Forraje.
- 12.8.- *Azolla* como Comida de Peces y Control de Plagas.
- 12.9.- Control de Mosquitos.
- 12.10.- Miscelanea.
- 12.11.- Material Genético.
- 13.- INSECTOS Y ENFERMEDADES (generalidades).
- 14.- ESTUDIOS DE *Azolla* REALIZADOS EN MEXICO.
 - 14.1.-Utilización de *Azolla* como Biofertilizante en Invernadero y Campo.
 - 14.1.1.- En Invernadero.
 - 14.1.2.- En Campo.
 - 14.2.- Factores Bióticos.
- 15.- CONCLUSIONES.
- 16.- BIBLIOGRAFIA.

1. INTRODUCCION.

La crisis de los recursos energéticos, tradicionales frente al alza de precios de los fertilizantes químicos propicia la búsqueda de otras formas de auxilio nutricional para los cultivos, y una alternativa es la asociación Simbiótica: *Azolla-Anabaena* de la que desde el siglo XI se conocen sus efectos benéficos (Beringer y Johnston 1978). Los estudios indican que la cantidad de nitrógeno aportada por hectárea y por año oscilan entre 100 y 1564 Kg (Watanabe 1977).

Azolla - Anabaena . representa una de las asociaciones simbióticas Helecho-cianobacteria más importantes por su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico.

Este helecho se encuentra ampliamente distribuido en estanques, canales y arrozales en regiones tropicales y templadas.

Presenta un rápido crecimiento en habitats con deficiencia de nitrógeno pero, tiene una particular demanda de fósforo, por lo que generalmente es el elemento químico que limita su crecimiento.

La característica más sobresaliente de *Azolla*, es su relación simbiótica con la cianobacteria *Anabaena azollae*, en la que el helecho provee de nutrimentos y de una cavidad protectora en cada fronda y a cambio el microsimbionte, le proporciona nitrógeno atmosférico fijado y posiblemente otras sustancias promotoras del crecimiento (Espinoza 1982). *Azolla* se ha utilizado como biofertilizante por el gran potencial que ofrece este helecho acuático como fuente de nitrógeno en diferentes cultivos por ejemplo en los arrozales; vía de excreción del mismo.

También es factible su uso en forma de abono verde para otros cultivos agrícolas de importancia comercial en las regiones tropicales de México (Espinoza et al y Ortega 1985).

Otra importancia de esta asociación es utilizarla como controladora de maleza ya que al crecer en la superficie de los pantanos y lagos en forma de manchas, no se desarrollan otras especies . Hay que hacer notar que *Azolla* puede ser usada también para alimento de peces, ganado porcino, aves . También se utiliza como bionergético (generación de biogas) lo que hace más atractivo el estudio de esta simbiosis (Ashton y Walmsley, 1976).

2. REVISION DE LITERATURA.

El término *Azolla* proviene del griego Azo: Secar y Ollyo: Muerte; por lo que su nombre significa literalmente: muerte por la sequia (Moore, 1969)

2.1 Clasificación botánica de *Azolla*.

División: *Pteridophyta*

Clase: *Filicopsida*

Orden: *Salsinales*

Familia: *Azollaceae*

Genéro: *Azolla*

Subgéneros ó Secciones: *Azolla* *Rhizosperma*.

Especies: *Azolla caroliniana* *Azolla nitollica*
A. filiculoides *A. pinnata*
A. mexicana
A. microphylla
A. rubra

A. filiculoides es igual a la variedad *rubra* y *japanica*.

A. pinnata variedad *imbricata*

A. pinnata variedad *pinnata* (Lumpkin y Plucknett, 1982).

2.2 Taxonomía, Distribución y Características Botánicas.

2.2.1 Subgénero ó Sección *Azolla*.

El subgénero *Azolla* se caracteriza por la presencia de 3 flotadores en sus megasporocarplos incluye 5 especies originarias del nuevo mundo o América, su identificación se basa principalmente en características microscópicas de los órganos reproductivos.

Azolla caroliniana.

Tiene una distribución muy amplia desde el noroeste de Estados Unidos De Norteamérica hasta Argentina, ha sido introducida a Europa y Asia (fig.1).

Azolla filiculoides.

su distribución es principalmente en América, similar a la *Azolla caroliniana* aunque se ha encontrado en África del Sur, Asia, Europa y Oceanía (fig.1).

Azolla rubra.

En ciertas literaturas se le considera como una variedad de *A. filiculoides*, encontrándose principalmente en Japón y Nueva Zelanda (fig.1)

Azolla mexicana.

Es exclusivamente americana, crece desde Canadá hasta Bolivia (fig.1).

Azolla microphylla.

Se encuentra desde el Río Bravo México, hasta Argentina; su distribución ha sido poco estudiada (fig.1).

2.2.2 Subgénero ó Sección *Rhizosperma*.

El subgénero *Rhizosperma* se caracteriza por un megasporocarpio con nueve flotadores. Es originaria del "Viejo Mundo" continente Euroasiático-Africano e incluye 2 especies.

Azolla nitollica.

Nativa de África Oriental desde el Sudán hasta Mozambique (fig 1).

Azolla pinnata.

DISTRIBUCION GLOBAL DE LAS ESPECIES DE AZOLLA

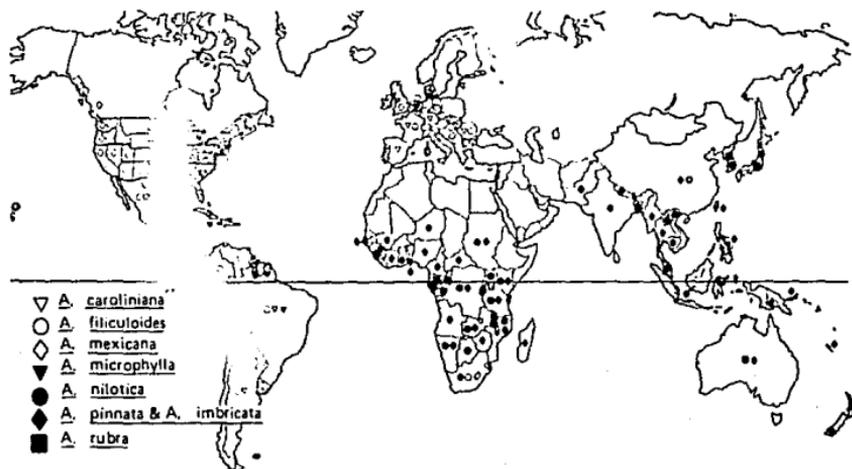


FIGURA 1 (ELKAN.1987)

Está ampliamente extendida en Africa del Sur Sahel, Madagascar, Asia y Oceanía (fig 1).

Las frondas de las especies de este subgénero tienen una forma triangular característica, en contraste a la forma redondeada de las especies del subgénero *Azolla*.

Las especies reportadas en México son; *Azolla filiculoides*, *Azolla mexicana*, *Azolla microphylla* (Quintero 1988) y por Svenson: *Azolla caroliniana* (citado por Lumpkin y Plucknett 1980).

2.2.3 Características Botánicas.

Una planta de *Azolla* se compone de un tallo flotante, corto y ramificado, con raíces que cuelgan hacia abajo dentro del agua. Tallo y ramas están recubiertos de frondas pequeñas, alternas, y colocadas una encima de la otra y un tamaño frecuente de 0.5 a 2.5 cm de largo. Cada hoja es bilobulada, conteniendo el lóbulo superior el pigmento verde clorofila mientras que el inferior carece de ella y es incoloro. En ciertas condiciones, también aparece en los lóbulos inferiores un pigmento autocianico que da al helecho un color pardo rojizo. (Ashton, 1976; Peters et al 1978).

3. CICLO VITAL DE *Azolla*.

El helecho es heterospóreo y produce a la vez macroesporangios y microesporangios durante la fase sexuada de su ciclo vital fig.2. La cianobacteria mantiene su asociación con el helecho durante la reproducción sexual, varios investigadores han informado que la cianobacteria mantiene su vínculo con el helecho asociándose tanto con los microesporangios como con los macroesporangios mientras que otros afirman que sólo se mantiene una unión con el macroesporangio. En estudios realizados sobre *A. filiculoides* se demostró que sólo se han encontrado células de cianobacterias en el macroesporangio encajados en una cavidad bajo el indusio que reviste el soro. Después de la fertilización de la macrospora, se forma un cigoto que se desarrolla dando lugar a un esporofito con su cianobacteria asociada (Ashton Walmsley 1976).

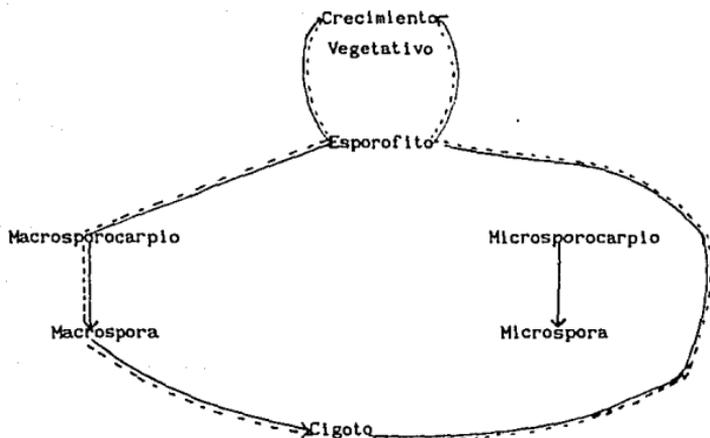


Fig 2.Ciclo vital de *A. filiculoides* (-) mostrando la continuación de la asociación con *Anabaena azollae*(-----).

4. MICROSIMBIOTE *Anabaena azollae*.

La característica más sobresaliente de *Azolla*, es su relación simbiótica con la cianobacteria *Anabaena azollae*, en la que el helecho provee de nutrimentos y de una cavidad protectora en cada fronda y a cambio el microsimbionte le proporciona nitrógeno atmosférico fijado el cual es capaz de satisfacer las necesidades de nitrógeno de la asociación y posiblemente otras sustancias promotoras del crecimiento (Lumpkin y Plucknett 1980)

El microsimbionte se denomina comúnmente *Anabaena azollae*, Strasburguer, pero Fjerdningstad indica que la cianobacteria es una ecoforma de *Anabaena variabilis* (Stewart et al 1977).

Con objeto de determinar la interdependencia que muestran los componentes de una asociación simbiótica, es preciso aislar los organismos individuales recombinarlos después y establecer sus necesidades para el crecimiento individual. La bibliografía publicada hasta la fecha indica que sólo se han aislado el helecho y los componentes algáceos pero no hay información respecto a una recombinación satisfactoria por lo tanto poco se sabe acerca del estado libre de esta especie.

La cianobacteria, *Anabaena azollae*, se ubica en la cavidad existente en el lóbulo dorsal de la fronda de *Azolla*; ésta tiene un orificio que abre el lado ventral del lóbulo dorsal cuya función, es probablemente intercambiar gases entre la atmósfera y el simbiote. La cianobacteria, *Anabaena azollae*, esta íntimamente asociada al meristemo terminal del helecho y crecen asociados (Stewart 1980a).

Cuando el meristemo forma las hojas primordiales, quedan atrapados filamentos de cianobacteria dentro de las cavidades que se producen en los lóbulos dorsales de cada hoja. La cianobacteria permanece confinada durante su crecimiento en este macrosimbionte y languidece al envejecer la hoja.

Las células de los lóbulos más jóvenes de las cianobacterias no tienen heterocistos (células especializadas donde se realiza la actividad de la nitrogenasa).

La frecuencia de heterocistos se incrementan aproximadamente 30% en la fronda 15, contándolos basipetalicamente. Después de la fronda 20 los

heterocistos empiezan a ser senescentes (Yates 1977, Hill 1977). La habilidad de fijar nitrógeno de cada fronda es proporcional a la frecuencia de heterocistos presentes y éstos son mayores cuando *Anabaena* está asociada con *Szylla* que cuando libre.

La habilidad del microsimbionte de fijar nitrógeno. Se puede demostrar mediante ensayos de reducción de acetileno y $^{15}\text{N}_2$. La *Anabaena* endófila al ser aislada tiene la habilidad de fijar nitrógeno, pero en menor proporción que al estar asociada con el helecho *Szylla*. (Becking 1979; Peters y Mayne, 1974; Peters et al., 1979). Cuando esta aislada, *Anabaena* excreta aproximadamente la mitad del nitrógeno fijado como amonio.

La glutamino sintetasa, enzima que asimila el amonio, se encuentra en el helecho *Szylla*. El microsimbionte lo provee de nitrógeno fijado, en forma de amoníaco, y el macrosimbionte lo convierte en aminoácidos. La fijación de nitrógeno está asociado con la fotosíntesis; las evidencias muestran que la cianobacteria captura energía solar utilizándola en la reacción de la nitrógenasa (Peters et al. ., 1980a). No se sabe si la energía y el reductante necesarios para la reacción de la nitrógenasa es parcialmente provisto por el helecho *Szylla*.

El sistema de fijación de nitrógeno en la asociación cianobacteria-*Szylla* es escasamente inhibido por el amonio, nitrato y la urea (Watanabe et al. 1980). *Szylla* colocada en una solución que contiene 2.5 mM de amonio puede mantener su tasa de crecimiento similar a la que se observa en ausencia de este ion y la fijación de nitrógeno es inhibida en 30%, aproximadamente. La fijación de nitrógeno a niveles normales se recupera rápidamente cuando la cianobacteria y el simbionte son transferidos en un medio libre de amonio (Ito y Watanabe, 1983). Ferrera Cerrato (1980) observó que *Szylla* colocada en un medio de Jensen libre de nitrógeno mostró un buen crecimiento, el que se ve alterado cuando la solución se burbujeaba con aire, esto es debido posiblemente a que la fijación del nitrógeno se ve inhibida por la presencia de oxígeno pues es conocido que la nitrógenasa es altamente sensible a este elemento.

En cultivos axenicos de *Azolla* se ha demostrado que el nitrato reduce la fijación del nitrógeno entre 20 y 90% (Peters y Mayne 1974; Newton, 1976) pero no es fundamental para la velocidad de crecimiento (Peters et al ., 1981). El sistema de fijación de nitrógeno de la cianobacteria endófila se protege de la acción inhibitoria del nitrógeno combinado por ciertos mecanismos desconocidos. Esto es una característica única de la simbiosis *Azolla-anabaena* y difiere de la simbiosis *Rhizobium* -Leguminosa, la cual es más sensible a nitrógeno combinado (Watanabe et al 1980).

5. FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DE *Azolla*

Las condiciones ambientales que afectan en mayor proporción al helecho son: Temperatura, Luz, humedad y nutrimentos. Los factores ambientales no sólo actúan en forma independiente sino que hay interacciones complejas (Tuan 1979).

5.1 Temperatura.

La temperatura constante óptima para el crecimiento de *Azolla* es aproximadamente 30 C excepto para *A. filiculoides*, la cual requiere de 25 C. En condiciones de campo, *A. pinnata* puede desarrollarse de 14 a 40 C (Singh, 1979), con un valor óptimo de 16-30 C dependiendo de otras condiciones ambientales (cuadro 1).

A temperaturas mayores o menores que el valor óptimo, el crecimiento del helecho y su actividad fijadora del nitrógeno son reportadas. De tal manera la variación de la temperatura a través del año podría ser un problema para su cultivo. La respuesta varía con la intensidad de la luz. Al disminuir la temperatura, disminuye la intensidad luminosa por consiguiente hay una menor actividad de la nitrogenasa. Dentro de ciertos límites, Luz y Temperatura tienen un efecto complementario y directo sobre la actividad de la nitrogenasa, así como sobre el crecimiento, observándose que a temperaturas cerca de 35 C el crecimiento es despreciable y a temperaturas cerca de 45 C el porcentaje de crecimiento es nulo. La temperatura del H₂O que esta poco profunda o esta estancada sobre el suelo puede exceder 40 C en clima caluroso. Sin embargo en la cosecha estas altas temperaturas se pueden controlar por medio de drenado o sombreado por tanto en donde las temperaturas son altas no sera necesario impedir su cultivo, aunque para realizar esto es un poco problemático (Elkan 1987; Stewart 1978).

Las especies de *Azolla* y sus variedades tienen diferentes tolerancias a las temperaturas extremas, algunas pueden sobrevivir en un gran intervalo de temperaturas (-5 a 35 C), en tanto que otras pueden sobrevivir solamente dentro de una variación pequeña del valor de temperatura. *A. filiculoides* o *A. rubra* (Japonica) toleran bastante las bajas temperaturas, mientras que *A. mexicana*, *A. microphylla*, *A. caroliniana*, *A. nitollica*, y ciertas variedades de *A. pinnata* toleran temperaturas muy altas en verano (Peters et al., 1980b); Watanabe y Berja, 1983; Lumpkin y Bartholomew, 1986 citados por Elkan 1987). Cuando la temperatura es muy alta la peor amenaza que puede tener *Azolla* corresponde a la población enorme de insectos y hongos que atacan *Azolla*, estos son controlados con la aplicación frecuente de pesticidas pero esto trae consigo problemas economicos y esto podría hacer que el cultivo de *Azolla* fuera irrealizable debido al alto costo (Singh 1979).

Cuadro 1 CONDICIONES AMBIENTALES OPTIMAS PARA *Myalla pinnata* (Quintero 1988).

Condición Ambiental	Rango o nivel óptimo	Fuente
Temperatura		
India	24-25 C (día)/17-28 C (noche)	(Rice Research News, 1978).
China	20 C (óptimo)	(Liu, 1979).
Vietnam	16-17 C (óptimo)	(Becking, 1979)
Filipinas (IRRI)	23-30 C (27 C óptimo)	(Watanabe et al 1981)
Radiación solar	50% (radiación solar total) 100%(radiación solar total)	(Watanabe, 1978). (Olguin y Perez, 1986).
Humedad relativa ambiental	>75%	(Zhejiang Academy Agricultural Science 1975).
pH del suelo	5.5-8.0 3.5.-6.5	(Singh, 1979; Rice Research News, 1978). (Quintero 1988).
Fósforo inmóvil del suelo		
p-Olsen	>50mg/kg de suelo	(Watanabe, datos no publicados; citado Kikuchi et al., 1984)
Capacidad de absorción de fósforo	<100mg de P2O5/100 gr de suelo	Igual que el anterior

5.2 Luz.

La luz desempeña un papel principal en relación con el crecimiento pero sobre todo por sus efectos sobre el proceso de la fotosíntesis (Springer, 1982). Las reacciones de fotosíntesis que dependen de la luz producen esqueletos carbonados y sustratos de alta energía que son esenciales para las actividades metabólicas del helecho y del simbiote (Ray 1979 ; Krogmann. 1977). Dado que la iluminación solar plena es del orden de 80,000 Lx, a 115,000 Lx, nos indica que un 50 % de la luz solar satisface las condiciones óptimas para su crecimiento y la actividad nitrogenásica (Ashton, y Walmsley 1976).

En México se han hecho estudios del efecto de la irradiación solar sobre el rendimiento de la materia seca ;lográndose los mayores rendimientos cuando se aplicó el 100% de la irradiación solar(Olguin y Perez 1986).

Se han hecho experimentos en los cuales se ha comprobado que la acción de la luz y el pH del medio tienen efectos interactuantes sobre la tasa de crecimiento del helecho. *A. filiculoides*, tiene un crecimiento máximo a pH 5 o cuando esta sometido a una iluminación reducida (15,000 Lx) en tanto que a un pH alto (9-10) crece con iluminación intensa (60,000 Lx). La fig. 3 muestra un efecto conjunto del pH y de la iluminación. Cuando la planta está sometida a iluminaciones por encima de 60,000 Lx hay una inhibición de crecimiento para todos los valores de pH. Por consiguiente al helecho le favorecen los ambientes donde dispone de ciertos grados de oscuridad , siendo también capaz de tolerar un amplio margen de pH y temperatura (Ashton y Walmsley 1976).

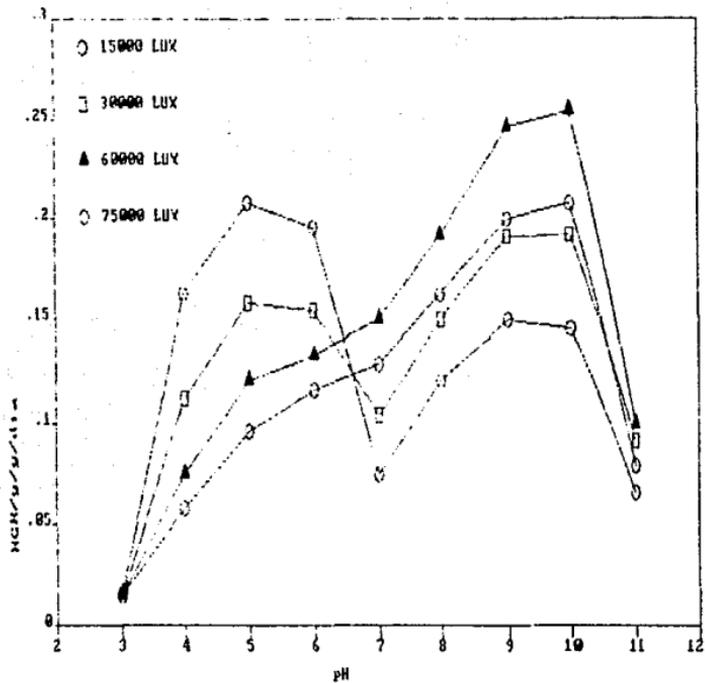


Figura 2. Efecto del pH sobre la tasa relativa de crecimiento (R.G.R.) de *S. filiculoides* cultivado con diferentes iluminancias (Ashton y Walmsley 1976).

Se han hecho otros experimentos de exposición a la luz de varias intensidades por periodos cortos, que muestran que la saturación de la nitrógenasa ocurre aproximadamente a $250 \text{ E/m}^2/\text{seg}$ (20 Klux) Talley y Rains, 1980b), 5 Klux (Ashton 1976) y 10 a 15 Klux (Espinoza 1985). Para experimentos de larga duración, el helecho requiere mayor intensidad luminica que en experimentos de corta exposición, a causa de que las frondas en crecimiento se traslapan.

La tasa de crecimiento de *Azolla filiculoides* se incrementa al aumentar la intensidad de luminosidad hasta un máximo de 50 % de la intensidad de luz natural (49 Klux), pero un mayor incremento la retardo (Ashton, 1974). Talley y Rains (1980 b) observaron una disminución en el crecimiento de *Azolla filiculoides* bajo la luz artificial cuando la intensidad luminica era incrementada de 500 a $1000 \text{ E/m}^2/\text{seg}$ (aprox. 80 Klux; la temperatura en el proceso era mayor a 25 C.

En condiciones de campo, en la mayoría de las especies de *Azolla* no es necesario la Luz solar completa para un crecimiento óptimo (Talley y Rains 1981). Para un invernadero durante el verano es suficiente del 25-35 % de la totalidad de la luz del sol. El crecimiento de *Azolla* en combinación con el arroz puede detenerse por insuficiencia de luz durante la etapa del cultivo de las plantas de arroz. *A. caroliniana* tolera las bajas intensidades de luz y el ataque de hongos y una pequeña cantidad de ella sobrevive debajo de la totalidad de arroz hasta la maduración de la cosecha. Esto puede ser una ventaja para su uso.

El sombreado, que reduce la intensidad luminosa, la temperatura del agua y aire es provechoso para el crecimiento de *Azolla pinnata* durante el verano (Watanabe, 1982).

En resumen parece que una intensidad luminica elevada tiene efectos deletérosos en el crecimiento de *Azolla*, pero el sombreado es favorable en la estación seca (Watanabe, 1981).

Azolla pinnata, *A. mexicana* y *A. caroliniana* presenta una coloración rojiza cuando es sometida a la luz solar intensa, pero permanecen verdes en la sombra (Watanabe, 1982).

5.3 Humedad.

La humedad relativa óptima para el desarrollo de *Azolla* oscila entre 85-90 %.(Zhejiang Academy Agric.Sci., 1975). A una humedad relativa menor a 60 % esta especie presenta un aspecto seco y frágil siendo más susceptible a las condiciones adversas (Watanabe, 1982).

En condiciones de campo , aunque el control del agua sea magnifico reduce las áreas en las cuales *Azolla* puede ser cultivada (Berlinger y Johnston 1978). Los efectos indirectos del clima húmedo tropical reducen la posibilidad de un cultivo abundante. Muchos investigadores, sugieren que el alto nivel del agua y la temperatura del aire son los factores más importantes que impiden el uso de *Azolla* (Elkan, 1987 y Lumpkin 1987).

5.4 pH del Medio.

La *Azolla* crece mejor en un rango de pH de 5.5-7.0 (Singh, 1977), pero puede desarrollarse hasta un pH de 10 (Ashton y Walmsley, 1976). En suelos acidos con pH de 3.0-3.5 no hay crecimiento y el inóculo fenece (Singh, 1979).

5.5 Control del agua.

La principal característica para el uso de *Azolla* son los requerimientos de su habitat acuático. Una planta individual puede sobrevivir solamente pocos momentos sobre una superficie seca debajo del sol tropical. También pueda sobrevivir pocos días o una semana sobre relleno del suelo seco. Algunas variedades pueden sobrevivir indefinidamente sobre el lodo húmedo en la sombra pero no se multiplica. En lugares donde el arroz crece sobre el campo sin control de agua (suelos sin riego) el crecimiento de *Azolla* puede utilizarse como abono verde.

Con riego controlado *Azolla* puede crecer en invernaderos y en el campo siempre y cuando se tenga oportunamente el inoculo adecuado para que la producción del campo pueda ser asegurada. Cuando *Azolla* es mantenida y multiplicada todo el año en los invernaderos se requiere de cierta cantidad de agua que debe ser variable durante todo el año

para que *Azolla* pueda mantenerse y multiplicarse. El control del agua es también necesario para evitar un daño debido a la luz o a bajas temperaturas; esto se presenta cuando el nivel del agua es grande, también se puede dar el caso de que la temperatura del agua sea elevada, en este caso lo que se puede hacer es introducir agua fresca en el campo.

Cuando la profundidad de agua es de 2.5 a 5 cm la temperatura es moderada de tal manera es la más conveniente para el crecimiento de *Azolla*.

Cuando una cosecha de *Azolla* se utiliza como abono verde, esta debe ser incorporado dentro del suelo para recuperar una porción significativa de nitrógeno (Lumpkin y Plucknett 1980).

5.5.1 Calidad de agua.

La mayoría de estudios sobre el efecto de la calidad del agua han sido hechos con cultivos en macetas. Para un desarrollo óptimo, el helecho requiere todos los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal normal.

Los macronutrientes tales como fósforo, potasio, calcio y magnesio, son especialmente importantes y producen efectos marcados sobre el crecimiento del helecho si están presentes en concentraciones demasiado elevadas o demasiado bajas.

Dado que la fijación del nitrógeno por el simbiote desempeña también un papel dominante en la regulación del crecimiento del helecho (Ashton 1976). Los micronutrientes tales como hierro, cobalto y molibdeno, que se ha demostrado son esenciales para el proceso de la fijación del nitrógeno han de estar también presentes en cantidades adecuadas en el agua donde crece el helecho (Moore 1969, Talley 1980b). En el hábitat natural del helecho, la disponibilidad de nutrientes está regida por las condiciones químicas existentes debajo de la superficie del agua particularmente en lo referente a pH y oxígeno. Ciertos elementos pueden estar presentes en grandes cantidades, pero debido a inadecuados regímenes de pH y oxígeno, no están disponibles para ser absorbidos por el helecho (Ashton 1976).

Este caso se ha puesto de manifiesto en estudios sobre *A. caroliniana*

realizados en pequeños lagos daneses. El helecho prosperaba donde las aguas presentaban condiciones de anaerobi6s y habia presente hierro en forma ferrosa (reducida) mientras que en los lagos en los que en las aguas no tenian condiciones de anaerobi6s y habia hierro presente en forma ferrica (oxidada) las plantas se tornaban clor6ticas y perecian por carencia de hierro. El desarrollo de *Azolla* no es complejo a menos que se mantenga una circulaci6n constante de gases atmosf6ricos sobre la planta.

El oxigeno, el nitr6geno y el anhidrido carb6nico ejercen sus efectos a trav6s de los procesos metab6licos de la fotosintesis, fijaci6n del nitr6geno y respiraci6n (Ashton 1976 ; Nigel 1977).

Las plantas de *Azolla* son muy fr6giles y susceptibles de romperse si se les toca, de tal manera que la acci6n de ondas y la turbulencia son perjudiciales para *Azolla* (Quintero, 1988).

La fragmentaci6n de las plantas de *A. filiculoides* produce una marcada reducci6n en el tama1o de la planta, la tasa de crecimiento y reducci6n del acetileno de las frondas resultantes tanto en medios libres de nitr6geno como en los que los contienen (cuadro 2).

Tasa de Agitaci6n	Tama1o medio del fragmento (mm) (di6metro)	R.G.R.		Ritmo de producci6n de etileno	
		(g /g /d1a)		(Mmol/gpesof./h)	
		+N	-N	+N	-N
1	20	0.1479	0.1603	1.53	1.71
5	18	0.1254	0.1422	1.45	1.69
25	15	0.1102	0.1236	1.27	1.44
75	5	0.0363	0.0410	0.28	0.31
125	2	0.0118	0.0230	0.14	0.19

Cuadro 2.

Efecto de la intensidad de agitaci6n sobre el tama1o del fragmento resultante, la tasa relativa de crecimiento (R.G.R.) y la actividad nitrogenasa (medida segun la tasa de producci6n de etileno por gramo de material fresco y por hora) en plantas de *A. filiculoides* que crecen en soluciones libres de nitr6geno y que contienen nitr6geno (Ashton 1976).

Por tanto en sitios de aguas abiertas, donde el viento y el oleaje son grandes, y existe un elevado grado de turbulencia *A. filiculoides* presenta escaso crecimiento. En tales masas de agua el desarrollo de manchas de *Azolla* sería muy improbable. (todos estos estudios se han realizado en el medio ambiente donde se desarrolla *Azolla*).

La mayoría de estudios sobre el efecto de la calidad del agua han sido hechos con cultivos en macetas. Un efecto de mucha importancia en este tipo de trabajos es la relación entre fósforo disponible y el pH en el suelo, especialmente los ácidos, que se usan como sustrato donde crece *Azolla*.

A un pH bajo y en suelos con alto contenido de aluminio y hierro, los fosfatos se hacen menos disponibles. Recíprocamente, suelos alcalinos y excesivamente encañados también presentarán disponibilidad de fosfatos reducidos debido a la precipitación de los fosfatos de calcio y magnesio.

La disponibilidad de la mayoría de micronutrientes aumenta con la disminución del pH y puede conducir a efectos tóxicos. El incremento en la solubilidad de Aluminio, hierro y magnesio con el incremento de la acidez causa toxicidad e interfiere con la absorción del calcio, magnesio y otros cationes básicos. En contraste a la mayoría de otros micronutrientes, la eficiencia de molibdeno resulta de un aumento de pH (Lumpkin y Plucknett, 1982).

La salinidad raramente se ha mencionado como un problema en el cultivo de *Azolla* pero Haller et al . (1974) reportaron que el crecimiento de *Azolla caroliniana* cesaba en una solución que contenía 1.3% de sal. Estos autores observaron en 30 localidades, que la *Azolla* creció bien cuando la conductividad del agua varió de 70 a 3080 milimhos.

Le Van y Sobochkin 1963 citados por Quintero 1988, reportaron que *Azolla pinnata* crece adecuadamente en las aguas de un lago que tenía una concentración salina de 160 a 380 mg/l, pero se marchitaba en la solución completa de Knoop (1500 mg/l) y en algunos arrozales donde las concentraciones salinas llegaron a 1480 y 1872 mg/l.

Un incremento de 0.3 hasta 0.9% de sal en solución causó una disminución en el porcentaje de nitrógeno y en el tamaño de la fronda y aumento en el número de raíces en *Azolla filiculoides* (Ce et al

1980 citado por Quintero 1988).

La acción de ondas y la turbulencia reduce el tamaño de la planta, la tasa de crecimiento relativa y la fijación de nitrógeno (Ashton, 1974). *Azolla filiculoides* agitada a 5 rpm produjo plantas de 18mm, su velocidad de crecimiento relativo fue de $0.142 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y la actividad de reducción de acetileno fue de $1.7 \text{ micromol g}^{-1}$ de peso fresco h^{-1} respectivamente (Ashton, 1974). Según Becking, (1979) la manipulación de las frondas disminuye la actividad de reducción del acetileno en comparación con frondas no perturbadas, en tanto que el burbujeo, en medio de Jensen libre de nitrógeno, es un factor negativo en el proceso de propagación de *Azolla* sp (Ferrera-Cerrato, 1980).

5.6 La Interacción entre *Azolla* y el Medio Ambiente.

El desarrollo de un manchón de *Azolla* sobre una superficie de agua y su persistencia durante un periodo largo de tiempo produce cambios drásticos en el agua situada debajo del mismo. Ya que este manto constituye una barrera física que impide el paso del aire al agua, la penetración de la luz y aumenta la sedimentación de materia orgánica. Se fomentan los procesos de putrefacción y pueden aparecer condiciones totalmente anaeróbicas. Los factores ambientales ejercen acción sobre *Azolla* que actúa de diversos modos, y responde a las variaciones de luz, turbulencia, pH y disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Ashton 1976).

Un ejemplo del efecto del ambiente sobre *Azolla* y a su vez de *Azolla* sobre el ambiente quedó aclarado por los estudios hechos en el pantano Hendrik Verwoerd en Africa del Sur (el mayor lago artificial construido por el hombre). En este lago se han desarrollado manchas de *Azolla*, pero se demostró que no hay problema ya que las plantas que entran al pantano por las corrientes tributarias son dispersados y fragmentados por el viento y el oleaje y, de ordinario desaparecen. En las corrientes tributarias sin embargo existen tramos de hasta 1.4 Km de longitud completamente cubiertos de manchas de crecimiento formadas por varias capas de *Azolla* durante periodos de hasta 6 meses del año (Ashton 1976).

El reconocimiento sistemático de las condiciones reinantes debajo de estas manchas ha demostrado que las plantas de las capas inferiores de las mismas se hallan en estado de proliferación y las aguas subyacentes son anaeróbicas, tales aguas contienen elevados niveles de nutrientes, particularmente fósforo, manganeso, hierro y nitrógeno procedentes de los sedimentos y de la descomposición de las plantas por acción química y bacteriana. La liberación de estos nutrientes en las aguas estimula el crecimiento de las plantas de *Azolla*, con la consiguiente extensión de la mancha. La figura 4, muestra esquemáticamente los factores interactuantes que afectan al desarrollo de *A. filiculoides* en estas condiciones (Ashton 1976 ; Fitter 1981).

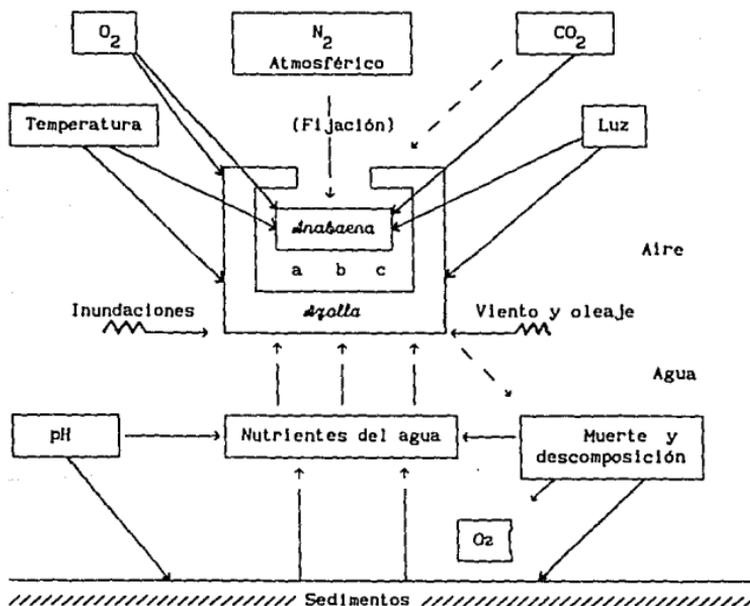


Figura 4. Principales factores ambientales que influyen en la asociación *Azolla-Anabaena*. a=sustancia nitrogenadas; b=nutrientes; c=sustancias estimulantes del crecimiento.

Debajo de las manchas, de crecimiento el medio anaeróbico, rico en nutrientes representa un ecosistema limitado a solamente los más resistentes de los blontes. Los peces son incapaces de sobrevivir en las aguas y las poblaciones de insectos acuáticos normales son sustituidas por las que están adaptadas a un ambiente terrestre o semiacuático. Debido a las condiciones casi tropicales de la región, el desarrollo de estas manchas puede tener lugar todo el año (Ashton 1976).

5.7 Requerimiento Nutricionales.

Las concentraciones óptimas de nutrimentos en *Azolla* expresadas en porcentajes de su peso seco son : nitrógeno 4-5 %, fósforo 0.5%, potasio 1.0-2.0 %, calcio 0.5%, magnesio 0.5 %, y hierro 0.1 % (cuadro 3). La nutrición de la planta es muy importante para obtener un abundante cultivo de *Azolla* (Beckling 1979; Chen and Li, 1980; Yatazawa et al. ., 1980; Tang et al., 1984 citados por Elkan 1987).

Debido a que *Azolla* es una planta acuática debe utilizar la mayoría de los nutrientes que se encuentran en el agua. En aguas someras, las raíces se fijan al suelo y absorben los nutrientes de el. El nutriente de mayor importancia es el fósforo (Fitter 1981), (Subudhi y Watanabe 1981 ; Watanabe y Ramírez, 1984 citados por Elkan 1987).

Azolla con deficiencia de fósforo presenta una coloración café rojiza, las frondas son frágiles raíces alargadas y septadas de tal manera que la planta es menos vigorosa. Las células de *Anabaena azollae* presentan un color verde pálido y una deformación. En *Azolla mexicana* el cambio a color café se presenta en las frondas viejas y en las partes basales en las otras especies. El rojizo intenso que a veces presentan los lóbulos dorsales se debe a una deficiencia de calcio; las frondas de estas plantas se fragmentan con mayor facilidad y las células de las cianobacterias se pierden de la cavidad.

Cuando la *Azolla* sufre de una deficiencia de hierro, el contenido de clorofila disminuye y la planta presenta un aspecto amarillento.

En condiciones de campo al presentarse este problema los fertilizantes fosforados pueden ser usados agregándose al agua o ponerlo directamente en la raíz de *Azolla*. En el campo el cultivo generalmente

COMPOSICION MINERAL DE AZOLLA

(Quintero, 1980 ; Lumpkin y Plucknett, 1980)

Especies	Condiciones	Porcentaje en materia seca						Referencias
		N	P	K	Ca	Mg	Fe	
A. filiculoides	Cultivo en agua	-	0.79	6.5	0.25	0.30	-	(Tuzimura et al., 1957)
A. filiculoides	Cultivo en suelo	-	0.95	1.6	1.0	0.36	-	(Tuzimura et al., 1957)
A. filiculoides	Naturales	4.5	0.50	2.0	0.97	-	0.1	(Buckingham et al., 1978)
A. Pinnata	Naturales	4.5	0.5-0.9	24.5	0.4-1.0	0.5-0.6	0.06-0.26	(Singh, 1979)
A. filiculoides	Naturales	2.0-3.4	0.1-0.4	2.0-2.6	0.6-0.0	0.4-0.6	0.3-0.5	(Lumpkin y Plucknett, 1980)
A. Pinnata	Cultivo en agua	5.0	1.0	3.2	0.2	0.7	0.0	(Watanabe, datos no publicados, citados por
	(deficiente)	-	(0.00)	(0.4)	(0.05)	-	0.016	Watanabe, 1902)
A. filiculoides	Cultivo en agua en charolas	2.5-4.02	0.22-1.0	4.0-4.4	0.54-1.2	.36-.47	-	Quintero, 1980
A. microphylla	Cultivo en agua en charolas	2.9-3.7	.20-2.53	4.6-4.5	.55-1.2	.25-.46	-	Quintero, 1980
A. caroliniana	Cultivo en agua en charolas	2.3-4.3	.31-2.1	5.3-5.9	.75-1.0	.37-.61	-	Quintero, 1980

requiere la aplicación de 0.5 a 1.0 Kg P/ha/día (Elkan 1987). Este mismo autor indica que la aplicación de fósforo a *Azolla* aumenta su crecimiento y este a su vez podrá ser usado por el arroz, después de la incorporación de *Azolla* en el suelo en donde se efectúa su descomposición y el fósforo empieza a ser disponible para la cosecha de arroz (Elkan 1987).

La aplicación de 1Kg de fósforo a *Azolla* resulta en la fijación de 5 a 10 Kg de nitrógeno por *Azolla* y el contenido de fósforo en *Azolla* puede conservar un mínimo para el máximo nitrógeno (aproximadamente 0.25%.P para 4% N sobre el peso seco básico) 1kg de fósforo podría ser suficiente para 16 Kg de nitrógeno (promedio de 1 : 16). *Azolla* debe ser fertilizada con una fuente soluble de fosfato tal como ácido fosfórico o super fosfato triple (Talley y Rains 1981).

El goteo de la solución de fósforo dentro del agua de riego o la adición de una pequeña cantidad de superfosfato causa una pérdida mínima de fósforo al fijarse este elemento en el suelo. Además del 1 al 2 % de la solución de fósforo puede ser rociado sobre *Azolla* en áreas donde la fijación y la lixiviación son severas. La manera más eficiente para utilizar fertilizante fosfatado en la multiplicación de *Azolla* es en lagunas de invernadero. El fósforo presente en el suelo puede ser utilizado por las plantas de arroz o cualquier otro tipos de plantas para su crecimiento, durante su cultivo. En suelos infértiles *Azolla* responde a la aplicación de otros nutrientes tales como el potasio y calcio, así como a la adición de una pequeña cantidad de molibdeno y o fierro (Rains y Talley 1979) los que determinan el incremento en la fijación de nitrógeno de *Azolla*.

Cuando el fósforo y el hierro son adicionados al agua de riego en el cultivo de arroz en California *Azolla* crece y fija nitrógeno y este proceso puede ser significativo para el cultivo de *Azolla* (fig 5).

Azolla filiculoides en una fase de crecimiento exponencial puede contener fósforo que es igual al 1 % del tejido seco en peso. Cuando el contenido de fósforo del tejido esta abajo de 5%, el contenido de fósforo y nitrógeno pueden ser posiblemente correlacionados (cuadro 4). Cuando el fósforo del tejido de *Azolla* tiene una baja de 0.2 % de peso seco el crecimiento y el contenido nitrógeno son severamente afectados. El crecimiento máximo de *Azolla* y la fijación de nitrógeno

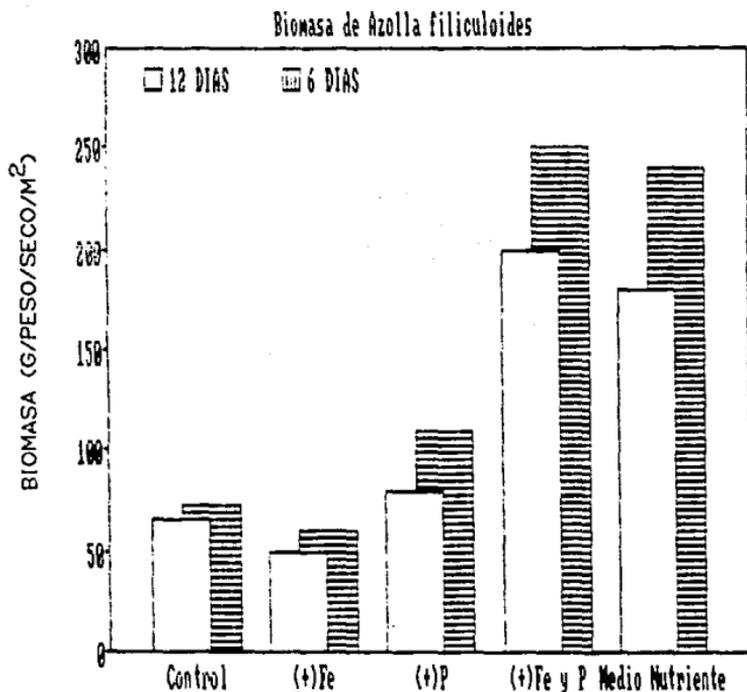


Figura. 5. La biomasa de *Azolla filiculoides* creciendo en recipientes de plástico y varios nutrientes suplementarios. El Experimento utilizó 1.2 g peso fresco de *Azolla* en la inoculación, equivalente a 22 Kg de peso seco * ha, 1.2 Kg de N/ ha, 0.09 Kg P/ha.acabo con tres muestras en el campo. Talley, y Rains, 1981.

se obtiene con 0.8 mg P.L^{-1} . En este intervalo la aplicación de 38.4 mg P sobre la superficie del agua en una área 240 cm^2 con un período de crecimiento de 35 días lleva a cabo la fijación de 193 mg N , obteniéndose una relación de nitrógeno a fósforo de 5-1 (fig 6).

El requerimiento de hierro para *A. filiculoides* puede ser tan bajo como $20 \text{ micro gramos Fe}^{-1}$ como Fe-EDTA (fig 7). Estudios de campo indican que $0.15 \text{ Kg Fe ha}^{-1}$ como Fe-EDTA o citrato de Fe, o $1.0 \text{ Kg Fe.ha}^{-1}$ como $\text{FeSo}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ son suficientes para satisfacer los requerimientos de fierro de la cosecha de *A. filiculoides*, de *A. caroliniana* y de *A. mexicana* si además se aplica por cada 32 días durante 10 días. Para realizar la fertilización en el campo de los elementos fierro y fósforo se utiliza un avión si el área es muy grande (Talley y Rains 1981).

CUADRO 4 (Talley and Rains, 1981)

Concentración media del nutriente fosforo (mg/l)	Contenido de P en el tejido (x de peso seco)	Contenido de nitrógeno en el tejido (x de peso seco)	Biomasa (g de peso seco/m ²)
0	0.106±0.001	3.77±0.03	29.07±4.41
0.1	0.107±0.002	3.65±0.04	31.27±1.32
0.2	0.129±0.004	4.03±0.01	37.44±3.52
0.4	0.179±0.003	4.39±0.04	46.25±3.50
0.8	0.276±0.000	5.11±0.14	49.78±4.85
1.6	0.426±0.003	5.43±0.20	55.94±6.61
3.1	0.664±0.003	5.30±0.16	59.03±0.98
6.2	1.007±0.040	5.44±0.16	61.61±3.00
12.4	1.046±0.024	5.55±0.16	63.43±2.64
49.6	-	5.59±0.22	-
99.2	0.961±0.012	5.53±0.16	-
198.4	0.997±0.030	5.49±0.12	-

El promedio y la desviación estandar para el contenido de fosforo, de nitrógeno en el tejido y biomasa de *Azolla filliculoides* creciendo en un rango de concentraciones de fosforo en el invernadero por 10 días durante agosto de 1970.

Azolla fue inoculada en la cantidad de 1.2 gr peso fresco/muestra (5 gr de peso fresco o 3.31 gr. de peso seco/m²).

El medio nutriente fue cambiado cada 70 a 90 horas. las muestras fueron sacadas en tercías.

6. TASA DE CRECIMIENTO.

Como planta acuática de flotación libre que se reproduce vegetativamente por fragmentación, *Azolla* tiene el potencial de mantener una tasa de crecimiento exponencial en condiciones óptimas. En condiciones ideales en el laboratorio y en el fitotron se han obtenido tasas de crecimiento relativas (TCR) que van de 0.355 a 0.390 y 0.277 g⁻¹ día⁻¹ con un régimen de temperatura de 15-25 C (Peters et al., 1980b).

En experimentos en macetas al aire libre y en campo en China se obtuvieron tasas de crecimiento relativas, para siete especies de *Azolla* que fluctuaban desde cero en invierno hasta cerca de 0.260 gg⁻¹ día⁻¹ durante el fin de la primavera (Cuadro 5). La solución nutritiva se cambió en un período de 7 a 14 días dependiendo de las tasas de crecimiento relativas (Lumpkin y Plucknett, 1982).

En la región central costera del estado de Veracruz, Pérez (1988) obtuvo la máxima tasa de crecimiento medio relativa con una combinación de 50 Kg de P₂O₅ ha⁻¹ y 100 % de radiación solar (0.120 g g⁻¹ día) y la mínima con la combinación de 50 Kg de P₂O₅ ha⁻¹ y el 50% de radiación solar (0.078 g g⁻¹ día⁻¹).

El tiempo de duplicación de *Azolla* en el ambiente controlado de una "Fabrica de *Azolla*" o bajo condiciones de laboratorio puede ser reducido a 30 horas, valor difícil de alcanzar o mantener en cultivos a nivel de campo (Lumpkin y Plucknett, 1982).

Varios compuestos que regulan el crecimiento de *Azolla* han sido probados por numerosos investigadores(Cuadro-6). La mayor parte de esas investigaciones fue dirigida para utilizar compuestos del tipo de herbicidas contra *Azolla*, excepto el ácido giberélico que se aplico para mejorar la tolerancia del helecho al calor y el ácido 2-piridinhidroximetansulfónico (PHMSA) que se aplico para disminuir la respiración de *Azolla* y así incrementar su productividad (Lumpkin y Plucknett, 1982). Además de los compuestos mencionados en el cuadro 6, se encontró que concentraciones al 2% de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa en la solución nutritiva incrementan la tasa de crecimiento de *Azolla* (Quintero, 1988). Ciertos azúcares incrementan la productividad de *Azolla* hasta 183% sobre el control libre de azúcar (Kim y Kim 1987 citado por Quintero 1988).

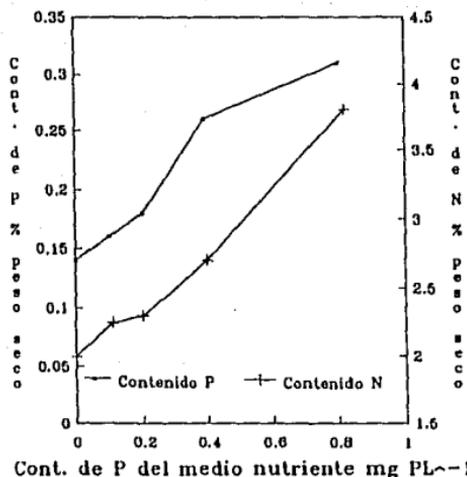
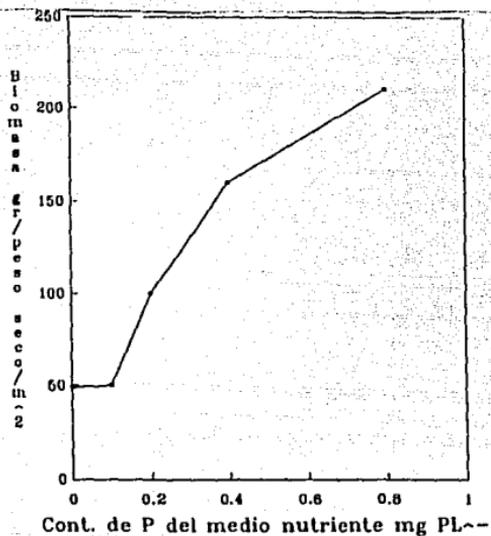


Fig. 4. El contenido de Nitrógeno y Fósforo en la Biomasa de *S. helveticus* creciendo en un gradiente de fosfato, durante 26 días en un incubador de vapor cerrado modelo de *Applha* 12g.

▲ = Contenido de Fósforo (% peso seco).

○ = Contenido de Nitrógeno (% peso seco) (Talley y Rains 1980).

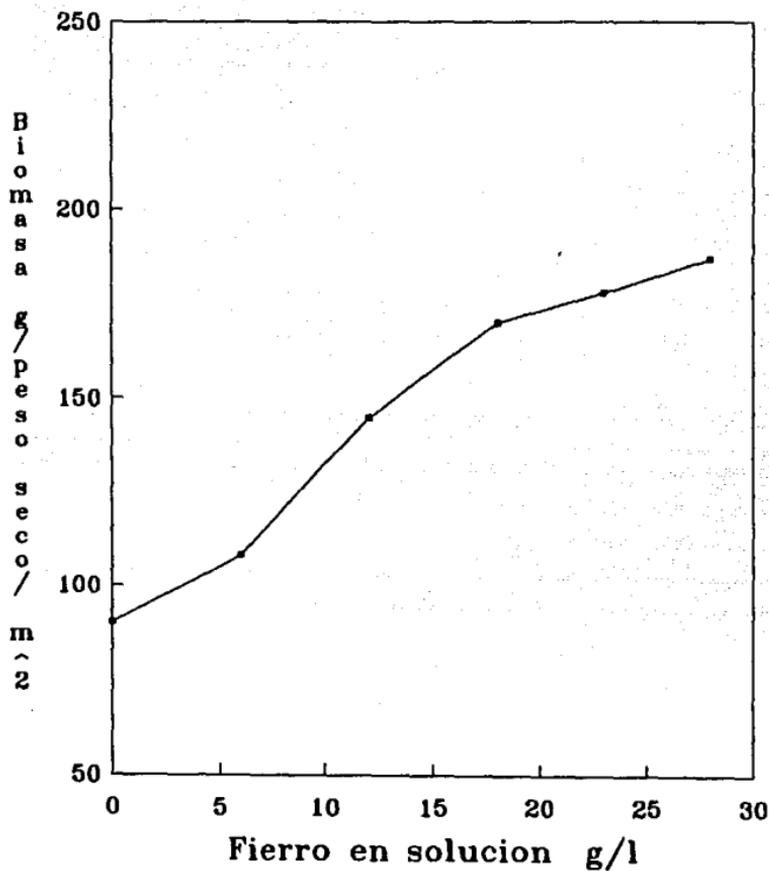


Fig. 7. El contenido de hierro en la Biomasa de *S. blattodeus* creciendo en un gradiente de hierro durante 26 días en un microambiente en la cueva de *Agrotis*.

A. - Hierro en solución (µg / l) Molloy y Earis 1981.

CUADRO 3 TASA DE CRECIMIENTO MÁXIMO (gg⁻¹ día⁻¹) OBTENIDAS DURANTE EXPERIMENTOS EN MACETAS AL AIRE LIBRE Y EN CAMPO EN HANGZHOU CHINA (Lumphin et.al. 1982).

ESPECIE	CULTIVO EN MACETA ¹		CULTIVO EN CAMPO ²
	gg ⁻¹ día ⁻¹		
<i>Azolla caroliniana</i>	0.256±0.019		0.186±0.042
<i>Azolla filiculoides</i>	0.260±0.009		0.186±0.017
<i>Azolla microphylla</i>	0.254±0.015		0.185±0.025
<i>Azolla mexicana</i>	0.243±0.014		-
<i>Azolla nilotica</i>	0.220±0.018		-
<i>Azolla pinnata</i>	0.252±0.005		0.185±0.023
<i>Azolla rubra</i> (Japonica)	0.176±0.020		0.144±0.007

Fecha: ¹Septiembre, 26-Oct-3, 1980 (temperatura media diaria del agua 23.3°C, humedad relativa media 67.4 %).

²Mayo 24-30, 1980 (temperatura media del agua 24.8°C, humedad relativa media 53.9 %).

7 FIJACION DE NITROGENO.

7.1 Introducción.

El nitrógeno en la atmósfera se encuentra en forma de gas diatómico (que contiene 2 átomos de Nitrógeno) denominada dinitrógeno o nitrógeno molecular (N₂) es un elemento abundante en la naturaleza y en forma elemental constituye casi el 80% de la atmósfera terrestre, es un escaso recurso nutricional debido a que es inerte e inútil para la mayoría de los organismos; presenta un triple enlace químico fuerte y estable, que une a los átomos y que requiere gran cantidad de energía para romperse (Brill. 1977; citado por Ortega.1989).

En la agricultura se considera un factor importante para la alimentación humana, ya que un suministro inadecuado de este en las plantas y en los animales es la limitante más común en el desarrollo, debido a que es un constituyente esencial de las proteínas que son requeridas por todas las formas de vida en grandes cantidades (Brill 1977; citado Ortega 1989).

Tasa de crecimiento, biomasa máxima y fijación de nitrógeno en condiciones óptimas son indicadores del potencial de la simbiosis de *Azolla-anabaena*. La tasa de fijación de nitrógeno se puede estimar a partir de la tasa de crecimiento relativo y del contenido del nitrógeno del helecho. Si se supone una tasa de crecimiento relativo diario de 0.277(o sea 2.5 días de tiempo de doblaje) y un porcentaje de nitrógeno de 4% en la materia seca, la tasa de fijación de nitrógeno diaria es de 11.0 mg Ng⁻¹ de peso seco (Watanabe, 1982).

La curva de crecimiento de *Azolla* sigue una curva sigmoide aproximadamente hasta que la biomasa alcanza el máximo. La tasa de crecimiento disminuye a medida que la densidad del cultivo en el medio líquido se incrementa (Ashton, 1974). La biomasa máxima y la acumulación de nitrógeno reportada por algunos investigadores se resume en el cuadro 7.

Azolla filiculoides forma una capa gruesa superficial por lo que su biomasa es mayor que la de otras especies (Watanabe, 1982). Aparentemente no hay datos sobre la biomasa máxima de *Azolla nitolica*. La máxima fijación de nitrógeno de *Azolla filiculoides*, *Azolla*

CUADRO 6. EFECTO DE SUSTANCIAS QUIMICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Azolla*
(Quintero 1988; Lumpkin y Plucknett 1980).

Compuesto	Fuente	Observaciones
GA (Giberilina)	(1)	Reduce el número de raíces y las que presenta semejan a tentáculos.
	(2)	Inhíbe la fragmentación, letal a 100 mg/l en 7 días.
	(13)	El crecimiento aumenta en 21 % a 1 ppm tolerancia incrementada a alta temperatura estimulatoria a 0.1 ppm, inhibitoria a 1 ppm o más.
IAA (Acido Indolacetico)	(1)	Estimulatorio a 0.1 ppm, inhibitorio a 1 ppm o más.
	(2)	1 mg/l reduce la fragmentación, 10 mg/l incrementa la fragmentación, letal a 100mg/l en 24 horas.
IAA + GA	(2)	El efecto de fragmentación de 50 mg/l de IAA suprimido por 1-10 mg/l de GA.
MH (Hidrazida maleico)	(1)	Fuerte inhibición del crecimiento.
	(2)	No afecto el crecimiento, excepto con, efecto letal a 10 mg/l en 48 horas.
PHMSA* (Acido 2-piridilhidroxi- metansulfónico)	(15)	Inhíbe la actividad de la glicolato oxidasa, promueve la fotosíntesis y la producción de materia seca, reduce el contenido de proteínas.
Estudio de herbicidas.		
Diquat	(8)	Efectivo, 0.25 - 1.0 ppm rocío foliar.
Paraquat	(5)	Efectivo, 0.56-2.24 Kg/ha.
Diquat/Paraquat	(3)	Clorosis y muerte a 0.05- 1.0 ppm, se acumulan gránulos de almidón y glóbulos osmiofílicos.
Amitrol	(9)	Efectivo, 100 % clorótico a 1.0 ppm
	(10)	Efectivo despues de 9 días, rocío diario de 1000 ppm.
Aresina	(11)	Efectivo despues de 20 días, rocío diario de 1000 ppm.

Cont....

Cuadro 6 (cont.)

Compuesto	Fuente	Observaciones
Vitamina C	(13)	Aumento del crecimiento en 33 % a 10 ppm.
Vitamina B ₁₂	(13)	Aumento del crecimiento en 33 % a 1 ppm.
Vitamina B ₆	(13)	Aumento del crecimiento en 27 % a 5 ppm.
Diesel	(5)	Adecuado con PCP.
	(6)	Efectivo, aplicación foliar, con agua 1 : 1
Keroseno	(12)	Efectivo , 5 litros de Keroseno + 0.5 Kg de surfactante/ha

• Acido 2 - piridilhidroximetasulfónico..

Fuente:

- (1) Nickell, 1961.
- (2) Dusek y Bonde, 1965.
- (3) Lang y Seaman, 1964.
- (4) Cohn y Renlund, 1953(citado por: Lumpkin y Plucknett, 1982)
- (5) Mathews, 1963.(citado por Lumpkin y Plucknett, 1982).
- (6) Oosthuizen y Walter, 1961.
- (7) Kleinschmidt, 1969.
- (8) State of Florida, 1973(citado por Lumpkin y Plucknett, 1982).
- (9) Blackburn y Weldon, 1965.
- (10) Khare 1977.
- (11) Khare, 1979.
- (12) Dlatloff y Lee, 1979.
- (13) Kim y Kim, 1967.
- (14) Wang Shi-zhou, 1980.
- (15) Nguyem et al . , 1978.

pinnata, en campos arroceros de Filipinas alcanzó según Watanabe (1982) 2.8 y 3.1 Kg de N ha⁻¹ respectivamente.

Los valores del cuadro 7, fluctúan desde 1.0 a 2.6 Kg de N ha⁻¹.

Veintiseis cultivos de *Azolla* rindieron 450 Kg de N ha⁻¹ en 330 días en un campo arrocero (Watanabe et al., 1980). Singh (1979), sin embargo, señala que es posible alcanzar una producción anual de 333 toneladas de peso fresco por hectárea, con cosechas semanales, por lo que la producción anual de nitrógeno sería en este caso de 840 Kg de N ha⁻¹. En 45 días es posible obtener entre 93 y 152 Kg de N ha⁻¹ (Shen et al. .., 1963; citado por Watanabe, 1982). La tasa de fijación de *Azolla* es superior a las leguminosas forrajeras (Nutman, 1976; citado por Quintero y Ferrera Cerrato 1988). Los datos anteriores reflejan el tremendo potencial de *Azolla* como cultivo fijador de nitrógeno.

BIOMASA MAXIMA Y TASA PROMEDIO DE FIJACION DE NITROGENO

(Quintero, L. R., 1968)

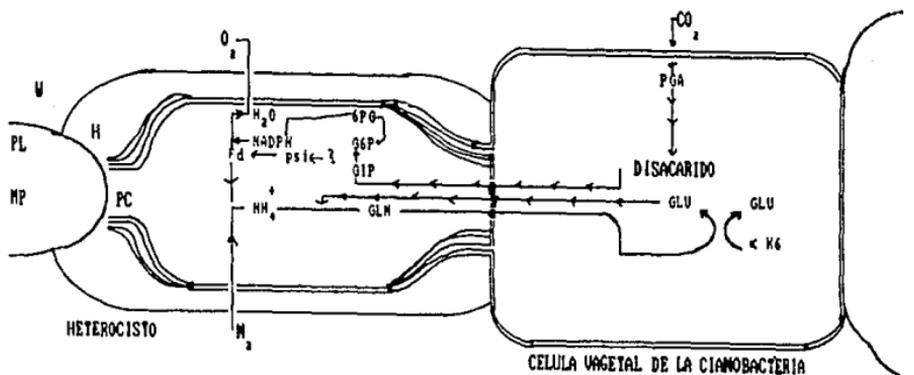
ESPECIE	CONDICIONES	BIOMASA MAXIMA		TASA PROMEDIO DE FIJACION DE NITROGENO		REFERENCIAS
		MATERIA SECA (KG/ha)	CONTENIDO DE NITROGENO (KG/ha)	DIAS	(KG/ha/día)	
A. filiculoides	Barbecho en arrozal, USA.	1700	92	35	1.5	(Talley y Rains, 1960a)
	Estanque poco profundo, USA.	1020	105	7	-	(Talley et al. 1977)
	Suelo de arrozal en parcelas.	3200	120	50	2.6	(Tuzimura et al. 1957)
	Barbecho en arrozal, USA.	2100	93	46	2.0	(Talley y Rains, 1960b)
A. mexicana	Estanques, USA	820	39	39	1.0	(Talley et al. 1977)
	Campo arrozero, USA	1100	38	7	-	(Talley y Rains 1960a)
A. pinnata	Barbecho en arrozal, Filipinas	900-1200	40	30-35	1.9-1.6	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)
	Fitotrons					
	26°C (d) 110°C (n)	2170	96	37	2.6	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)
	33°C (d) 125°C (n)	1500	73	22	1.5	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)
	37°C (d) 125°C (n)	11200	70	23	1.3	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)
	(variedad Africana)	640	26	15	1.0	(Royer y Reynaud, 1976)
	Invernaderos					
A. filiculoides	26°C (d) 110°C C(n)	3200	126	51	2.5	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)
A. caroliniana	26°C (d) 110°C C(n)	3190	146	41	3.6	(Watanabe, DNP citado por Watanabe, 1982)

d = día ; n = noche ; DNP = Datos no publicados.

7.2 Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno Atmosférico.

7.2.1 Fijación de Nitrógeno en el Heterocisto y Célula Vegetativa de la cianobacteria.

FIJACION DE NITROGENO



En el diagrama 1 se ilustra las principales y diferentes estructuras de un filamento de un alga señalando las interacciones entre un heterocisto (izq) y células vegetativas (derecha), (Wolk 1979).

Los heterocistos presentan una pared (w) que tiene una envoltura o capa externa de glucolípidos (L) y una capa de polisacáridos homogéneos (H).

Microplasmodesmata (Mp) se asocia a la membrana del plasma (pl) de las dos células que se tocan al final del canal del poro (PC) de el heterocisto (Wolk, 1979).

Un disacárido formado por fotosíntesis en las células vegetativas se mueve dentro del heterocisto y puede ser entonces metabolizado a glucosa 6 fosfato (G6F) y oxidado por la vía oxidativa de pentosa fosfato a nucleótido piridina (NADPH) reducido, por esta vía, puede donar electrones al O_2 para mantener las condiciones reducidas dentro del heterocisto y puede reducir a la ferredoxina (Fd), (Turpin 1988; Zumft, 1981; Springer, 1988; Flugge . 1982; Winklenbach 1973 Kennedy

1979).

La ferredoxina es reducida por el fotosistema I. Esta ferredoxina reducida dona electrones hacia la nitrogenasa que reduce al N_2 a la forma de NH_4^+ . El amonio se une a los fotosintatos para originar la glutamina (Ray 1978; Sestak 1985; Kennedy 1979).

La GLUTAMINA dentro de las células vegetativas reacciona con alfa ceto glutarato para formar 2 moleculas de GLUTAMATO. (Scott 1978).

La asimilación de Nitrogenó fijado en microorganismos se cree que se lleva a cabo mediante las siguientes Reacciones. (ver diagrama 2).

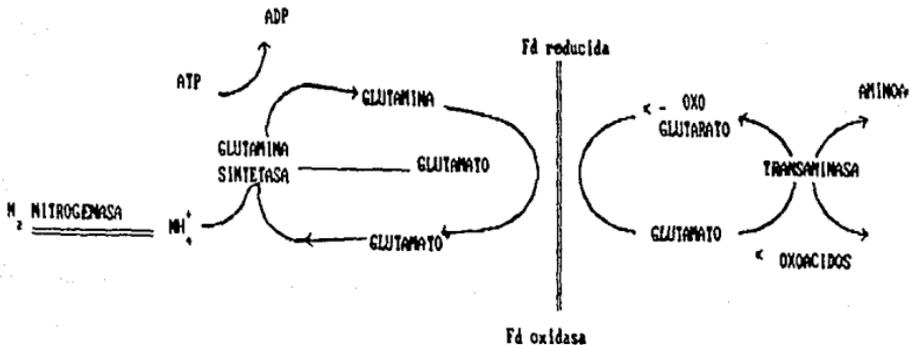
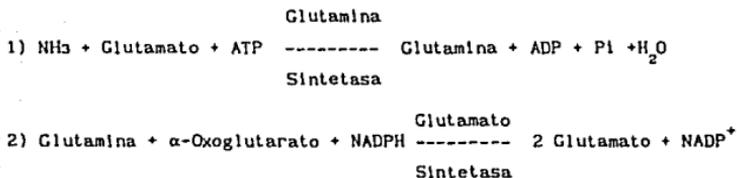


Diagrama 2. Ruta de asimilación del dinitrógeno en las cianobacterias (Toempest.et al 1970; Lea y Miflin 1974; Beevers 1981).

7.2.2. Composición Química de la Nitrogenasa

La molécula clave en la fijación de nitrógeno, es, la enzima "Nitrogenasa" la Mayoría de los organismos fijadores de nitrógeno la contienen y aunque hay considerable homología, su estructura varía significativamente de una especie a otra. (Brill 1977; citado por Ortega 1989).

La nitrogenasa está constituida por dos componentes proteicos y un cofactor:

Componente I. (proteína Mo-Fe), tiene un P.M. de 200,000-270,000 daltones; está formado por 4 subunidades de proteína .

Cada una de ellas es una cadena sencilla de aminoácidos, contiene 24 átomos de hierro, 2 átomos de molibdeno (cofactor) Fe-Mo-Cofactor. (Brill 1977; Burris 1987 ; Evans 1987 ; Dart 1971; citados por Ortega 1989) ; Lehninger 1978).

Componente II. (proteína Fe-Azoferrodoxina) tiene un P.M. de 55 000 -67 000 daltones; esta formado por 2 subunidades de proteína contiene 4 átomos de Fe y 4 átomos de azufre el centro Fe-S parece constituir el centro catalíticamente activo, del componente II (Berkum, 1988; Brill, 1977; Burris, 1978; Evans. 1975; citados por Ortega 1989).

El cofactor contiene dos átomos de Mo y una parte de los átomos de Fe del componente I. (Evans 1976, Berkum 1988; Brill ; citados por Ortega 1989).

Una peculiaridad del sistema nitrogenasa es que ambos componentes proteicos de la enzima son desnaturalizados irreversiblemente por contacto con el O₂, es decir, la actividad de la enzima no puede ser restaurada por la extracción del O₂ o por la adición de agentes reductores fuertes. (Brill. 1978 ;citado por Ortega 1989; Scott. 1978).

7.2.3. Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno de la Actividad Nitrogenasa y de la Glutamina Sintetasa.

La molécula crucial en la regulación de la síntesis de la nitrogenasa y la fijación de nitrógeno es la enzima glutamina sintetasa (Lea y Miffin 1975).

La glutamina sintetasa participa en aspectos importantes del metabolismo del nitrógeno; Su papel principal es catalizar el primer paso en la síntesis de los aminoácidos, a partir del NH_3 derivado de la fijación de nitrógeno o de alguna otra fuente (Strayer 1982; Wolk 1979; Scott 1978; Kennedy 1979 ,Shanmugan 1978).

El diagrama 3.(Ortega. 1989,Emerich,1980), ilustra la bioquímica de la fijación de nitrógeno, la actividad nitrogenásica y el papel de la glutamina sintetasa.

Como puede verse, el primer evento que guía la fijación, es la reducción del componente II, causado por una proteína transportadora de electrones, externa a la nitrogenasa. El componente II, una vez reducido reacciona con el ATP (energía consumida en el proceso de fijación) es derivada de la ruptura de la glucosa u otros carbohidratos y se suministra en la forma de ATP, la fuente de energía de la célula (Ortega. R. S. 1989) y luego reduce al componente I, que finalmente reduce al nitrógeno molecular formando NH_3 .

En otras palabras, El componente II primero aceptó electrones de una proteína transportadora, luego estos electrones son transferidos al componente I y de aquí al nitrógeno para formar NH_3 , el cual se combina con compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis, y por acción de la glutamina sintetasa forma glutamina y otros aminoácidos que son incorporados dentro de las proteínas de las plantas.

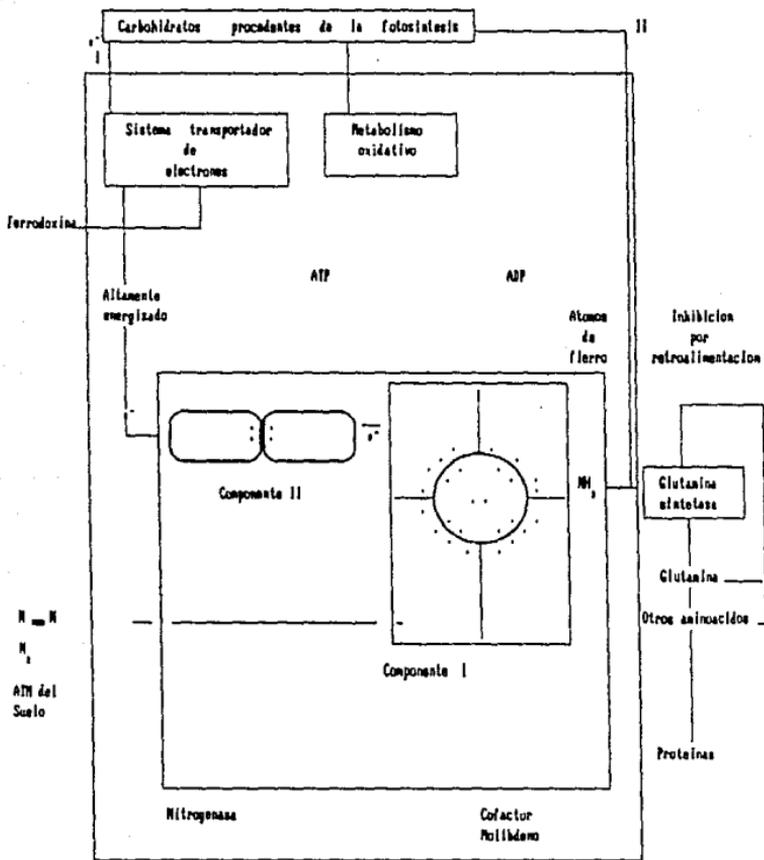


Diagrama 7 : BIOQUÍMICA DE LA FIJACION DE NITROGENO, DE LA ACTIVIDAD NITROGENASA Y DE LA GLUTAMINA SINTETASA. (Orlago, 1969; Kennedy, 1979 y Emrich, 1980).

7.3 Actividad de la Nitrogenasa.

Azolla contribuye con la actividad fotosintética para *Anabaena azollae* y ésta provee de compuestos nitrogenados para el sistema simbiótico (Van Hove et al. ., 1982). Los microorganismos fijadores de nitrógeno como es el caso de la cianobacteria *Anabaena azollae* poseen un sistema multienzimático llamado nitrogenasa, el cual puede disociar las moléculas de dinitrógeno, que son muy estables, y reducir las a dos moléculas de amoníaco con la ayuda de una fuente apropiada de energía y electrones. La reacción es como sigue:



La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, el cual causa su rápida inactivación. El sistema multienzimático nitrogenasa se protege del oxígeno por la especialización de ciertas células llamadas heterocistos, que poseen una pared compleja que aísla al fotosistema productor de oxígeno (Van Hove et al. ., 1982).

Los heterocistos dependen de células vegetativas cercanas para el abastecimiento de carbohidratos; a su vez éstos las proveen con compuestos nitrogenados. Se llega a un balance cuando del 3-5 % de las células están diferenciadas en heterocistos, en *Anabaena azollae* más del 30% llegan a diferenciarse (Van Hove et al. , 1982).

La actividad de la nitrogenasa es afectada por la madurez de la planta y también por la edad de cada fronda (Hill, 1977). Algunos investigadores indican que el reductante provisto por la fotosíntesis previa y fotofosforilación es la fuerza primaria de conducción de la luz dependiente de la nitrogenasa (Peters et al. . 1980a; Becking, 1979).

7.4 Técnicas en la medición de Fijación de Nitrógeno.

7.4.1 Reducción del Acetileno

Una de las técnicas utilizadas como indicador de la actividad de la nitrogenasa (sistema enzimático de fijación del nitrógeno) es la reducción de acetileno, técnica muy sensible de cromatografía de gases, ha demostrado su validez para aclarar las características de la

fijación del nitrógeno por la asociación (Stewart 1986; Becking 1976). La prueba se basa en la capacidad del complejo enzimático que fija el nitrógeno para reducir el acetileno en etileno incluso en presencia de nitrógeno (Stewart, 1980, Ashton 1976).

La nitrogenasa requiere 2 electrones para reducir el acetileno (C_2H_2) en etileno (C_2H_4) y 6 electrones para reducir nitrógeno (N_2) a 2 moléculas de Amoníaco ($2NH_3$). El ritmo de reducción del acetileno es directamente proporcional al ritmo de fijación del nitrógeno y está controlado por los mismos factores fisiológicos y ambientales.

Los datos obtenidos utilizando la prueba han demostrado que las características de la fijación de nitrógeno puestas de manifiesto por la asociación son típicas de la cianobacteria. Tanto la asociación como la cianobacteria aislada son capaces de reducir el acetileno, mientras que no puede hacerlo el helecho libre de la cianobacteria ni tampoco puede mantener el crecimiento en un medio libre de nitrógeno. (Ashton 1976, Gerald 1974, y 1976).

Estudios realizados han demostrado que en *A. filiculoides* hay una íntima relación entre crecimiento y reducción del acetileno (fijación de nitrógeno). Esto significa que si una planta de *Azolla* registra un bajo ritmo de reducción del acetileno puede esperarse que su ritmo de crecimiento sea también bajo. En condiciones ideales *A. filiculoides* registra tasas de crecimiento y reducción de acetileno máximos cuando se cultiva en un medio libre de nitrógeno.

Las necesidades de nitrógeno de la asociación pueden satisfacerse por tanto, más eficazmente por la fijación del nitrógeno atmosférico. Esto indica también que se transfieren de la cianobacteria al helecho cantidades considerables de nitrógeno asimilado. Todavía no se ha determinado la forma y manera en que es transferido este nitrógeno (Ashton 1976).

Anabaena azollae aislada de *A. filiculoides* excreta grandes cantidades de amoníaco en su medio de cultivo. Esto señalaría al amoníaco como la forma de nitrógeno móvil; sin embargo, no se dispone aun de la información sobre las concentraciones de amoníaco dentro de las cavidades de las hojas del helecho. En especies de *Anabaena* que fijan el nitrógeno viviendo libres, la capacidad de reducir el acetileno queda completamente suprimida al cabo de varios días de crecer en un

medio que contiene una fuente de nitrógeno combinado (Ashton 1976, Ito 1983).

Esto ocurre porque el sistema enzimático que reduce el acetileno es inhibido por el nitrógeno combinado del medio. *Anabaena azollae*, en cultivo libre, puede resistir hasta 100 mg/l de nitrógeno amoniacal antes que se produzca una inhibición apreciable de la reducción del acetileno. El metabolismo de la fijación del nitrógeno en *Anabaena azollae* difiere por tanto del de las especies de *Anabaena* que viven libres. En la asociación helecho-cianobacteria se produce una situación similar. Aunque la capacidad de reducir el acetileno está considerablemente reprimida, las plantas de *A. caroliniana* son todavía capaces de reducir el acetileno después de crecer 6 o 7 meses en un medio que contiene nitrógeno.

Es probable que el helecho actúe como un desagüe para los compuestos nitrogenados excretados por el cianobacteria. Por tanto, que el nitrógeno combinado del medio interfiera a este respecto con la acción del helecho ya que este último puede obtener nitrógeno de una fuente suplente. La acumulación de sustancias nitrogenadas excretadas en el microambiente de la cianobacteria y la reducción en la tasa de crecimiento del helecho son 2 factores que conducen probablemente a esta supresión de la reducción de acetileno aunque es también posible, en este caso, la transferencia de compuestos nitrogenados del helecho a la cianobacteria.

Las características de la fijación del N₂ por *Azolla* son, por tanto singulares y demuestran que cualquiera de los 2 organismos asociados puede regir el crecimiento y la actividad metabólica del otro. Ello depende en gran parte del estado del nitrógeno en el medio en que crece la asociación (Ashton 1974).

La actividad de la nitrogenasa en *Azolla* presenta un óptimo de reducción de acetileno con una concentración al 10% de este gas (Becking, 1985; citado por Quintero 1988). Una concentración de 1.0% (v/v) de CO inhibe casi completamente (96%) la reducción de acetileno. El efecto es probablemente causado por un bloqueo sensible del sistema de citocromos de *Anabaena azollae* al monóxido de carbono (Becking, 1985; citado por Quintero 1988).

La reducción de acetileno por *Azolla* durante la noche es sólo de 10 a

50% de la tasa máxima a la luz del día. Los cambios nocturnos en actividad de reducción de acetileno dentro de un cierto límite están inversamente relacionados con la temperatura. Durante las estaciones frías la actividad nocturna es generalmente mayor que durante las estaciones calurosas (Talley y Rains, 1980a).

7.4.2 Método de $^{15}\text{N}_2$.

Se usa en la investigación de muchos aspectos bioquímicos de la fijación de nitrógeno; en el estudio de los factores que afectan la fijación de nitrógeno; en la confirmación de la capacidad de varias especies de microorganismos para fijar nitrógeno; en estudios de translocación del nitrógeno fijado simbióticamente en plantas; en muchos estudios del balance del nitrógeno; en el establecimiento de aspectos cualitativos y cuantitativos y en la calibración de la técnica de reducción de acetileno (Ortega 1989; Stewart 1980; Nethsinghe 1976).

En relación con el costo de $^{15}\text{N}_2$ es mas caro que el de Reducción de Acetileno debido al material y al equipo que necesita y tambien es mas laborioso.

8. FERTILIZACIÓN FOSFATADA.

Azolla tiene una elevada demanda de fósforo por lo que generalmente este es el elemento que limita su crecimiento. Concentraciones de fósforo mayores de 0.23 % y hasta de 1.59 % se consideran como consumo excesivo o de lujo. *Azolla* es capaz de almacenar casi 6 veces el fósforo requerido para su crecimiento normal y fijación de nitrógeno. La capacidad de consumo excesivo de fósforo por *Azolla* debería tenerse presente cuando se trata de emplearla en un sistema agrícola pobre en este elemento; este fósforo debe ser añadido al suelo antes de inocular el helecho en el campo, esto provoca un aumento de 5 a 6 veces la concentración de dicho elemento. La *Azolla* tiene una respuesta muy notable al fertilizante fosfatado y requiere de un continuo abastecimiento de fósforo soluble en el agua para su propagación, rápida.

Las formas de aplicación son variadas y entre ellas se tiene que las aplicaciones divididas de superfosfato son más eficientes en el crecimiento que aplicaciones basales. En Filipinas se recomienda 1 Kg de P_2O_5 ha^{-1} cada cuatro días (Watanabe et al., 1980).

En China se recomienda que las aplicaciones deben hacerse en la superficie a 21 gm^{-2} (Watanabe et al., 1980).

Los vietnamitas recomiendan de 5-10 Kg de superfosfato (1-2 Kg de P_2O_5 ha^{-1}) cada 5 días (Watanabe, 1982).

Aplicaciones de 4-6 Kg de P_2O_5 cada semana se recomienda en la India (Singh, 1979).

En medios acuosos de flujo continuo para determinar el nivel mínimo de fósforo se encontró que a 2 micromoles de $P\ l^{-1}$, *Azolla pinnata* de Bangkok creció normalmente, pero a 1 micromol de $P\ l^{-1}$ presentó síntomas de deficiencia de fósforo (Sabudhi y Watanabe, 1979).

Información analizada en aspectos económicos sobre *Azolla* y la fertilización fosfatada indican que los niveles recomendados varían de 1.8 -11 Kg de $P\ ha^{-1}$ (equivalentes aproximados de 4.1-25.2 Kg de P_2O_5 ha^{-1}), (Cuadro 8) al analizar la información muestran una relación cuadrática entre el nivel de fertilizante fosfatado aplicado y el nitrógeno total fijado. Según estimaciones hechas reportan la siguiente ecuación.

$$N = 14.3 + 1.82 P - 0.389 P^2$$

$$R^2 = 0.930$$

$$n=9$$

Donde N y P están en Kg ha⁻¹

La función anterior indica que *Azolla* fija 14.3 Kg ha⁻¹ de nitrógeno cuando no se le aplica fertilizante fosfatado, pero es lógico suponer que este valor va de acuerdo a las características del suelo (Kikuchi et al., 1984).

En condiciones óptimas cada Kg de P₂O₅ aplicado resulta en dos Kg de N adicionales en la biomasa de *Azolla* (Watanabe et al. , 1980).

Azolla responde notablemente a los fertilizantes fosfatados y requiere de abastecimiento continuo del elemento para su rápida propagación. Talley y sus colaboradores aplicaron fertilizantes fosfatados en una cantidad de 7.2 Kg P/ha como KH₂PO₄ en 4 dosis iguales por 7 días. Ellos concluyeron que por cada Kg de fósforo resulta una biomasa de *Azolla* adicional de 5 Kg de 35 días de crecimiento. Su conclusión es seguida de un reporte de Tuan (1979) que afirman que un Kg de P₂O₅ (440 gr de P) resulta en una cantidad equivalente de *Azolla* a 2.2 Kg de nitrógeno.

Lumpkin y Plucknett (1982) hicieron un experimento de fertilización de *Azolla* con fósforo utilizando 1.5, 3 y 6 Kg de superfosfato (0.3, 0.6 y 1.2 Kg P₂O₅) en una parcela de 8.5 m².

El resultado del incremento del nitrógeno fue de 35, 76, y 190 % respectivamente después de 8 días. Idealmente los fertilizantes fosfatados pueden probablemente ser aplicados en forma de una solución acuosa que es agregada en pequeñas dosis para neutralizar la acidez del agua del campo. En suelos con alta Radiación luminosa y con bajo contenido de materia orgánica y nutrientes minerales Tuan et al. (1979) recomendaron 5 Kg de K₂O /ha (4.1 Kg K/ha) durante 5 días.

Estos autores también sugirieron que los microelementos pueden ser aplicados como cenizas en un porcentaje de 100 Kg /ha durante 5 días. Singh (1977) uso de 5-8 Kg K₂O (4.6-6.56 Kg K) /ha/semana y 50 Kg de ceniza/ha para obtener los microelementos. En otros experimentos (Singh, 1977) añadió 0.125 Kg/ha de molibdeno por mes para aumentar la fijación de nitrógeno.

Talley *et al.* ., (1977) .Obtuvieron una respuesta de crecimiento de *Azolla* muy significativa con una simple aplicación de 0.8 Kg de hierro /ha como EDTA al 0.01 M.

CUADRO 8. NIVELES DE FERTILIZANTE FOSFATADO PARA EL CRECIMIENTO *Azolla*. (Quintero 1988).

País	Cantidad de Fosforo		Recomendado por:
	(KgP ha ⁻¹)	(Kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹)	
India	1.8- 11.0	4.1 - 25.2	Singh, 1979.
China	10	22.9	Liu, 1979.
Vitnam	2.2 - 4.4	5.1 - 10.1	Tuan y Thuyrt, 1979
USA	2.2 - 6.6	5.1 - 15.1	Rains y Talley 1977

Experimentos realizados a nivel de invernadero señalan una mejor respuesta al aplicar 320 Kg de P₂O₅ ha⁻¹ como superfosfato simple de calcio, cosechándose a los 15 días (Ferrato-Cerrato y Miranda, 1982). En medios de cultivos con roca fosfórica 50 mg l⁻¹ y fósforo soluble agregado como K₂HPO₄, 39 mg l⁻¹ se encontró un incremento de 120 % en peso seco durante un período de 30 días; en experimentos con suelo, la fertilización con superfosfato triple (108 mg de P₂O₅ Kg⁻¹ de suelo) permitió un incremento de 205 % en la biomasa en un lapso de 15 días, bajo condiciones de invernadero (Espinoza *et al.* ., 1985).

Bajo condiciones de campo en la Región central Costera del Estado de Veracruz, se encontró una mayor producción de nitrógeno con la aplicación de 100 Kg de P₂O₅ ha⁻¹ y 100 % de radiación solar en

Azolla microphilla (Olguín y Pérez. 1986).

En charolas de plástico con una área de 950 cm² (cuadros 8 a, b) una lámina de agua destilada de 5 cm y una capa de suelo de 2 cm (durandep^t típico), en invernadero, hubo una mejor respuesta a 80 ppm de P₂O₅ (equivalente a 80 Kg ha⁻¹) agregado como superfosfato simple de calcio con las especies : *Azolla caroliniana*, *A. microphilla* y *Azolla* sp (Quintero y Ferrera Cerrato, 1986, 1987).

CUADRO 8A.

EFECTO DE LA FERTILIZACION FOSFATADA SOBRE LA TASA RELATIVA DE CRECIMIENTO MEDIO DE CUATRO ESPECIES DE AZOLLA=

ESPECIE	PP2M DE P ₂ O ₅			
	0	40	80	160
	g g ⁻¹ día ⁻¹			
<u>Azolla filiculoides</u>	0.196	0.243	0.240	0.260
<u>A. microphylla</u>	0.170	0.221	0.239	0.244
<u>Azolla sp</u>	0.169	0.239	0.251	0.257
<u>A. caroliniana</u>	0.185	0.234	0.240	0.244

= 12- 29 de Septiembre. Cultivos en charolas (950 cm²) en invernadero (Quintero, 1988).

CUADRO 8B.

EFECTO DE LA FERTILIZACION FOSFATADA SOBRE EL TIEMPO DE DOBLAJE DE CUATRO ESPECIES DE Azolla=

ESPECIE	PP2M de P ₂ O ₅			
	0	40	80	160
	días			
<u>Azolla filiculoides</u>	3.5	2.9	2.8	2.7
<u>A. microphylla</u>	4.1	3.1	2.9	2.8
<u>Azolla sp</u>	4.1	2.9	2.8	2.7
<u>A. caroliniana</u>	3.7	3.0	2.8	2.8

= 12-29 de Septiembre. Cultivos en charolas e invernadero. (Quintero, 1988).

9. DESCOMPOSICION DE *Azolla* EN LOS SUELOS.

Muchos investigadores han observado mayor absorción de nitrógeno por las plantas de arroz cuando *Azolla* es incorporada al suelo, en comparación con la práctica de dejarla descomponer en el agua (Talley et al ., 1979; Watanabe , 1978; citado por Espinoza 1982; Singh, 1979). En experimentos de campo hay mayor disponibilidad de nitrógeno liberado de la descomposición de *Azolla* cuando se entierra que al dejarla sobre la superficie. Sin embargo, la absorción es menor (12-27 %) que en macetas (Ito y Watanabe, 1985). Los informes sobre velocidad de descomposición del helecho una vez que éste es incorporado al suelo y el grado de mineralización y disponibilidad del nitrógeno para la planta son inconsistentes.

En macetas *Azolla* se descompone rápidamente y su mineralización ocurre en tres semanas. A temperatura de 24 +/- 2 C la mineralización es aún más rápida, liberándose el 80 % del nitrógeno contenido, donde el 56% está en forma de amonio (Singh, 1977). En arrozales, las dos terceras partes del nitrógeno total de *Azolla* es liberado después de 5 a 8 semanas (Watanabe et al ., 1977).

Experimentos realizados con aplicaciones de *Azolla caroliniana*, *Anabaena variabilis* y *Nostoc muscorum* en suelos inundados, e incubados de 18 a 25 C en donde se empleó sulfato de amonio y nitrato de sodio marcados con N como tratamiento de comparación, indican que la mineralización ocurrió a los 30 días después de su incorporación; por ello se recomendó aplicaciones tres semanas antes del trasplante de arroz (Quintero 1988). La cuantificación de la velocidad de descomposición de tres especies y ocho cepas de *Azolla* marcada con ¹⁵N señalo que *Azolla pinnata* presenta un proceso más activo de mineralización siguiéndole *Azolla filiculoides* y *Azolla mexicana*.

Plantas de arroz cultivadas en macetas absorbieron el 50 % del ¹⁵N liberado de las especies de *Azolla* incorporadas en el trasplante y solamente un 10% cuando se dejaron sobre la superficie. Aplicaciones posteriores (78 días después del trasplante) contribuye con el nitrógeno liberado de *Azolla* a la formación del grano que si se realizaran aplicaciones tempranas (30 a 53 días después del trasplante), (Ito y Watanabe, 1985).

Talley et al. (1977) determinaron que existe un incremento en la recuperación del nitrógeno de *Azolla* cuando esta es incorporada en una porción de suelo y de esta manera le permite descomponerse sobre el agua. El nitrógeno de *Azolla* es liberado lentamente y su disponibilidad a la primera cosecha de arroz es solamente cerca del 70 % de aquella que da el sulfato de amonio (Watanabe et al. ,1977), Singh (1977) observo que *Azolla* en un campo de la India se descompone despues de 8 a 10 días y a los 20-30 días la cosecha de arroz se vió notablemente beneficiada.

Otros autores han reportado que las 2/3 partes del nitrógeno que contiene *Azolla* fué liberado después de 6 semanas (Watanabe et al. , 1977) o de 5 a 8 semanas (Tuzimura et al. , 1957; citado por Lumpkin y Plucknett 1980) al ser colocada en el campo.

Los resultados obtenidos bajo condiciones de invernadero mostraron diferencias significativas en las tasas de mineralización de estiércoles de ganado vacuno, caprino, conejo y gallinaza, así como *Azolla* sp. incluida como abono verde. Se midió el grado de mineralización con la técnica de ^{15}N , usando pasto ballico (*Lolium multiflorum*) como planta indicadora.

Gallinaza y *Azolla* fueron rápidamente mineralizados, alcanzando a la fecha del primer corte del follaje. Del pasto ballico (30 días después de la siembra), equivalencias con el sulfato de amonio de 1.49 y 1.90, respectivamente. El estiércol vacuno, por otra parte, mostró la tasa de mineralización más lenta, mientras que los estiércoles caprino y de conejo se comportaron en forma intermedia (Vásquez et al. , 1984 ; Vasquez, 1984; citado por Quintero, 1988).

En experimentos de laboratorio para observar la descomposición de *Azolla pinnata* en suelos húmedos e inundados se determino la cantidad de amonio y nitratos liberados.

La descomposición activa de la *Azolla* se presentó en los primeros 9 días de su incorporación. En el día 17, se libero el nivel más alto de amonio liberado (Brotonegoro y Abdulkadir, 1978; citado por Quintero 1988. Experimentos realizados con $^{14}\text{CO}_2$ en China indican que la mineralización de *Azolla* encuentra su valor óptimo despues de 2-3 semanas de su incorporación al suelo enterrandola, disminuyendo marcadamente a la 9a. semana (Li, Shi-ye 1984).

Semanas después de la inundación.	Suelo control	Con Azolla	N-NH ₄ de Azolla	Porcentaje de amonificación del biofertilizante Azolla.
	kg de Mg ⁻¹ de suelo			
<u>Azolla seca^A</u>				
0	6.7			
1	23.3	87.0	64.3	13.1
2	33.0	120.6	99.6	19.9
3	35.1	146.5	111.4	22.7
4	81.0	309.3	227.7	46.3
6	92.1	459.6	367.5	75.0
<u>Azolla fresca^B</u>				
0	0.1			
2	90.6	201.4	110.8	40.6
4	99.7	261.2	161.5	59.2
6	100.7	270.7	170.0	62.2
8	96.9	296.6	199.7	72.1

A Nitrogeno total de Azolla seca = 437 $\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo.

B Nitrogeno total de Azolla fresca = 273 μg^{-1} de suelo.

En tubos de 2 cm de diametro conteniendo suelo de textura arcillosa se les agrego el biofertilizante de *Mycorrhiza* en sus formas fresca y seca (conteniendo 5 mg de nitrógeno). Los tubos se inundaron con una lámina de agua destilada de 5 cm y fueron incubados en el laboratorio en oscuridad y a una temperatura de 30 C. Al término de este tiempo se extrajo periódicamente el amonio liberado en la mineralización del biofertilizante con una solución de cloruro de potasio 2N (cuadro 9). Los resultados obtenidos indican que las cantidades de amonio liberados fueron mayores con *Mycorrhiza* seca que con la fresca. Después de seis semanas de 62-75 % del nitrógeno total había sido liberado como amonio, siendo su disponibilidad lenta (Watanabe et al ., 1977).

10. RELACION C : N EN EL BIOFERTILIZANTE *Azolla*.

La relación C:N afectan la tasa de descomposición de *Azolla* incorporada en el suelo (Tuzimura et al. .. 1957; citado por Lumpkin y Plucknett 1980 ; Watanabe et al.., 1977; Shi et al. .. 1980; citado por Lumpkin y Plucknett 1982).Se han reportado para *Azolla* relaciones de 7:1 a 18:1 (Peters et al. 1977; Peters et al. .. 1980a; Zhejiang Acad. Sci., 1975).

Experimentos de campo conducidos en China indicaron relaciones C:N que fluctuaron desde 8.3:1 hasta 13.5 : 1 para varias especies de *Azolla* (Lumpkin et al. .. 1982). Como regla general, cuando los materiales orgánicos con una relación C:N mayor de 30 se añaden a los terrenos, hay una inmovilización del nitrógeno mineral. Si los materiales orgánicos tienen una relación C:N menos de 20, hay generalmente una liberación de nitrógeno mineral al principio del proceso de descomposición.

Estas son tan solo reglas generales esquemáticas, puesto que muchos otros factores, además de la relación C:N, influyen en la descomposición de los materiales orgánicos y la liberación o inmovilización del nitrógeno (Tisdale y Nelson, 1982; citado por Quintero 1988).

11.- COLECCION, MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE *Azolla*.

11.1- Introducción.

El helecho acuático del género *Azolla* tiene un crecimiento relativo grande y una relación simbiótica que fija nitrógeno con la cianobacteria endófitica llamada *Anabaena azollae*. Esta relación simbiótica de *Azolla* con el alga presenta una ventaja competitiva, sobre otros hidrofíticos flotantes. En ambientes como los arrozales se caracterizan por un contenido de nitrógeno disponible bajo. La simbiosis es de gran interés agrícola por la incorporación de *Azolla* y su descomposición en los campos de arroz, resultando de esto un incremento de nitrógeno disponible, para el cultivo y un buen rendimiento en la cosecha de arroz (Lumpkin, 1987).

Azolla puede acumular más de 10 Kg de nitrógeno/hectárea/día. (25 toneladas/hectárea de *Azolla* x 6 % de peso seco x 4% N₂ x RGR. (0.17 /tonelada/hectárea/día)) y así tiene el potencial de proporcionar los requerimientos de nitrógeno para tener una alta productividad de arroz en solo algunas semanas bajo condiciones ambientales apropiadas, esto se debe a que *Azolla* se reproduce por fragmentación y su crecimiento no es reprimido por el suelo como sucede con plantas terrestres. (Lumpkin y Plucknett, 1982).

De 1960 hasta los 70, *Azolla* fue cultivada regularmente en gran escala en el sureste de China, en estas áreas es utilizada como abono verde para el arroz y fue considerada como un cultivo de valor económico alto. *Azolla* puede usarse en cosechas de períodos fríos cortos debido a que algunas variedades de *Azolla* tienen la propiedad de sostener un crecimiento relativo alto a temperaturas bajas (de 10 a 20 C) además presenta un potencial para doblar su biomasa en un tiempo muy corto aproximadamente en 2 días (0.35 g/g día), (Peters, et al. 1980; Watanabe y Berja 1983, Lumpkin, 1986; citados por Eikan 1987).

Su tolerancia al clima frío fue la llave para el éxito en Vietnam y en China. Altas tasas de crecimiento en las temporadas frías hicieron de *Azolla* un competidor económico contra las alternativas de utilizarlo como alimento y como un buen competidor biológico contra otras algas hidrofíticas. En la temporada fría Verano-Invierno el cultivo de *Azolla pinnata* var. *imbriata* con sistemas de irrigación en el río

Rojo de Vietnam probablemente alcanzó una área que excedió las 500,000 Hectareas durante el final de los 60 y ha seguido considerándose un cultivo importante hasta la década de los 80 (Tuan 1979).

En China el cultivo de *A. pinnata* var. *imbricata* y de *Azolla filiculoides* durante la temporada fría alcanzo en los años 70 cerca de 1,000,000. hectáreas con una tendencia a declinar rápidamente, en esta fase se necesita añadir fertilizante químico nitrogenado para mejorar los bajos rendimientos (Liu 1979).

Fuera de China y Vietnam *Azolla* se ha dado a conocer con escaso éxito principalmente por los bajos conocimientos sobre su manejo y por problemas de enfermedades e Insectos.

De cualquier manera el interes y el conocimiento de los usos agricolas de *Azolla* han mejorado por la publicación de revistas, manuales técnicos llevados a cabo por investigadores de naciones desarrolladas, estas publicaciones proporcionan información: Sobre requerimientos ambientales, identificación de especies, reproducción sexual y vegetativa, plagas y enfermedades de *Azolla*, prácticas administrativas etc., (Peters et al 1977; Quintero y Ferrera 1988; Talley et al 1981; Watanabe et al 1981; Lumpkin y Plucknett 1980, 1982; Elkan 1987). *Azolla* se ha convertido en un Biofertilizante económicamente disponible para la producción de arroz.

En numerosos países se llevan a cabo investigaciones especialmente en la colección de germoplasmas como procedimientos para reducir o eliminar los requerimientos de mantenimiento de la labor y de agua para el cultivo.

11.2 Colección.

11.2.1 Preparación y Embarque de Germoplasma.

En el transporte y uso de *Azolla* existe la posibilidad de que otros organismos como caracoles, sanguijuelas y equistosomas puedan ser traídos como contaminantes y de esta manera son introducidos a nuevas áreas donde se cultiva el arroz. Idealmente solo cultivos asépticos de *Azolla* deben ser transportados a diferentes sitios pero esto no es técnicamente posible de tal manera para evitar el transporte de organismos contaminantes se hace una inspección cuidadosa de las

plantas y se someten a cuarentena (Lumpkin 1987).

En el cultivo de *Azolla* desde su sitio de partida hasta su sitio de llegada debe ser tratado con fungicidas y con insecticidas (Lumpkin y Plucknett 1982).

Cuando *Azolla* es colectada fuera del laboratorio se pone en una solución nutritiva en cuarentena, esto es importante debido que esto reduce la posibilidad de la introducción de cualquier organismo que pueda ser patógeno o no, durante la cuarentena se aplican pesticidas. Cuando se hacen envíos de *Azolla* es necesario considerar el efecto de los factores ambientales ya que no deben ser expuestas a temperaturas menores de 0 C ni por encima de 35 C, no se le debe adicionar desinfectantes, ni ser transportada en agua sometida a turbulencia ya que esto puede causar excesiva fragmentación y con frecuencia su muerte (Lumpkin 1987).

Formas Utilizadas para el Envío de *Azolla*.

A) Volumen o Masa de *Azolla*.

Azolla puede ponerse directamente en una bolsa de plástico, este método parece ser el más efectivo para períodos de transporte largo de un día colocando la bolsa en una caja con hielo o refrigerador portátil para mantener una temperatura de 5 a 10 C, esto permite mantener la viabilidad de las plantas durante un mes o más tiempo.

B) *Azolla* en Gel.

La superficie estéril de *Azolla* puede ser sembrada sobre un medio líquido que se solidifica con gelatina éste método se ha utilizado para la preservación de germoplasma de *Azolla* presenta muchas dificultades y por lo tanto solo se utiliza cuando no hay disponibilidad de hielo o refrigeración.

C) Espora de *Azolla*.

Si *Azolla* es encontrada fértil, por la presencia de esporocarpos las plantas pueden ser secadas por aire y este material seco puede ser embarcado, después de su arribo es colocado en agua pura e iluminado con luz indirecta del sol para inducir la germinación de las esporas. Unos días después debe ser agitado directamente para favorecer el

contacto de las esporas hembras y machos.

A la segunda o tercera semana las pequeñas semillas deben estar presentes y pueden ser transferidas a una solución nutritiva (Bal et al citado por Elkan 1987).

11.3 Mantenimiento.

Solo el material vegetativo puede ser usado como un material de siembra o para un mantenimiento de germoplasma por ello cierta cantidad de *Azolla* debe ser cultivada continuamente durante el año.

Esta operación significa un incremento al costo del uso de *Azolla* como abono verde y al costo del mantenimiento de la colección de germoplasma.

11.3.1 Colección de Germoplasma.

Estas colecciones se hacen de todas las especies conocidas y son comunmente mantenidas en el Instituto Internacional de Investigación del Arroz, de las Filipinas y en otros institutos.

Todos estos Institutos cultivaron a *Azolla* en una solución de nutrientes como un método primario para el mantenimiento del germoplasma, algunos institutos mantienen esterilizado la superficie de *Azolla* en un frasco con una solución nutritiva bajo condiciones asépticas (Nickell 1961; citado por Elkan 1987).

11.3.2. Invernaderos para Sistemas de Producción masiva.

Debido a que *Azolla* se usa como abono verde para el arroz es necesario mantener una cierta cantidad de *Azolla* en invernaderos especiales durante las temperaturas bajas, *Azolla* debe ser protegida de la muerte por el intenso calor o por el frío. En el invierno *Azolla* es propagada en cantidades suficientes, para su uso como mono cultivo en el campo para una inoculación directa como un intercultivo en el arroz (Lumpkin 1985 ; citado por Elkan 1987).

11.3.2.1 Invernaderos en Invierno.

En sitios con altas latitudes o elevaciones en la estación fría es necesario proteger a *Azolla* de la congelación para asegurar el abastecimiento suficiente para la multiplicación en la primavera. *Azolla* muere cuando la temperatura desciende a menos de 5 C. Las variedades resistentes al frío son las siguientes: *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. pinnata* y *A. rubra*. Cuando los inviernos son severos el agua caliente de primavera o el agua templada de las fábricas es usada para la sobrevivencia en invierno de *Azolla*.

Azolla puede crecer en invernaderos de vidrio o de plástico. Cuando el invierno es moderado *Azolla* puede sobre invernar en el campo o en una pequeña estructura de campo. En áreas donde el agua no está congelada como charcas, lagos, canales y a lo largo de las avenidas inundadas de arroz (Ye y Wu 1964 citado por Liu 1979).

La cantidad de *Azolla* guardada para el sobre invierno varía de acuerdo a las áreas de cultivo, la estación, duración del cultivo de *Azolla* en el campo, el sistema de cosecha y el método particular para el invierno. Una hectárea de arroz transplantado de primavera es comúnmente requerido en invierno y es de 400 a 600 Kg de *Azolla*.

Una cosecha de transplante de arroz para verano requiere solamente 7.5 a 15 Kg de *Azolla* para invierno.

En China en ciertas regiones frías el helecho es llevado fuera del agua, y es colocada en el invernadero en un montón de 50 cm de alto. Este montón es cubierto con 5 a 10 cm de ceniza de paja, después se rocía con agua y de esta manera se mantiene húmeda (Li Shi-ye 1984).

Durante los diez primeros días de almacenaje la temperatura interna de la pila de *Azolla* es regulada para asegurar que su composición no cambie. La temperatura se mantiene de 5 a 8 C o un poco más abajo pero nunca a 0 C.

Azolla estuvo de 50 a 60 días durante el invierno encontrándose que después de este período, 50 al 80 % de *Azolla* mantiene su viabilidad. En invierno o primavera es movida dentro del caudal húmedo dentro del invernadero para su propagación.

11.3.2.2 Invernadero en Verano.

Las técnicas en conservación en verano son usadas para el cultivo de *Azolla* en localidades donde las temperaturas del campo son también altas. Para esto *Azolla* debe ser preservada durante una estación para usarla más tarde, por ejemplo cuando *Azolla* es cultivada como abono verde para la cosecha de arroz que se lleva a cabo en otoño, el helecho debe ser mantenido en verano hasta que pueda ser cultivado en el campo.

Las características de la metodología de conservación en verano incluyen una buena ventilación, la exposición a la luz directa del sol y una corriente de agua templada, estanques, canales y a la orilla de un río con bajo contenido de nutrientes, la superficie del agua debe ser subdividida dentro de pequeñas áreas para el manejo de *Azolla* y su prevención de golpearse con el aire.

Si *Azolla* está en el campo el agua debe ser drenada, el agua fría debe ser añadida cuando la temperatura del campo exceda 35 C, la ocurrencia de insectos debe ser vigilada porque hay una alta reproducción de insectos a altas temperaturas. *Azolla* también puede estar en el campo en las sombras de las bandas de arroz.

11.4 Cultivo.

El propósito del cultivo de *Azolla* es asegurar la fijación del nitrógeno atmosférico y hacer este disponible para el arroz u otras cosechas. Los granjeros suponen que están cumpliendo con este propósito con la producción de biomasa, pero la cantidad de biomasa no indica la cantidad de nitrógeno que puede ser fijada y que estará disponible para la cosecha de arroz.

11.4.1. Multiplicación en Invernadero y Campo.

El fin es producir *Azolla* tan rápido como sea posible, así que el área más grande posible puede ser inoculada con suficiente *Azolla*. Para llegar a esta meta una administración intensiva y una coordinación adecuada son esenciales. En el sur de China un tipo de invernadero de verano en la multiplicación de *Azolla* tiene lugar

durante el invierno, y de mediados de marzo a mediados de abril a mediados de junio a lo largo del río Yangtze.

Cuando el promedio de la temperatura es de 14 a 20 °C *Azolla* puede duplicarse cada 3 o 5 días, el colchoncillo de *Azolla* esta continuamente subdividido y hay que prevenir su amontonamiento y consecuentemente una tasa de crecimiento lento. Todas las áreas disponibles son usadas y además de los invernaderos pueden incluirse canales, zanjas, charcas y otros cuerpos de agua y todo esto esta en relación con el área de siembra de los campos de arroz.

11.4.2. Cultivo en Campo e Incorporación.

Existen 3 sistemas diferentes para el cultivo de *Azolla* cuando se utiliza como abono verde para el arroz y son:

- a) La cosecha de *Azolla* es incorporada dentro de la almohadilla de lodo como un abono verde antes del transplante del arroz.
- b) Como un intercultivo con el arroz, y también incorporado como un abono de revestimiento superior o permite morir naturalmente sin la incorporación.
- c) En monocultivo e intercultivo.

Cuando *Azolla* se utiliza como monocosecha en China y Vietnam el helecho crece en el campo durante 20 a 30 días antes de la siembra y su incorporación dentro del lodo es de una o dos veces durante este periodo, efectuándose con arado o rastrillo.

Cuando se utiliza como una intercosecha *Azolla* crece debajo de las hierbas que crecen junto con el arroz hasta que no tenga sombra y esto le lleva generalmente de 20 a 40 días. Después del primer transplante de arroz la intercosecha de *Azolla* es incorporada al lodo una o dos veces, cuando se lleva a cabo la eliminación de la mala hierba, posteriormente el crecimiento activo del arroz marca la muerte de *Azolla* por falta de luz o debido a que es atacada por los hongos (Liu 1979; Elkan 1987).

11.5 Factores Ambientales que Afectan el Crecimiento de *Azolla* sp.

El medio ambiente es el principal factor que influyen en el uso y la productividad de *Azolla* en el cultivo de arroz.

En el clima seco hay una alta productividad de *Azolla* debido a que existen pocos problemas de enfermedad y ataques por insectos a este helecho. Para mejorar la producción de arroz durante la estación seca se utilizo *Azolla* y su productividad fue excelente de 5 a 69%.

Los factores ambientales que han sido más estudiados y que tienen gran influencia en el desarrollo de *Azolla* son: El agua , temperatura, humedad, luz, y nutrición de la planta.

11.6 Manejo de los Factores que Afectan *Azolla*.

11.6.1. Inoculación.

La inoculación generalmente consiste en la radio difusión de la planta de *Azolla* en el invernadero sobre la superficie del agua y la cantidad de inóculo de *Azolla* depende principalmente del clima, por ejemplo durante el clima fresco el campo puede ser inoculado con un bajo nivel de *Azolla* (mayor que 25 g/m²).

Cuando *Azolla* se utiliza como inóculo es trasladada del invernadero y al campo por obreros, animales o maquinas. Con una planeación adecuada puede ser removida del invernadero através de sistemas de irrigación por flujo laminar al campo sin ser removida del agua. (Talley y Rains 1980 b; Lumpkin y Plucknett 1987).

Para la transportación de tierra arriba, el inóculo de *Azolla* es eficientemente colectada en forma natural por el viento, o por la corriente de agua.

Para que haya una inoculación adecuada se requiere de lo siguiente:

- 1) Si *Azolla* y la tierra estan escasos , pero su labor es completa se realiza la inoculación con cantidades de 0.5 - 0.8 Kg/m² las que se incorporan cada 2 a 4 dias. Este sistema produce un cultivo muy alto en un período corto, debido a que *Azolla* se mantiene en una fase de crecimiento lineal.

Este nivel de inoculación requiere un nivel muy alto de trabajo ya que se requiere incorporaciones frecuentes.

2) Si *Azolla* es abundante pero su trabajo y el área de la tierra son escasos, se realiza la inoculación en un rango de 0.3 -0.5 Kg/m² y esta cantidad se incorpora parcialmente cada 5 a 10 días.

Este es el mejor sistema para la producción de *Azolla* para una gran área. Estos rangos moderados de inoculación aseguran una mejor utilización de la luz del sol, del área de campo y el agua, y deben dar la mejor remuneración económica en los países en desarrollo.

3) Si *Azolla* y la tierra de cultivo son abundantes pero su trabajo es pequeño se inocula en una razón de 0.1- 0.3 Kg/m² y se subdivide o se cosecha cada 10 a 14 días. Este sistema es usado cuando *Azolla* esta creciendo en gran escala para la incorporación en suelos como un abono basal. Este bajo nivel de inoculación ahorra trabajo pero puede incrementar la población de insectos debido al crecimiento prolongado de *Azolla*. (Lumpkin 1987).

11.6.2. Monocultivo.

Cuando *Azolla* es monocultivada en grandes extensiones deben tomarse las precauciones necesarias para prevenir el soplado del viento. La *Azolla* flotante se inocula de un lado al otro lado del campo. Debido a los fuertes vientos pueden formarse montículos de *Azolla* a largo de las uniones de los terrenos, y estos se descomponen si no son separados rápidamente. *Azolla* Crece mejor si se dispersa en toda la superficie del agua.

Para hacer esto en China frecuentemente se usa una simple o doble fila de arroz , cada fila esta separada de la otra por una distancia de 1 o 2 m. (Liu 1979).

En Vietnam se plantan diversas líneas de arroz para proteger *Azolla* de los daños del viento.

Donde el agua fluye de un campo a otro es necesario poner una barrera hecha de carrizo para prevenir que *Azolla* sea llevada fuera del campo. Cuando *Azolla* crece como monocultivo debe ser incorporado a la tierra antes que alcance su máxima densidad de crecimiento (mientras que este siga en la fase de crecimiento lineal), el monocultivo de *Azolla* debe ser incorporado en el suelo con un equipo de arado antes de que el

arroz sea plantado o transplantado. Esta característica hace el uso de monocultivo de *Azolla* muy factible para todo tipo de cultivo de arroz donde se ha transplantado, en las regiones de temperatura altas así como en los trópicos.

El sistema requiere del drenado del campo para asegurar el contacto de *Azolla* con el piso del campo y prevenir las olas causadas por la maquinaria; además de esto la finalidad del drenado es acelerar la descomposición de *Azolla*, de tal manera que las semillas de arroz no deben ser transplantadas hasta 4 a 5 días después de la incorporación del monocultivo de *Azolla*. (Lumpkin 1987).

11.6.3. Intercultivo.

Cuando el ambiente o limitaciones de cultivo no permiten el crecimiento de un monocultivo de *Azolla* debe ser posible el crecimiento de *Azolla* junto con el arroz. *Azolla* puede crecer como un intercultivo para el uso como abono verde o cuando crece en plántulos tempranos en los campos de arroz para producir una inoculación adicional para plántulos tardíos en los cultivos de arroz. En los campos donde *Azolla* es inoculada en arroz transplantado para crecer como un intercultivo, la distribución de *Azolla* puede ser muy difícil, por esta situación los chinos inundaron los campos hasta el punto cercano del cubrimiento de la semilla de arroz, antes de la difusión y el desplazamiento de la *Azolla*. (Lumpkin 1987).

En China el intercultivo de *Azolla* es generalmente afectado mediante la mano de obra humana, el método es muy efectivo pero causa mucho trabajo a los obreros que lo realizan. Las pruebas de incorporación de *Azolla* en los campos inundados son menos efectivos que la incorporación en suelos drenados por el método anteriormente descrito. En el sistema de intersecha donde se cultiva tanto el arroz como *Azolla* existe una competencia de ambos métodos a pesar del hecho de que *Azolla* flota sobre el agua mientras que el arroz crece en el suelo. Algunos efectos son negativos pero transitorios mientras que otros se mantienen un tiempo más largo.

La competencia principal que existe entre *Azolla* y arroz son los nutrientes en los cuales se incluye el nitrógeno. *Azolla* combina el nitrógeno en el agua y así aumenta la disponibilidad de nitrógeno para

el arroz. Sin embargo este fenómeno generalmente desaparece después de que el nitrógeno de la primera incorporación de *Azolla* se ha hecho disponible a el arroz y esto dura de 10 a 20 días .

Después de una incorporación adicional a la cosecha de arroz, aumenta la producción e incrementa el peso en grano. El porcentaje de descomposición de *Azolla* es bastante importante cuando *Azolla* es inter cosechada con el arroz y esta descomposición es afectada también por la variedad de *Azolla* y el medio ambiente del suelo.

En el sistema de inter cosecha de *Azolla* se afecta la temperatura del agua del campo de arroz debido a que la delgada capa de *Azolla* no permite la entrada de la luz del sol, y por tanto el agua permanece fría debajo del crecimiento de *Azolla* durante el día y en la noche la fina capa de *Azolla* evita la pérdida de calor y de esta manera existe una temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de arroz, en cambio cuando la capa de *Azolla* es muy gruesa la temperatura del agua del cultivo de arroz esta muy fría y el cultivo no se desarrolla bien . Para evitar este problema la inoculación debe estar muy controlada y reducirse el grosor de la capa de *Azolla* antes de que se extienda en el campo de cultivo (Elkan 1987).

12 USOS DE *Azolla*.

12.1 Como Abono Verde.

Azolla se utiliza principalmente como abono verde para las cosechas de arroz. Lumpkin y Plucknett 1982., comparó la habilidad de fijación de nitrógeno de *Azolla* roja con la alfalfa y soya; Ellos mostraron que un mes y medio de cultivo de *Azolla* incrementa el contenido de nitrógeno del suelo en un nivel igual al producido por una cosecha de soya, y solamente 40 % del nivel producido por alfalfa y el contenido de nitrógeno es como sigue; 2.8 %, 2.9 %, y 3.5 % (peso seco).

Talley and Rains 1980b, reporto que *A. filiculoides* proporciona los requerimientos de nitrógeno para los arrozales de California junto con la plantilla de arroz. Lumpkin y Plucknett (1980) reportaron que dos capas de *Azolla* incorporadas en el suelo antes del transplante de arroz pueden proporcionar 50 % del nitrógeno necesario a la producción de 5 toneladas de arroz por hectarea.

La máxima densidad de una capa de *Azolla* está sujeta a una variación considerable. Singh .(1979) reporto un máximo de producción de 37.8 tons/ha de peso fresco que contenía 2.78 toneladas de peso seco de *A. pinnata* desarrollandose sobre el agua en un estanque en la India. Talley et al (1977), reportaron un máximo de producción de 0.98 ton/ha de peso fresco (24 - 45 Kg N/ha) para *A. mexicana* y 1.8-2.57 tons/ha peso seco (58-105 Kg N/ha) para *A. filiculoides*. Una producción de 3 tons/ha peso seco (90 Kg N/ha) de *A. filiculoides* fué obtenida en Dinamarca (Lumpkin y Plucknett 1980), bajo condiciones de campo de Asia *A. pinnata* puede rendir una producción raquítica de 8-10 Tons/ha (25-50 Kg N ha) expresadas en peso húmedo (Lumpkin y Plucnett 1980). Se estima que el potencial de fijación de nitrógeno anual y el intervalo de variabilidad de peso segun Shanmugan 1978 es de 335-670 Kg /ha año para *A. pinnata* en Indonesia, pero se ha hecho una estimación mas exacta y es de 103-162 Kg N/ha por año. Talley et al (1977) reportaron que *A. filiculoides* y *A. mexicana* producen 52 Kg N/ha y 41 Kg N/ha respectivamente, en 30 días en campo. Entre especies

el porcentaje de fijación de nitrógeno es de 1.2 Kg/ha por día entre 10-35 días después de la inoculación en el. (Watanabe et al 1977). Estiman un porcentaje diario de 1.1 Kg N/ha a 120 Kg N/ha en 105 días por *A. pinnata*. Moore (1969) estimó los valores del potencial de fijación de 100-160 Kg N/ha en 3-4 meses. Las estimaciones altas acerca de la fijación anual solo la pueden hacer países que tengan mucha experiencia en el cultivo del helecho. El Instituto de Agricultura en Vietnam sugiere un potencial aproximado de 1000 Kg N/ha mientras que en la República de China se calcula que es de 92.7-151.8 Kg N/ha en 1.5 meses (Lumpkin y Plucknett 1982) y 59.2 Kg N/ha en 30 días. En el Instituto de Suelos y Fertilizantes en China (Anónimo) reporta que el uso de *Azolla* como abono verde incrementa la materia orgánica en el suelo y reduce la evaporación.

12.2 Sistemas de Incorporación de *Azolla* en el Cultivo de Arroz.

El principal uso de la asociación *Azolla* - *Anabaena* es en el cultivo de arroz. *Azolla* incrementa el crecimiento del arroz, número de espigas, contenido proteico, rendimiento en grano y paja significativamente (Singh, 1977, 1979; Talley et al ., 1977, 1981). Moore (1969) reportó incrementos en los rendimientos de arroz de 14, 17, 22 y 40 % con el uso de *Azolla*. La incorporación de una capa de *Azolla filiculoides* (equivalente a 60 Kg de N ha⁻¹) en suelo produjo incrementos de 112 % en rendimiento sobre el control y de 216 % cuando la incorporación de una capa de *Azolla* le siguió una nueva incorporación al momento del trasplante de arroz-cultivo doble (Talley et al ., 1977). Otros resultados se pueden apreciar en el Cuadro 10.

Experimentos realizados en el Instituto Internacional de Investigaciones sobre el Arroz (IRRI), llevados a cabo por Watanabe (1977) indican que *Azolla* cuando crece conjuntamente con el arroz y es incorporado 40 días después del trasplante, produce un incremento del 12-25 % (0.3-0.7 ton /ha) sobre el control no inoculado. En otro experimento *Azolla* se adicionó antes y después del trasplante del arroz. La combinación de inocular cuatro veces antes del trasplante del arroz y la incorporación después del mismo, produjo un máximo de

E	COSECHA ^a (Ton/ha)				Referencias
	Parcela b control	Parcela fertilizada con N ^c	Parcela con Azolla ^b	Incremento debido al biofertilizante	
Cheliang, China, 1964.	3.7	—	4.4 s/l I, T	0.7	Liu, 1979.
			4.4 l 1 vez T	0.7	
			4.91 3 veces T	1.3	
			5.01 3 veces T	1.3	
Siete provincias del sur de China 1979.				0.7	Liu, 1979.
Vietnam 1958-67	3.4	—	2.81, AT	0.4	Dao y Do 1978; citados por Kikuchi et al. 1984.
India, 1976 (Kharif)	4.9	5.5(4 ON)	5.61, AT	0.7	Singh, 1979.
	1977 (Rabi)	1.7	2.2(2 ON), 3.2 (ON)	2.61, AT	
Tailandia 1977	2.6	2.9 (37.5 N)	3.31, AT	1.5	Esvaldeo et al 1978.
USA, 1970	1.3	2.0 (4 ON)	2.01, DT	1.3	Raine y Talley, 1979.
JRRI, 1979-80	4.2	5.2 (77 N)	5.41, AT	1.3	Hatanabe et al. 1981.
4 Países Asiáticos 1979-80 ^f	2.9	3.5(3 ON), 4.0(6 ON)	3.6 s/l I, DT	0.7	Kasffer (1980, 1981).
			3.61, AT	0.7	
			3.5 I, DT	0.6	
			4.0 I, AT y DT	1.1	

A (-) = datos no evaluados.

B sin Azolla ni fertilizante nitrogenado.

C Datos en parentesis son niveles de Fertilizante nitrogenado químico (Mg/ha).

D I = Incorporada, s/l = Sin incorporación, T = Aplicada en el tiempo de transplante.

D T = después del transplante, A T = Antes del transplante.

E = Tailandia, India, China y Nepal, promedio de todos los sitios para dos años.

36 % (1.9 ton/ha) de incremento de rendimiento sobre el control.

En la India se logró incrementar el rendimiento de grano en un 54 % (0.5-1.5 ton ha⁻¹) sobre el control, al incorporar una capa (10 ton ha⁻¹) de *Azolla* en el suelo, o cuando se permitió su descomposición en la superficie sin incorporarla. Con la densidad de *Azolla* de 20 ton ha⁻¹ se observó un incremento de 69 % (1.8 ton ha⁻¹) sobre el control. En los experimentos anteriores se pudo apreciar que el porcentaje de nitrógeno en el grano se incrementó en un 27 % (Singh, 1979).

Singh (1979) recomienda el uso de fertilizante nitrogenado inorgánico junto con *Azolla* para obtener más altos rendimientos en las cosechas. Este autor había registrado que la adición de 10 ton ha⁻¹ de *Azolla* más 40 Kg de N ha⁻¹ como sulfato de amonio producía un incremento de 91 % (2.4 ton ha⁻¹) sobre el control, valor cercano al obtenido con la adición de 80 Kg de N ha⁻¹, que resultó en un incremento de 106 % (2.79 ton ha⁻¹) sobre el control.

Conclusiones similares a las anteriores se obtuvieron en Estados Unidos de Norteamérica cuando se adicionaron pequeñas cantidades en forma de *Azolla* (30 Kg de N ha⁻¹) complementadas con la misma cantidad de sulfato de amonio. Los incrementos de rendimientos obtenidos fueron similares a los alcanzados con la adición de 60 Kg de N ha⁻¹ en forma de sulfato de amonio. Sin embargo, la aplicación de 60 Kg de N ha⁻¹ en forma de *Azolla* más la misma dosis de nitrógeno como sulfato de amonio, no resultó en la suma del efecto de ambas fertilizaciones, logrando sólo un 71 % del rendimiento obtenido con 120 Kg de N ha⁻¹ como sulfato de amonio (Talley et al. . 1981).

Investigadores de la República Popular China reportan incrementos en los rendimientos de arroz que varían de 0.4-158 % con un promedio de 18.6 % como resultado de 422 experimentos en campo (Lumpkin y Plucknett, 1980).

En China se han logrado rendimientos de arroz de 12 - 15 ton ha⁻¹ con el empleo únicamente de *Azolla*, utilizando una técnica de sembrado del arroz en dobles hileras anchas y angostas (Li, Shi-ye, 1984).

Se obtuvo un incremento de 132 % en número de granos por panoja al fertilizar con *Azolla*, contra 95 % observado al fertilizar con urea, comparado con el control no fertilizado (Kulasooriya y de Silva,

1977; citado por Quintero, 1988).

El incremento de rendimiento de arroz que se obtiene con la aplicación de *Azolla* es función del aporte nitrógenado que hace el suelo a este cultivo.

Si el suministro es elevado, la *Azolla* no producirá ningún aumento. En el caso opuesto, los incrementos pueden ser muy grandes (porcentualmente).

12.3 Incorporación de *Azolla* en Maíz.

Además de su utilización en el cultivo de arroz, *Azolla* es utilizada en el cultivo de maíz en México (Lumpkin, 1987). Ferrera Cerrato y Miranda (1982) en un experimento en invernadero, utilizaron como inóculo inicial 6.8 g de *Azolla* sp (peso fresco) por Kg de suelo. Después de 30 días el rendimiento fresco de las plantas de arroz varió entre 50 a 97 g y el peso seco entre 5.8 a 9.4g en los distintos tratamientos, encontrándose que todos presentaron un peso mayor al obtenido en el control, siendo el valor más alto encontrado con superfosfato simple y el menor con roca fosfórica. *Azolla* seca obtenida del experimento anterior fue adicionada al cultivo de maíz en dosis equivalentes a 1, 3 y 6 ton ha⁻¹ y el mayor rendimiento se obtuvo con 5 toneladas por hectárea.

12.4 Tasa de Crecimiento.

Azolla tiene un crecimiento exponencial el cual esta sujeto a numerosas variables ambientales. *A. pinnata* puede duplicar su biomasa de 3 a 5 días en condiciones de laboratorio, pero en condiciones de campo es de 5 a 10 días, se ha observado un tiempo de duplicación de 2.8 días con *A. pinnata* en el Instituto Internacional de reserva de arroz. (Talley et al 1977; Watanabe 1977; Lumpkin y Plucknett 1980), midieron una duplicación similar en tiempo (2.8 días) para *A. mexicana* pero un mayor tiempo de duplicación de 7 días para *A. filiculoides*.

Buckingham et al 1977 citado por Elkan 1987 realizo experimentos utilizando *Azolla* como alimento para ratas y los resultados fueron los siguientes: En el ensayo de alimentación con *Azolla* se encontró que

contenía un alto contenido de fibra y resultaba indigerible para las ratas y presentaba una cantidad excesivas de minerales, estos experimentos indican que no contienen inhibidores de crecimiento o toxinas para las ratas.

Buckingham et. al.(1978),hizo un análisis de los aminoácidos que contienen la *Azolla* ,la alfalfa,la soya y el maiz y comparando la cantidad alimenticia de estos. Los resultados de este estudio se registraron el cuadro numero 11.

Cuadro 11 comparación de la composición de los aminoácidos de *A. Muculoides* con Alfalfa, soya y Maiz (Buckingham et al. 1978).

Aminoácidos	g / 100 g de proteína			
	<i>Ayolla</i>	alfalfa	soya	maíz
Treonina	4.70	5.11	3.91	3.71
Valina	6.75	6.91	4.88	4.94
Metionina	1.88	1.85	1.28	2.0
Isoleucina	5.38	5.64	4.61	3.80
Leucina	9.05	8.95	7.88	12.83
Fenilalanina	5.64	6.13	5.01	5.04
Lisina	6.45	5.01	6.47	2.76
Histidina	2.31	2.28	2.56	2.76
Arginina	6.62	4.91	7.35	4.28
Triptofano	2.01	2.68	1.30	0.76
Acido aspártico	9.39	11.67	11.86	6.45
Acido glutámico	12.72	11.82	18.98	19.39
Serina	4.10	5.01	5.19	5.13
Prolina	4.48	5.11	5.57	9.12
Glicina	5.72	5.08	4.25	3.80
Alanina	6.45	6.52	4.31	7.70
Cistina	2.26	1.17	1.35	1.62
Tirosina	4.10	3.36	3.19	3.90
Metionina				
+	4.14	3.02	2.63	3.52
Cistina				
Fenilalanina				
+	9.74	9.48	8.20	8.94
Tirosina				
% de materia seca.				
Proteína	23.42	20.55	44.51	10.52

12.5 Practicas de Manejo.

En Asia tropical cuando *Azolla* es cultivada para abono verde se realiza mediante dos caminos; la primera se pone antes de la siembra de arroz. Una segunda forma de cultivar *Azolla* es incorporarla en un suelo durante intervalos antes y/o después de la cosecha de arroz. *Azolla* es desarrollada e incorporada algunas veces antes del transplante de las semillas de arroz. Cuando *Azolla* se aproxima a su maxima densidad su velocidad de crecimiento empieza a declinar en 1/3 -1/2 y *Azolla* es guardada como semilla para la proxima cosecha y el remanente es incorporado en el suelo. En ambos metodos *Azolla* es comunmente utilizada como un cultivo dual con el arroz.

12.5.1 Densidad de Siembra (plantas de arroz).

El porcentaje de inoculación o la densidad de siembra es un factor importante para la producción eficiente de *Azolla*. Desde que *Azolla* es propagada vegetativamente la densidad de siembra puede ser alta aunque intercepte la mayoría de los rayos solares. Antes que se reduzca la alta densidad en su crecimiento todavía permite alguna multiplicación de frondas.

Las siguientes recomendaciones de las densidades de siembra (como Kg peso fresco) son sujetas a modificaciones debido al alto costo del trabajo y a factores ambientales.

Los Vietnamitas (Tuan, 1979) recomiendan una densidad de siembra para *A. pinnata* de 0.5 Kg/m² la cual incrementa una densidad de 1-1.6 Kg/m² en invierno y 1⁻¹.4 Kg/m² en verano. Si el helecho florece se considera que es un gran problema y para evitar esto se recomienda un porcentaje de 0.7-0.8 Kg/m² para asegurar que el alga alcance la luz del sol. Singh uso la densidad de siembra de 0.1-0.3 Kg/m² (1977) 0.37 Kg/m² y 0.4 Kg/m² (1977). La ultima densidad mencionada corresponde a un rendimiento de 8 a 15 tons/ha de abono verde durante 8 a 20 días de cultivo y un contenido de nitrógeno de 30 a 50 Kg/ha.

12.5.2. Control del Agua.

El control de agua es crítico durante todo el año para el cultivo de *Azolla*. El nivel del agua debe de ser aquel que le permita que las raíces de *Azolla* puedan tocar la superficie del terreno, si no existe el nivel adecuado frecuentemente existe deficiencia de minerales y *Azolla* tiende a desaparecer. Según observaciones hechas en Hawaii. Talley et al 1977., recomiendan bajos niveles de agua y arados especiales para proteger *Azolla* del viento y de la acción de las ondas, del agua la cual pueden fragmentar y destruir a *Azolla*.

12.5.3 Materiales de Incorporación y de inóculo de *Azolla*

Las herramientas de mano útiles para el cultivo de *Azolla* en pequeña escala son las siguientes; cestos, postes, tablas para arar, palas, palos principalmente de bambú, que son utilizados para golpear y batir.

12.6 *Azolla* como Mala Hierba o Supresor de la Mala Hierba.

En algunos países se considera una plaga o mala hierba cuando esta crece donde no es requerida. Usualmente *Azolla* es considerada una mala hierba debido a su rápida reproducción vegetativa, de tal manera que es capaz de cubrir la superficie del agua en un período corto. Debido a la ignorancia del hombre no se aprovecha la presencia de *Azolla* para su explotación. *Azolla* ha sido reportada como una mala hierba debido a que interacciona con la pesca, en las bombas impide el flujo del agua, obstruye tubos y compuertas que interfieren con los cultivos. En Hawaii se han dividido las opiniones sobre el uso de *Azolla* y esto se debe a que se encontró que cuando *Azolla* crece abundantemente en los campos esto origina una fertilidad mayor en el suelo.

En Vietnam y China los cultivadores de arroz tienen opiniones muy divididas, en Japon, España, Portugal, Italia han considerado a *Azolla* como una mala hierba debido a que las cosechas de arroz se

cubrieron con *Azolla* casi inmediatamente después del trasplante.

Supresor de la Mala Hierba.

Lumpkin y Plucknett 1982; menciona que *Azolla* es una valiosa supresora de otras malas hierbas.

En algunos campos de arroz, el beneficio de *Azolla* consiste en la supresión de la mala hierba que puede aun sobrepasar el beneficio de la fijación de nitrógeno. Nguyen 1930 citado por Stewart 1977; reporto que una delgada capa de *Azolla* causó la muerte de *Utriculariaflexuosa*, *Echinachloa crusgalli* y *Sagittaria* (malas hierbas acuáticas). Talley 1977 reporto que *A. Caroliniana* desplazo con éxito a *Lemna* del lago danés, pero posteriormente no pudo sobrevivir al frío invierno.

Control Químico de *Azolla*

La completa erradicación de *Azolla* resulta difícil, especialmente en localidades como en Nueva Zelanda donde es una plaga muy seria. En la eliminación de todas las plantas vivientes no es recomendable utilizar sustancias químicas debido que el agua se contamina y en el caso particular de *Azolla* es probable que debido al intenso desarrollo de esta se reinfecte el agua. La literatura de *Azolla* frecuentemente menciona que la infestación es comunmente causada por flujo de agua.

Becking 1979 recomendó el PARAQUAT el cual es efectivo a una concentración de 0.2 Kg/ha y no es tóxico para los peces. El Departamento de Recursos Naturales de Florida recomienda rociar las hojas o la inyección en el agua estancada de 0.25- 1 ppm de diquat. Lumpkin y Plucknett 1980 recomiendan el rociado de dieselina, son diluidas o mezcladas con agua en razón de 1:1 para destruir a *Azolla*.

Control Biológico de *Azolla*.

Los métodos biológicos y los físicos son los preferidos para el continuo control de *Azolla*. Lumpkin y Plucknett 1980 describió un sistema de flujo laminar el cual desnata a *Azolla*, este experimento se realizó en la bahía de Louisiana. Lumpkin y Plucknett 1980 revisaron

el uso de la mariposa nocturna o polilla *Pamea multiplicata* para controlar *Salsvinia* y reportaron que la mariposa que es comunmente encontrada en *A. Caroliniana*. *Paulinia acuminata* puede tambien utilizarse en el control de *Salsvinia* y *Azolla* (Lumpkin y Plucnett 1980)

Los esfuerzos iniciales deben concentrarse en prevenir la contaminación del agua la cual provee de nutrientes, especialmente el fósforo, que es necesario para el crecimiento de *Azolla*. Los peces se utilizan para el control biológico de *Azolla*.

Azolla es y puede transformarse en mala hierba en lugares y/o situaciones especiales pero su frágil estructura y altos requerimientos nutricionales previene su invasión en la mayoría de los arroyos. Cuerpos de agua creada por el hombre ricos en nutrientes son susceptibles de invasión. La presencia de *Azolla* en canales, campos nutricionales y campos donde el arroz es sembrado por difusión no es deseable. Con una planeación adecuada y buena administración, *Azolla* no debe convertirse en una plaga; por lo contrario, puede ser usada para el control de otras plagas.

12.7 *Azolla* como Forraje.

Moore 1969 reporto que *Azolla* en Indochina (con o sin otras plantas acuáticas, *Lemna*, *Pistia*, *Salsvinia*) es colectada de las lagunas o charcos cerca de las moradas de los campesinos y los utilizan en la alimentación de puercos y patos. Esto dió origen a la creencia de que *Azolla* desarrollo la grasa del cuerpo de estos animales (Moore 1969). En Vietnam *Azolla* es usada como comida para ganado vacuno, aves de corral y pescados (Moore 1969). *Azolla* es comunmente usada por los chinos para el crecimiento de la *Pistica*, que es utilizada como comida de los puercos.

En Formosa es tambien usada para comida de los puercos y lo aceptan como normal (Moore 1969). Desde el punto de vista de nutrientes inorgánicos (Cuadros 3 y 12) es aparente que la *Azolla* cosechada de los campos podría proveer forraje de buena calidad. Moore 1969 reporto los valores nutricionales de *Azolla*, son los siguientes;

proteína 23.8, grasa cruda 4.4 % fibra cruda 9.5 % Almidón 6.4 %. Estudios adicionales en el uso de *Azolla* como alimento han sido realizados con gallinas (Castillo et al 1981) rumiantes (Dolberg et al 1981); Scharpenseel et al .,1982; Waha, 1983) carpa de hierbas (Cassani, 1981). Todos los anteriores citados por; Elkan 1987. Los resultados son generalmente buenos pero muestran que el uso de *Azolla* como alimento debe ser limitado en la dieta porque sus constituyentes no estan bien balanceados y tienen fracciones indigeribles. Lumpkin y Plucknett 1980 reporta que una hectarea de *Azolla* puede producir de 540-720 Kg de proteína asimilable por mes. Se hicieron experimentos comparativos de alimentación de cerdos unos utilizando *Azolla* y otros sin *Azolla*, y los resultados fueron los siguientes; su excremento contenía 0.87 % de nitrógeno comparado con 0.42 % para cerdos con dieta regular.

En el cuadro 12 se observan características químicas de *Azolla*.

Cuadro numero 12.

Análisis Químico de *Azolla pinnata* (Singh, 1979).

COMPONENTES	% DE MATERIA BASICA SECA.
Ceniza	10.5
Grasa cruda	3 - 3.36
Proteína cruda	23 -30
Nitrógeno	4 - 5
Fósforo	0.5 - 0.9
Calcio	0.1 - 1.0
Potasio	2 - 4.5
Magnesio	0.5 - 0.65
Manganeso	0.11 - 0.16
Fierro	0.060-0.26
Azúcares solubles	3.4 -3.5
Almidón	6.5 - 6.54
fibra	9.5
Carbohidratos	61
Clorofila a	0.34 -0.55

Azolla tiene un alto contenido protéico con valor de 13 % (Tran y Dao 1973), 16.1 % (Anónimo 1975a), 22.6 % (Fujiwara et al .,1947) y 23.4 % (Buckingham et al .1977). Todos los anteriores fueron citados por Lumpkin y Plucknett 1980).

12.8 *Azolla* como Comida de Peces y Control de Plagas.

La carpa de hierba *Etenopharyngodon idella*, ha sido estudiada como un control biológico para hierbas acuáticas (Anoním, 1971a ; Edwards, 1974, 1975; Varghese et al ., 1976 citados por; Lumpkin y Plucknett 1980 . Este pez herbívoro tiene un corto, e ineficiente sistema digestivo y a temperatura moderada del agua, puede consumir diariamente más que su propio peso de plagas acuáticas. Este pez normalmente no ovula o pone huevos fuera de su río nativo (Amur) al menos que la hormona Pituitaria sea adicionada al agua donde se encuentra el pez; por eso su número puede ser controlado.

La carpa hierba muestra una marcada preferencia por *Azolla*, *Lemna*, y otras plagas flotantes pequeñas. Una cruce híbrida de la carpa hierba (*Etenopharyngodon idella*) con la carpa Israelí (*Cyprinus carpio*) indicó su preferencia a *A. caroliniana* y aun a el sistema de raíces de *Pistia Stratiotes*. Otro pez, *Tilapia mossambica* ha demostrado ser un eficiente destructor de la vegetación acuática. En pruebas de alimentación , se ponen diferentes variedades de plantas acuáticas y los peces inmediatamente ingieren al helecho; *Azolla* y a *Lemna*.

12.9. Control del Mosquito.

En el medio Internacional se utiliza a *Azolla* (algunas veces llamado el Helecho mosquito) para el control del mosquito. Las plantas de *Azolla* previenen la puesta de los huevos del mosquito por las hembras e impide que algunas larvas que llegan a nacer, respiren debido al crecimiento superficial de *Azolla*. (Benedict, 1923., King et al ., 1942; Cohn y Renlund, 1953; Shaver, 1954 citados por Lumpkin y Plucnett 1980; no existen muchos datos experimentales para corroborarlo. Un reporte publicado en 1909 por el Departamento de Comercio y Trabajo (citado por Lumpkin and Plucnett 1980; señalaban el establecimiento de una estación para el control de malaria en Wilhelmshaven. Alemania . *Azolla* puede sofocar la larva del mosquito y prevenir que los insectos depositen los huevos en el agua; esto fue utilizado con éxito por una compañía de destrucción del mosquito en el río Rhin.

12.10 Miscelanea.

Azolla ha sido utilizada en la purificación del agua (Rains y Talley 1979)., y como un ingrediente en la producción del jabón por algunas tribus africanas es también mascada para curar dolor de garganta en Nueva Zelanda (Talley et al 1977; Elkan 1987) indica que con un método de procesado, *Azolla* puede transformarse en alimento humano. El Dr .P. K. Singh escribio de Cuttack, India que el ha comido *Azolla* regularmente en varias preparaciones fritas; reporta que estas preparaciones tienen buen sabor y no causan dificultades digestivas. Propone popularizar el cultivo de *Azolla* en pequeñas tribus para consumo humano. Producción de hidrógeno en Brasil y Biogas (Nacional Academy of Sciences 1987; FAO.1978).

12.11 Material Genético.

La Selección y recolección de material genético de *Azolla* no ha recibido suficiente atención. Algunas instituciones han empezado a coleccionar las 6 especies y variedades. China (Lumpkin, 1977) y Vietnam (Tran y Dao, 1973; citado por Rains and Talley 1979) están seleccionando variedades de *A. pinnata* para conocer sus requerimientos regionales. En California Talley et al., (1977) han usado *A. filiculoides* y *A. mexicana* en estudios agronómicos, pero la mayoría de los investigadores utilizan solamente *A. pinnata*, la cual es originaria de Asia.

13. INSECTOS Y ENFERMEDADES.

Un elemento clave en el cultivo de *Azolla* es una prevención efectiva de control de insectos y enfermedades, afortunadamente los insectos que atacan *Azolla* son diferentes de aquellos que atacan al arroz, la mayoría de las plagas que atacan *Azolla* son controladas por pesticidas usadas para la cosecha de arroz (Singh 1977).

Los insectos que atacan a *Azolla* durante el verano especialmente cuando las temperaturas alcanzan 28 C son mas resistentes y si no se toman las debidas precauciones un cultivo de *Azolla* puede ser destruido en 3 a 5 días. Singh 1977 recomienda utilizar de 2.3 a 3 kilogramos de un ingrediente activo de furadan por hectárea para controlar los insectos de *Azolla*, en contraste Rains y Singh 1979, recomiendan la utilización de insectos como un biocontrol en las localidades donde *Azolla* es una mala hierba.

14.- ESTUDIOS DE *Azolla* REALIZADOS EN MEXICO.

En la presente investigación se ha considerado necesario tener parámetros técnicos que a mediano plazo nos permitan hacer uso de este recurso vegetal, con el propósito de reducir la demanda de fertilizantes nitrogenados cuyo costo es generalmente elevado. El helecho acuático *Azolla* representa una opción viable para el cultivo de arroz y otras especies, pero actualmente no es explotado en México. Se ha llevado a cabo algunas investigaciones sobre el helecho *Azolla* pero casi siempre en laboratorio e Invernadero, siendo escasos los trabajos de campo. (Pérez y Olguin 1986, Quintero, Ferrera Cerrato 1987).

En México se cuenta con las siguientes especies de *Azolla* :

A. microphylla, *A. filiculoides*, *A. caroliniana* y *A. mexicana*. Se localizan en el sureste del país debido a que existen grandes extensiones de lagunas y pantanos y los estados son los siguientes: Campeche, Veracruz, Tabasco y Chiapas, aunque en menor proporción se encuentra en Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala, Puebla, D.F., Morelos, Tamaulipas y Sinaloa.

Su localización se observa en el mapa 1.

14.1- Utilización de *Azolla* como Biofertilizante en Condiciones de Invernadero y de Campo.

14.1.1- En Invernadero.

14.1.1.1. En México se han hecho diferentes estudios acerca de *Azolla* como biofertilizante en los cuales se han utilizado diferentes variedades de *Azolla*, en este caso se utilizó *Azolla filiculoides* colectada en la laguna de Tecocomulco, Estado de Hidalgo.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 13 y 14 y se concluye lo siguiente : Cuadro 13 señala que al incorporar el biofertilizante al momento de la siembra en forma de biomasa seca, hay un mejor aprovechamiento del nitrógeno mineralizado. En el cuadro 14 las relaciones C:N indican que hay aporte de nitrógeno en las diferentes incorporaciones en los tiempos probados.

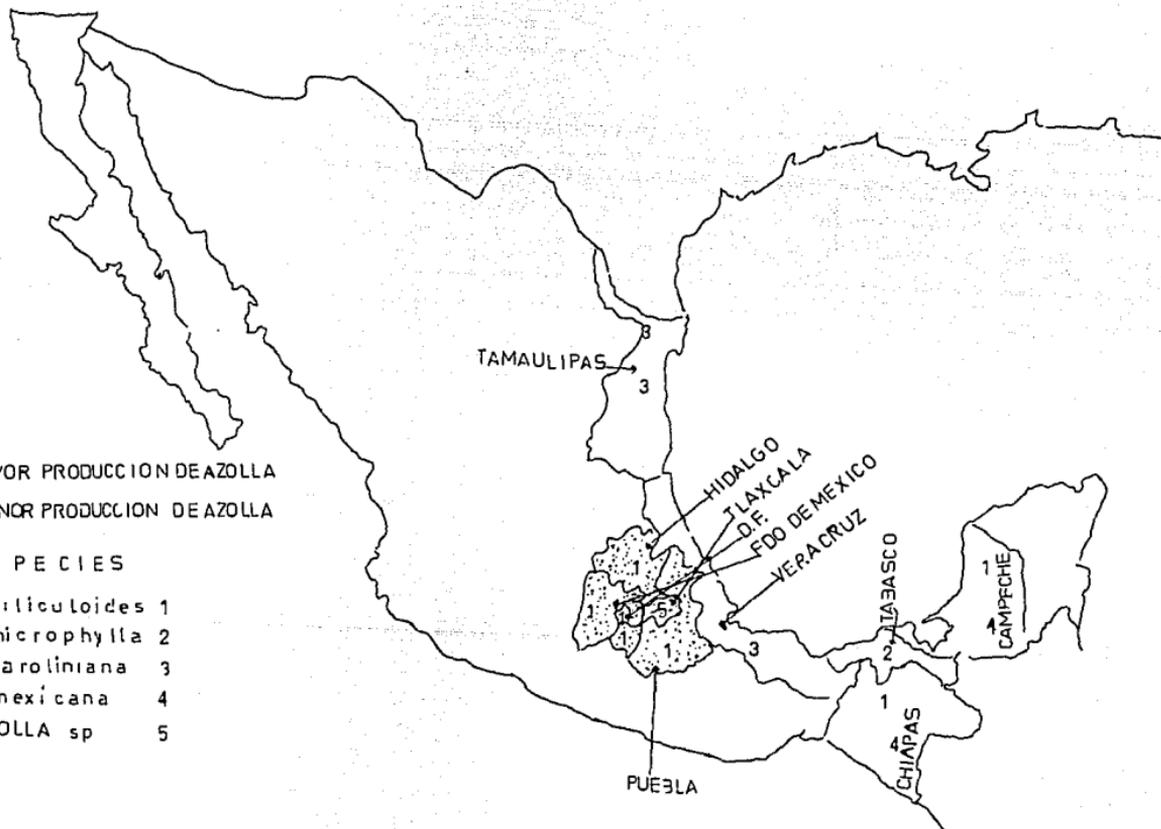
LOCALIZACION DE LAS ESPECIES DE AZOLLA EN LOS DIFERENTES ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA

84

MAYOR PRODUCCION DE AZOLLA
 MENOR PRODUCCION DE AZOLLA

ESPECIES

- A. filiculoides 1
- A. microphylla 2
- A. caroliniana 3
- A. mexicana 4
- AZOLLA sp 5



CUADRO 13

RESPUESTA DEL CULTIVO DE ARROZ A LA AZOLLA *FILICULOIDES* UTILIZADA COMO BIOFERTILIZANTE APLICADA A LOS 30, 20, 10 Y AL MOMENTO DE LA SIEMBRA (QUINTERO L.B. Y FERREIRA C.R. 1967)

Niveles de biofertilizante ppm	Días de incubación a la siembra							
	30		20		10		00	
	a	b	a	b	a	b	a	b
0 000	1.77	1.51	2.03	1.21	2.47	1.33	2.96	1.16
0 000	1.97	1.51	2.44	1.40	3.10	1.33	4.30	1.15
16000	2.26	1.07	1.90	1.26	3.27	1.10	4.72	1.19

a = Biomasa seca en g.

b = Porcentaje de Nitrogeno.

CUADRO 14

RELACION C:N DE LA AZOLLA *FILICULOIDES* APLICADA COMO BIOFERTILIZANTE EN EL CULTIVO DE ARROZ (QUINTERO L.B. Y FERREIRA C. R. 1967).

Tiempo de incubación (días)	C	N	C / N
10	20.00	3.08	6.49
20	22.90	3.02	7.53
10	24.13	3.42	7.03
00	26.22	2.35	11.16

14.1.1.2.. En otro estudio realizado en Tabasco se colectaron muestras de *Azolla caroliniana* y se determino el efecto de diferentes fuentes de N₂ y P en el crecimiento de *Azolla*, observándose que el mayor crecimiento se obtuvo con la mezcla de Urea y Roca fosfórica. (figura 8).

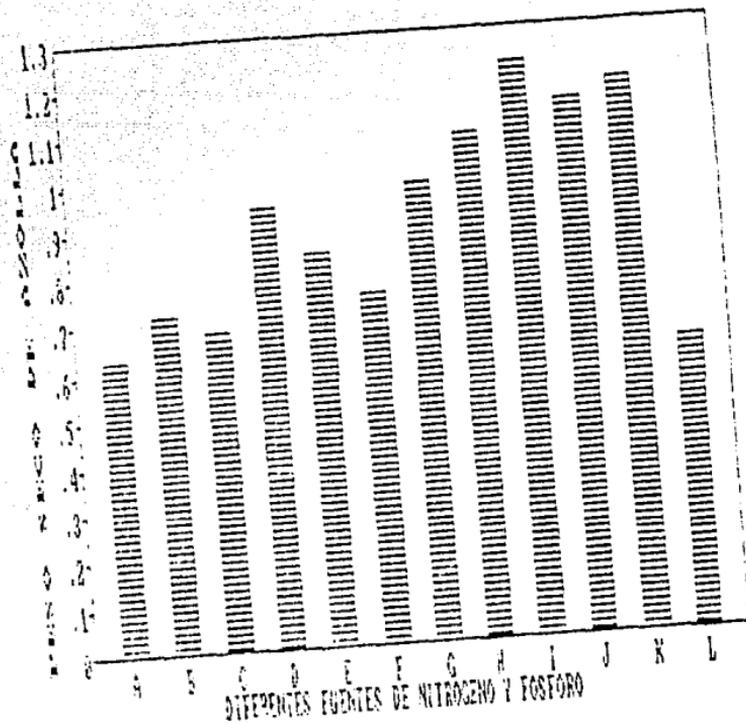


FIG. 9 Desarrollo de *alfalfa* con diferentes fuentes de N y P (crecimiento en 30 días).

A = Control

B = $(NH_4)_2 SO_4$

C = Urea

D = $(NH_4)_2 SO_4$ + Superfosfato simple

E = $(NH_4)_2 SO_4$ + Superfosfato triple

F = $(NH_4)_2 SO_4$ + Roca fosfórica

G = Urea + Superfosfato simple

H = Urea + Superfosfato triple

I = Urea + Roca fosfórica

J = Superfosfato simple

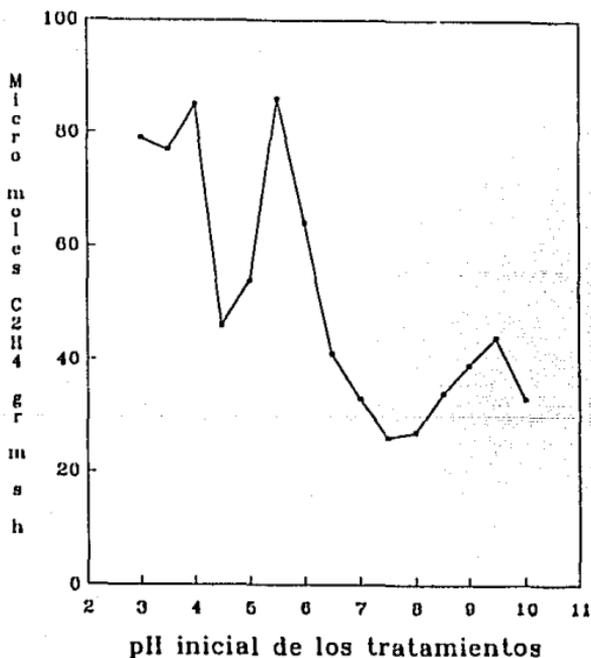
K = Superfosfato triple

L = Roca fosfórica

(Ferreira C. F. y Miranda R. A., 1982)

14.1.1.3. En otro estudio realizado en el Colegio de Postgraduados, se determinó la tasa de fijación de nitrógeno en la simbiosis de *Azolla-Anabaena* bajo el efecto de diferentes pH's.

Se utilizó *Azolla* sp., colectada en la carretera México-Puebla. El experimento se realizó en invernadero, variando media unidad de pH en el rango de 3.5-10.0 en solución nutritiva Yoshiba (Van Hove et al., 1982). Se midió el pH a los 10 días a la cosecha. Y se determinó posteriormente la actividad de la nitrogenasa mediante cromatografía de gases. En la figura 9. La máxima actividad de la enzima nitrogenasa se presentó en los pH's de 3.0 a 6.0, disminuyendo aproximadamente a la mitad en los pH's de 6.5 a 10. (Quintero y Ferrera.Cerrato, 1988).



14.1.1.4. Otro estudio realizado en el Colegio de Posgraduado, consistió en evaluar el potencial agronómico de *Azolla* como biofertilizante. Para esta prueba se utilizó como cultivo indicador lechuga orejona (*Lactuca sativa* L.) var. Paní Instn Cof, que se sembró en almácigo 20 días antes de Transplante.

Se seleccionaron tres fechas de incorporación del biofertilizante al suelo. 30 días antes del transplante, 15 días antes y al momento del transplante, así como ocho dosis diferentes de *Azolla* que va desde el equivalente a 0 hasta 200 Kg N/ha (Rodríguez 1990).

Como punto de comparación se utilizó únicamente al momento del trasplante sulfato de amonio en dosis de 0 hasta 200 Kg N/ha.

La incorporación de *Azolla* 15 días antes del transplante y al momento de este presentaron rendimientos similares entre sí.

La incorporación de *Azolla* 30 días antes del transplante presenta desde las mínimas dosis rendimientos superiores a los fertilizados con nitrógeno mineral hasta un equivalente de 100 Kg N/ha .

Para ver el efecto residual del biofertilizante se instaló de nuevo el mismo experimento empleando los mismos suelos. Los resultados se presentan con las mismas tendencias que en el primer experimento (Rodríguez 1990).

14.1.2- En Campo.

14.1.2.1. El presente experimento de campo se realizó durante la primavera de 1985, en la laguna experimental del Centro Regional de Enseñanza, Capacitación e Investigación para el desarrollo agropecuario del Trópico Húmedo (CRECIDATH) perteneciente al Colegio de Postgraduados de Chapingo.

Evaluando diferentes densidades de transplante de *Azolla microphylla* y su efecto sobre el crecimiento, rendimiento y producción de nitrógeno. Los tratamientos evaluados fueron las siguientes densidades de transplante: 100, 200, 300, 400 y 500 gm en un diseño experimental de bloques al azar con 5 repeticiones por tratamiento.

Las unidades experimentales fueron de 2.25 m² manteniendo permanentemente en ellas una lamina de agua que fluctuó 15 a 20 cm.

Cada siete días se tomaron muestras determinando las siguientes variables:

- Rendimiento de materia seca
- Tasa relativa de crecimiento
- Producción de nitrógeno

Los resultados fueron los siguientes: El rendimiento de materia fresca y seca de *Azolla* se incrementó considerablemente conforme se aumentó la densidad de transplante (figura 10) no así la tasa relativa de crecimiento media, la cual disminuyó al aumentar la densidad de transplante (cuadro 15). La máxima tasa relativa de crecimiento media correspondió a la D1, siendo de 0.114 g.g.1 día y la mayor a la D5 (0.059 g.g. día).

En relación al porcentaje de materia seca en base al peso fresco se determinó un mayor porcentaje para las altas densidades (D4 y D5), siendo de 6.1 y 5.9, respectivamente.

De acuerdo al análisis de varianza (P.< 0.05) para porcentaje de materia seca, no hubo diferencias significativas entre D1, D2 y D3 pero sí entre éstas y la D4 y D5 (cuadro 15).

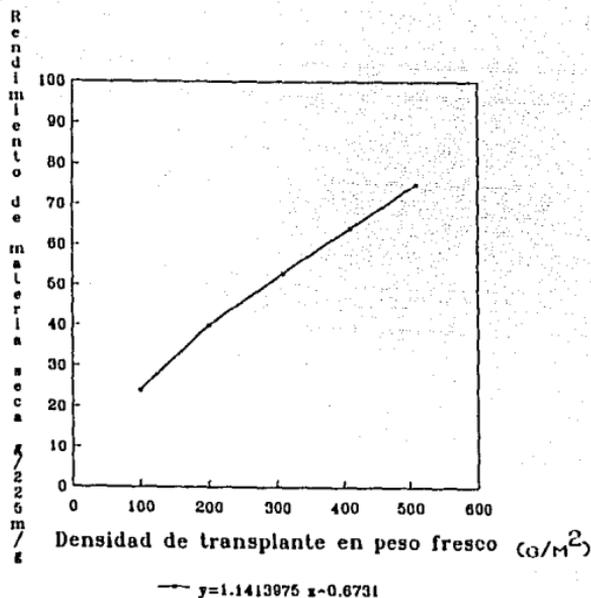


FIG. 10 EFECTO DE LA DENSIDAD DE TRANSPLANTE SOBRE EL RENDIMIENTO DE MATERIA SECA DE AZOLLA BAJO CONDICIONES DE CAMPO (PEREZ, 1986).

CUADRO 13

Efecto de la densidad de transplante de Azolla bajo condiciones de campo, sobre la tasa relativa de crecimiento medio (en gr x gr⁻¹ día⁻¹) (Perez D. A., 1986)

TRANSPLANTE	MUESTRO					\bar{x}
	1	2	3	4	5	
(equiv. 0 ¹ kg m ⁻²)	0.034	0.110	0.123	0.113	0.118	0.114
(equiv. 0 ² kg m ⁻²)	0.081	0.111	0.127	0.098	0.145	0.112
(equiv. 0 ³ kg m ⁻²)	0.071	0.092	0.104	0.098	0.124	0.096
(equiv. 0 ⁴ kg m ⁻²)	0.066	0.079	0.092	0.075	0.082	0.078
(equiv. 0 ⁵ kg m ⁻²)	0.041	0.077	0.066	0.047	0.061	0.059

Cada valor es el promedio de cinco repeticiones.

El mayor rendimiento promedio de materia seca (g m sem) durante el experimento se obtuvo con la D4 (30.6), aunque de acuerdo con el análisis de varianza ($P=\alpha$ 0.05) no se detectaron diferencias significativas entre esta densidad y la D5. El menor rendimiento correspondió a la D1, siendo de 10.6 (cuadro 16).

Cuadro 16

Efecto de la densidad de transplante sobre el rendimiento y porcentaje de materia seca de *Azolla*. Cada valor es el promedio de cinco muestreos con cinco repeticiones por tratamiento (Olguin P.C. y Perez V. A., 1986).

Densidad de transplante (g m ⁻²)	Porcentaje de materia seca	Rendimiento promedio de materia seca (g m ⁻² sem ⁻¹)
100	4.87 a	10.6 c
200	4.95 a	22.2 b
300	4.83 a	23.8 b
400	6.16 b	30.6 a
500	5.97 b	30.5 a

Tratamiento con la misma letra no presenta diferencia significativa de acuerdo con la prueba de t-Student ($P < 0.05$).

Considerando el rendimiento de materia seca por tratamiento con un contenido de 3.4 % de nitrógeno (en base seca) para los tratamientos y dado que es factible cultivar al helecho *Azolla*. En esta región durante el año, sería posible producir con la D4 (equivalente a 4 ton/ha hasta 524 Kg de nitrógeno ha año (cuadro 17).

Cuadro 17

Producción potencial de materia vegetal y de N en *Azolla sp* dependiendo de su densidad de transplante (Olguin P.C. y Perez V. A., 1986)

Equiv. Ton/ha ⁻¹	Densidad potencial de transplante		Rendimiento de materia vegetal		Rendimiento potencial de materia vegetal	Producción potencial de nitrógeno
	gr m ⁻²	g m ⁻² d ⁻¹	g m ⁻² sem ⁻¹	g m ⁻² mes ⁻¹	Ton ha ⁻¹ año ⁻¹	kg ha ⁻¹ año ⁻¹
1	100	21.31 a	217.7	217.7	217.7	107.4
2	200	67.3	416.4	416.4	416.4	207.4
3	300	79.40	433.60	433.60	433.60	221.9
4	400	74.37	418.9	418.9	418.9	208.2
5	500	74.36	397.6	397.6	397.6	201.0

a materia fresca

aa materia seca

1 La producción de nitrógeno está basada asumiendo que *Azolla sp* contiene 3.4 % de Nitrógeno en base seca.

14.2. Utilización de *Azolla* como Forraje.

Azolla contiene buena cantidad de proteínas y minerales, lo que representa una amplia perspectiva para la elaboración de dietas alimenticias para animales. (Cruz, et al 1985). En el Colegio de Postgraduados se han hecho estudios para determinar los efectos de *Azolla* como forraje para cerdos en comparación con 2 especies vegetales y una animal y los resultados fueron los siguientes. (Ruiz y Olguin 1983), Cuadro 18.

CUADRO 18
ALIMENTO PARA CERDOS DE RAZA YORKSHIRE DE 52 A 54 DIAS DE EDAD DURANTE 16 SEMANAS (Ruiz H. R. y Olguin P. C., 1983)

Tipo de alimento	Contenido de proteína	Procesamiento (alimento balanceado)	Elaboración		Ganancia en peso Kg	TPC %	Cantidad de alimento Kg m.s./día	Conversión PRC alimenticia	
			AEC	AC					
T1: Hielera	-	Complemento	-	AC(T1)	38.2	9.2	1.7-1.9	4.1	1.4
T2: <i>Azolla</i> sp. 23	23	Lavado	-	AC(forraje (T2))	37.0	9.7	1.7-1.9	3.9	1.23
T3: Espinaca	25	Cultivada para porcinos (3 hr. 32 días)	REC(forraje (T3))	-	44.2	9.9	1.7-1.9	3.5	1.32
T4: Pajar de mulo walzer comercial	-	Complemento y molido	REC(T4)	-	44.3	10.2	1.7-1.9	3.5	1.29
Diferencia significativa	-	-	-	-	1(p<0.05)	3(p<0.05)	-	3(p<0.05)	-

AEC (alimento elaborado en CRECIDAEM) = fue administrado en libertad comparándose con AC.

AC = Alimento comercial.

TPC = A tasa relativa de crecimiento.

PBC = beneficio costo.

CRECIDAEM = Centro Regional de Enseñanza, Capacitación e Investigación para el Desarrollo Agropecuario del tropico húmedo.

La PRC (su liza) para los tratamientos que consumieron el mismo alimento (T1:T2 y T3:T4), para diferentes (P10,01) para los que recibieron alimento diferente, se confirma que el alto potencial biótico de las zonas bajas puede ser utilizado para producir ingredientes alimenticios de manera sencilla y barata. La elaboración es fácil debido a la simplicidad de los procedimientos que puede seguirse.

14.3. Utilización de *Azolla* como Alimento de Peces.

En la Universidad Autónoma Metropolitana se hicieron estudios para determinar el potencial de *Azolla* como alimento de peces, y se determino lo siguiente:

Se realizaron experimentos en acuarios alimentando a los peces, unos con *Azolla* fresca y otros con *Azolla* seca, obteniendo una mejor tasa instantánea de crecimiento (TIC) y factor de conversión (FR) con *Azolla* fresca. También se comparó el efecto de *Azolla* en la dieta de peces contra el alimento convencional producido por ALBAMEX. Los resultados obtenidos suguleren nuevos experimentos de peces alimentados con *Azolla*, suplementada con aminoácidos y carbohidratos para lograr una mejor conversión alimenticia con respecto al alimento comercial. (Cruz et al 1985).

15.- CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

1.- Se concluye que *Azolla* responde razonablemente a los fertilizantes fosfatados y requiere del abastecimiento continuo del elemento para su rápida propagación.

2.- *Azolla* es una fuente ideal de abastecimiento de nitrógeno al cultivo por sí sola, pero en la práctica se recomienda que se adicione ciertas cantidades de P para que exista una mayor fijación de nitrógeno, esto da como resultado una mayor acumulación de Nitrógeno en el suelo.

3.- Con una planeación y manejo adecuado de *Azolla* no debe convertirse en una plaga, por lo contrario este helecho se puede utilizar para el control de otras plagas.

4.- En algunos campos de arroz el beneficio de *Azolla* en la eliminación de las plagas (malas hierbas) sobrepasa el beneficio de la fijación de nitrógeno.

5.- En el presente trabajo se observa que las especies de *Azolla* y sus variedades tienen diferentes tolerancias a las temperaturas extremas, algunas sobreviven en un amplio rango de temperaturas (-5 a 35 C, algunas de estas especies se desarrollan en México) en tanto que otras sobreviven solamente dentro de un pequeño rango de temperaturas (25 a 30 C).

6.- *Azolla* podría utilizarse en la alimentación humana debido a su contenido protéico, no presenta mal sabor y no causa trastornos digestivos, esta sería una alternativa de alimentación para los países en vías de desarrollo debido a su bajo costo de producción.

7.- *Azolla* puede desarrollarse en las condiciones existentes en cultivos inundados donde el nitrógeno aplicado en forma de fertilizante químico sufre fenómenos de reducción (pérdida de nitrógeno).

8.- *Azolla* tiene la capacidad para suprimir el desarrollo de plagas acuáticas sin afectar el crecimiento del arroz transplantado en el campo.

9.- *Azolla* por su contenido protéico y sometida a un procesamiento adecuado puede utilizarse como forraje para alimentos de animales domésticos (bovinos, ovinos, porcinos y aves).

10.- *Azolla* además de proveer nitrógeno proporciona también materia orgánica, micronutrientes y posiblemente sustancias promotoras de crecimiento, por lo que su uso incrementa la productividad del suelo, particularmente en países tropicales.

11.- *Azolla* puede ser cultivada en tanques poco profundos durante todo el año en condiciones adecuadas para su posterior utilización como abono verde.

12.- Los experimentos hechos en diferentes países en el cultivo conjunto *Azolla*-arroz reporta lo siguiente: permite reducir el uso de fertilizantes nitrogenados, elimina plantas indeseables que regularmente crecen dentro de los arrozales y se optimiza el uso de fertilizantes fosfatados y de pesticidas, evitando la contaminación generada por su empleo indiscriminado en los suelos.

13.- Con base en los resultados de campo obtenidos en México se puede decir que la producción potencial de nitrógeno por el helecho-*Azolla* en la región central costera del estado de Veracruz podría ser de unos 542 kg/ha/año, cantidad que es equivalente al contenido de nitrógeno de 2.71 toneladas de Sulfato de Amonio cuyo valor en el mercado a precios de octubre de 1989 fué de \$500,000 mn.

14.- De este estudio se desprende que el seguir desarrollando conocimientos sobre los requerimientos y técnicas de cultivo de *Azolla* acorde a nuestras condiciones, abre caminos interesantes, ya que puede contribuir en corto tiempo a cubrir las necesidades de nitrógeno de cultivos agrícolas o comerciales, especialmente el de arroz, y por su

contenido de proteína puede contribuir a ser una excelente fuente de forraje o materia prima para la elaboración de alimentos balanceados destinados a alimentar animales útiles al hombre.

15.- Por estudios llevados a cabo en México se concluye que la densidad de transplante afecta significativamente al rendimiento y al porcentaje de materia seca o contenido de humedad de *Azolla*. En estos experimentos se encontró también que la tasa relativa de crecimiento se incremento conforme disminuyó la densidad de transplante y viceversa; lo que nos indica que el crecimiento de *Azolla* se ve reducido a altas densidades de transplante lo que es provocado por la limitación de espacio y nutrimentos.

16.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ashton, P.J. 1974. " Effect of Some environmental Factors on the Growth of *Azolla filiculoides* ". Lam. In: Orange River Progress Report, pp. 124-138. Inst. for Environmental Sci Univ. O.F.S. Bloemfontein, South Africa
- 2.- Ashton, P.J. y R. D. Walmsley, 1976. " El Helecho Acuatico *Azolla* y su Simbionte *Anabaena* ". Endeavour 35:39-43.
- 3.- Beevers, L. 1981. " Nitrogen Metabolism in Plants " .In: Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur. (Ed). H. Brote and A. Trebst. Springer. Verlag. New. York. U.S.A. pp. 15-29.
- 4.- Becking, J.H. 1979. " Environmental Requirements of *Azolla* for Use in Tropical Rice Production". In: Nitrogen and Rice pp. 345-373. Int. Rice Res. Inst. Los Baños, Laguna, Philippines.
- 5.- Becking, J.H. 1976. " Nitrogen Fixation in Some Natural Ecosystems Indonesia". In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Edited by P.S. Nutman. Cambridge University Press. London. Printed in Great Britain. pp. 539-550.
- 6.- Beringer J.E. and Johnston, A. W. 1978. " Critique of Control of Biological Nitrogen Fixation". In: Nitrogen in the Environment. Soil Plant Nitrogen Relationships . Vol 2. (Ed). Donald, R. Nielsen., J.G. Mac. Donald, Academic Press. New. York. U.S.A. pp. 417-428.
- 7.- Buckingham, K. Ela, S.W. Morris, J.G. Goldman, C.R. 1978. " Nutritive Value of Nitrogen-Fixing Acuatic Fern *Azolla filiculoides*. J. Agric. Food. Chem. 26:1230-1234.
- 8.- Cruz, T. Schettino B. y Muñoz D. 1985. " Potencial de *Azolla* como Alimento de Peces". Departamento de Biotecnología UAM. 3 . Resumen . Sobre Fijación Biológica de Nitrogeno
- 9.- Elkan, H. G. 1987. "Symbiotic Nitrogen Fixation Technology, Collection and Maintenance of *Azolla* ". Edited by Marcel Dekker, New York and Basel. 55-94.
- 10.- Emerich D.W. and Evans H.J. 1980 "Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production". In: Biological Nitrogen Fixation with an Emphasis on the Legumes. Edited by Anthony San Pietro. Academic Press New. York. U.S.A. pp. 134-137.
- 11- Espinoza, A., S.A. 1982. " Aislamiento, Cultivo e Incorporación de Algas azul verde y *Azolla filiculoides* ". Lam. en Suelo de Arrozal del Edo. de Morelos. Tesis Profesional UNAM. " Facultad de Química " .
- 12.- Espinoza A., S.A., S. Palacios M. y M. Ortega M. 1985. " Estudio Sobre el Crecimiento de *Azolla filiculoides* en Medios de Cultivo y en Suelos de Arrozal del Estado de Morelos, México, bajo condiciones de invernadero ". Rev. Lat-amer. Microbiol. 27:61-69.

- 13.- FAO. 1978. "China: Propagacion de la *Azolla* y Tecnologia del Biogas a pequena escala". Boletín de Suelos de la FAO No. 41 p.21.
- 14.- Ferrera-Cerrato, R. 1980. " Estudio Preliminar de *Azolla* sp. un Helecho Acuatico con Potencial Agronómico en el Trópico Humedo Mexicano ". Rev. Lat-amer. Microbiol. 22:171-174.
- 15.- Ferrera-Cerrato, R. y Miranda. R.A. 1982. " Propagation of an *Azolla* sp. and its Potential as a Green Manure for Corn in México". In Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Edited by P. H. Graham and S. C. Harris eds. Centro International de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, pp. 561-564.
- 16.- Fitter A.H. and R.K.M. Hay 1981. " Mineral Nutrients " In: Environmental Physiology of Plants. Academic Press. New York. U.S.A. pp.75.
- 17.- Flugge U. I. Mark, S. Fresil, M. and Hans. W. H. 1982 " On the Participation of Phosphoribulo Kinase in the Light", Regulation of CO2 Fixation. Plant Physiol. 69, 263-267.
- 18.- Gerald, A. Peters and Berger C. M. 1974. " The *Azolla*, *Anabaena azollae* Relationship. I. Initial characterization of the association " .Plant Physiol. 53, 813-819.
- 19.- Gerald, A. P., William, W. R. and E. T. Jr. Robert .1976. " *Azolla Anabaena azollae* Relationship II. Photosynthetically Driven, Nitrogenase- Catalyzed N2 Production". Plant Physiol. 58, 119-126.
- 20.- Haller, W.T., Sutton D.L.y Barlowe, W.C. 1974. "Effects of Salinity on the Growth of Several Aquatic Macrophytes ". Ecology 55: 891-894.
- 21.- Hill , D.J. 1977. " The Role of *Anabaena* in the *Azolla*-*Anabaena* Symbiosis". New Phytol. 78:611-616.
- 22.- Ito, O. e Watanabe, I. 1983. " The Realtionship Between Combined Nitrogen Uptakes and Nitrogen Fixation in *Azolla*-*Anabaena* Symbiosis. New Phytol. 95:647-654.
- 23.- Ito, O. e I. Watanabe, 1985. "Availability to Rice Plants of Nitrogen Fixed by *Azolla* Soil". Sci.Plant Nutr. 31, 91-104.
- 24.- Kennedy., I.R. 1979. " Integration of Nitrogenase in Cellular Metabolism. In A treatise on Dinitrogen Fixation Section I and II: Inorganic and Physical Chemistry and Biochemistry. Edited by Hardy., R.W., Bottomley, F. and Burns. John Wiley and Sons, Inc. New York. U.S.A. pp. 663-667.
- 25.- Kikuchi M. Y. Watanabe L. D. Haws. 1984. "Economic Evaluation of *Azolla* Use in Rice Production ". pp 569-592. In. International Rice Research Institute. Organic Matter and Rice. Los Baños Laguna Philippines.

- 25.- Krogmann, D. W. 1977. "Blue-Green Algae". Encyclopedia of Plant Physiology New Series Vol. 5 Photosynthesis I. Springer Verlag. New York. U.S.A. pp. 625-635.
- 27.- Lea, P.E. and Mifflin B.J. 1974. " Alternative Route for Nitrogen Assimilation in Higher Plants. Nature London Vol- 251:614-616.
- 28.- Lea and Mifflin., B.J. 1975. " Glutamate Synthase in Blue Green Algae " . In : Biochem. Soc. Trans. Vol 3:381-384.
- 29.- Lehninger, A. L. 1978. "Biochemistry". Second Edition pp 587-615. Worth publishers INC.
- 30.- Liu, C.C. 1979 " Use of *Azolla* in Rice Production in China ". pp.375-394. In: International Rice Research Institute. Nitrogen and Rice . Los Baños, Philippines.
- 31.- Li, Shi-ye 1984. "*Azolla* in the Paddy Fields of Eastern China". In: International Rice Research Institute. Organic Matter and Rice. Los Baños, Laguna Philippines. pp. 169-178.
- 32.- Lumpkin, T.A. y Plucknett, D.L. 1980. " *Azolla*: Botanic, Physiology and use as a green manure ". Economic Botanic. 34 (2): pp.111-153.
- 33.- Lumpkin, T.A. y Plucknett, D.L. 1982. " *Azolla* as a Green Manure: Use and Management in Crop Production". Westview Tropical Agriculture Series, No. 5 Westview Press, Boulder Colorado, U.S.A. 230 pp.
- 34.- Lumpkin, T.A. y Plucknett, D.L. 1987. " Collection Maintenance and Cultivation of *Azolla* ". Pages 55-94. In Elkan, G.H. (eds) Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. New York. U.S.A.
- 35.- Moore, A. W. 1969. " *Azolla* : Biology and Agronomic Significance". Bot. Rev. 35:17-34.
- 36.- National Academy of Sciences 1987. " Making Aquatic Weeds Useful some perspective for developing Countries. Sixth Printing Washington D.C. U.S.A. pag. 140-144.
- 37.- Nethsinghe D. A., 1976. " The Use of Isotopes and Radiation in Studies on The Efficient Use of Fertilizers". Improved Use of Plant Nutrients. JOIT. FAO/IAEA. Division of Atomic Energy in Agriculture. pp. 125-134.
- 38.- Newton, J.W. 1976. " Photoproduction of Molecular Hydrogen by a Plant Algal Symbiotic System ". Science. 191:559-560.
- 39.- Olguín, P.C. y Pérez A. V. 1986. " Producción de Abono Orgánico Nitrogenado Mediante el Cultivo en Campo de un Helecho Acuático (*Azolla* sp) ". Primer Simposio Nacional de Acuicultura. Pachuca, Hgo. México.

- 40.- Ortega, R. S. 1989. " Aspectos Fisiológicos y Bioquímicos de *Azospirillum* sp y su importancia en la agricultura". Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 41.- Pérez, V., A. 1986. "Efecto de la Fertilización Fosfórica e Irradiación Solar Sobre el Crecimiento de un Helecho Acuático Fijador de Nitrógeno Atmosférico (*Azolla microphylla* K.) de la Región Central Costera del Estado de Veracruz". Tesis Profesional, Universidad Veracruzana. Xalapa , Veracruz. 76 páginas.
- 42.- Peters, G.A. y Mayne, B.C. 1974. " The *Azolla-Anabaena azollae* Relationship II. Localization of Nitrogen Fixing Activity as Assayed by Acetylene Reduction . Plant Physiol. 53: 820-824.
- 43.- Peters, G.A., Toia, R.E. Jr, y Lough, S.M. 1977. "The *Azolla-Anabaena azollae* Relationship V. $^{15}N_2$ Fixation, Acetylene Reduction and H_2 Production ". Plant Physiol. 59:1021-1025.
- 44.- Peters, G.A., Toia, R.E. Jr, Raveed D. y Levine N.J. 1978. "The *Azolla-Anabaena azollae* relationship VI. Morphological aspects of the association ". New Phytol. 80:583-593.
- 45.- Peters., G.A., Mayne, B. C., Ray, T. B. y Jr., Toia, R. E. 1979. "Physiology and Biochemistry of the *Azolla -Anabaena* Symbiosis". In: Nitrogen and Rice . pp. 325-343. Int. Rice Res. Inst. Los Baños, Philippines.
- 46.- Peters, G. A. , Ray, T.A. Mayne, B.C. y Toia, R.E. Jr. 1980a " *Azolla Anabaena* association: Morphological and Physiological Studies " In: Nitrogen Fixation . Vol. 2. Newton, W.E. and Orne Johnson, H.H. (Eds), Univ. Park Press, Baltimore. pp. 293-309.
- 47.- Peters, G.A. Toia, R. E. Jr., Evans, W.R., Christ, D. K., Mayne B.C. y Poole, R.E. 1980 b. " Characterization and Comparisons of Five N_2 -Fixing *Azolla-Anabaena* Associations. I. Optimization on Growth Conditions for Biomass Increase and N_2 Content in a Controlled Environmental". Plant cell Env. 3:261-269.
- 48.- Peters, G.A., Ito, O. V., Tyagi, V.S. and Kaplan, D. 1981. " Physiological Studies on N_2 -Fixing *Azolla* ". In: Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen . Edited by Lyons., J.M., Valentine, D.A., Phillips., D.A.. Basic Series Vol 17. Plenum Press New York. U.S.A. pp. 343-362.
- 49.- Quintero, L. R. y R. Ferrera Cerrato. 1986. " Fijación de Nitrógeno por Diferentes Especies de *Azolla* de la República Mexicana". Resúmenes del XIX Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 26-29 de Noviembre. Manzanillo, Colima, México. pp. 61-62.

- 50.- Quintero, L., y R. Ferrera-Cerrato. 1987. " Estudio de Diferentes Especies de *Azolla* de la República Mexicana". In: SONAFIBIN. Soc. Nal. de la Fijación Biológica de Nitrogeno-México. Memorias y Resúmenes 1er. Congreso Nacional: 25-27 de Febrero. INIREB, Xalapa, Ver. México.
- 51.- Quintero, L., R. y R. Ferrera Cerrato. 1988. " La Simbiosis *Anabaena azollae-Azolla caroliniana* y la Tasa de Fijación de Nitrógeno Bajo el Efecto de Diferentes pH's". In: Resúmenes del II Congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno: Guadalajara, Jalisco. México. Julio 23-25 . pp.18-19
- 52.- Quintero Lizaola Roberto, 1988. " Evaluación y Uso del Biofertilizante *Azolla* en Arroz Bajo Condiciones de Invernadero". Tesis de Maestría en Ciencias, Cp Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- 53.- Rains, D.W., Talley, S.N. 1979. " Use of *Azolla* in North America ". In: Nitrogen and Rice International Rice Research Institute Los Baños ,Philippines. pp. 419-433.
- 54.- Ray, B.T., Peters, G.A., Toid, E.R. Jr. and Berger C. M. 1978. " *Azolla-Anabaena* Relationship VII. Distribution of Amonia-Assimilating Enzymes, Protein, And Chlophyll Between Host and Symbiont. Plant Physiol. 62,463-467.
- 55.- Ray ,B.T. 1979. " *Azolla Anabaena* Relationship VII. Photosynthetic Characterization of the Association and Individual. Plant Physiol. 64,791-795.
- 56.- Rodríguez , M.M. 1990 " Ecología de *Azolla* en la Laguna de Tecocomulco y su Potencial Agronómico ". Tesis de Maestría en Ciencias . Colegio de Postgraduados :Montecillo México.
- 57.- Ruiz. R. R, y Olguin. P.C. 1989. " Engorda de Cerdos con Productos no Convencionales de las Zonas Bajas Tropicales Bajo Condiciones de Semiestabulación ". Investigación en el Colegio de Postgraduados y sus perspectivas. Junio 26-30 Montecillo México.
- 58.- Sabudhi, B. P. R. e I. Watanabe. 1979." Minimum level of Phosphate in Water for growth of *Azolla* determined by continous flow culture". Curr. Sci. 48:1065-1066.
- 59.- Sesták, Z. 1985 " Changes in Electron Transport Chain Composition and Activities of Photosystems and Photosystems and Photophosphorylation during Leaf Ontogeny. T: VSII Photosynthesis During Leaf Development". In: Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation . Edited by Trebst.A. and Auron. M. Academic Publishers Group. Boston. U.S.A. pp.118-144.

- 60.- Scott, D.B. 1978 "Amonia Assimilation in N₂ Fixing Systems ". In: Limitations and Potentials for Biological Gen Fixation in the Tropics. Edited by Döbereiner J., Burris, H.R., and Hollander. A. Basic Life Series. Vol 10. Plenum Press. New York. U.S.A. pp.223-235.
- 61.- Shanmugan, K.T., Anderson, K. and Valentine, R.C. 1978. "Control of Biological Nitrogen Fixation." Nitrogen in the Environment. Soil Plant Nitrogen Relationships. Vol:2 Edited by Donald. R. Nielsen., J.G. Ed. Academic Press. New York. pp 393-415.
- 62.- Singh, P.K. 1977. " Effect of *Azolla* on the Yield of Paddy and Without Application of N. Fertilizer ". Curr Sci. 46:642-644.
- 63.- Singh, P.K. 1979. "Use of *Azolla* in Rice Production in India ". pp.407-418. In. International Rice Research. Institute Nitrogen and Rice. Los Baños Philippines.
- 64.- Springer, V. 1982. " The Effect of Oxigen Concentration on Photosythetic Biomass Production by Algae .Plant Physiology. 155, 95-96
- 65.- Springer, V. 1988. "Dinitrogenase Reductase (Fe-Protein) of Nitrogenase in The Cyanobacterial Simbiots of Three *Azolla* Species ". Localization and Sequence of Appearance During Heterocyst Diffemtiation. Planta. 176, 319-322.
- 66.- Stewart, W.D., Rowell P.P. and Aprt, S.K. 1977. " Cellular Physiology and the Ecology of N₂ Fixing Blue-Green Algae. Recent Developments, in Nitrogen Fixation. Ed. R.V. Newton Academic Press London, New York, San Francisco. pp.287-307.
- 67.- Stewart, W.D.P. Sampaio, M.J., Isichei, A.O. and Syluester, R. B. 1978. " Nitrogen Fixation by Soil Algae of temperate and Tropical Soils ". In: Limitation and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics (Eds). Döbereiner., J. Burris., H.R. and Hollander A. Basic Life Scienses. Vol. 10. Plenum Press. New York. pp.41-63.
- 68.- Stewart, W.D.P. 1980 " Systems Involving Blue green Algae (Cyanobacterial)". In: Méthods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation" Edited by Bergersen. F.J. Section V. John Willey New York. pp.584-630.
- 69.- Stewart W.D.P. 1980a. "Blue Green Algae" The Biology of Nitrogen Fixation. Section VII. Editors. Neuberger. A. and Tatum .E.L. North Holland Publishing Company. New York. U.S.A. pp. 203-237.
- 70.- Stewart, W.D. Rowelland, P.R., Lockhart, C.M. 1986". Association of Nitrogen -Fixing Prokaryotes With Higher and Lower Plants". Nitrogen Assimilation of Plants. Edited by Hewitt ., E.J. Cutting C.V. Academic Press London. Printed in Great Britain. New York .pp.45-63.
- 71.- Strayer L. " Biochemistry 1982. " 2 Edition . W.F. Freeman and Company New York pp.431-453.

- 72.- Talley, S.N. y Rains, D.W. 1980b. "*Azolla Filiculoides* Lam. as a Fallow Season Green Manure for Rice in a Temperature Climate to ". Agron. J. 72:11-18.
- 73.- Talley S.N., Lim, E. and Rains, D.W. 1981 " Application of *Azolla* in Crop Production In: Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen. Edited by Lyons., J.M., Valentine., R.C. Phillips D.A. Basis Life Series Vol.17 Plenum Press. New York. U.S.A. pp.363-383.
- 74.- Talley, S.N., Talley B.J. and Rains, D.W. 1977. " Nitrogen Fixation by *Azolla* in Rice Fields. In: Genetic Engineering in Nitrogen Fixation. Hollander, A. (ed), Plenum Pub. Co. pp.259-281.
- 75.- Toempest, D. W., Meers, J.L. and Brown. 1970. " Synthesis of Glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a Hitherto Unknown Route" Biochem. J. Vol.117: 405-407.
- 76.- Tuan, D.T., y T.Q. Thuyet. 1979. " The Use of *Azolla* in Rice Production in Vietnam". In: International Rice Research Institute .Nitrogen and Rice . Los Baños, Philippines. pp.395-405.
- 77.- Turpin, H. D. and Elrifi, R.I., Birch, D.G., Weger, G.H. and Holmes J.J. 1988. " Interactions Between Photosynthesis, Respiration and Nitrogen Assimilation in Microalgae. Canadian Journal of Botany Vol.66, No 10 pp.2083-2097.
- 78.- Van Hove, C., Diara H.f. y Godard P. 1982. " *Azolla* in West Africa, Project, Warda, Belgique.
- 79.- Watanabe, I. 1977. " *Azolla* Utilization in Rice Culture. International Rice Research Newsletter, Vol. 2:3pp.
- 80.- Watanabe, I. 1982. " *Azolla Anabaena* Symbiosis its Physiology and Use in Tropical Agriculture. In: Dommergues Y.R. and Diem H.G. (eds). Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. pp. 169- 185. Martinus Nijhoff, The Netherlands.
- 81.- Watanabe, I., Berja, N.S. y D.C. del Rosario. 1980". Growth of *Azolla* in paddy field as by phosphorous fertilizer". Soil Sci. Plant. Nutr. 26(2), 301-307.
- 82.- Watanabe, I. 1981. " Biological Nitrogen Fixation by *Azolla Anabaena* Symbiosis and its Utilization (in Japanese)". J.Sci.Manure. Jpn. 52:455-464.
- 83.- Watanabe., I. Espinas., C.R., Barja N.S. Alimagno, B.V. 1977." Utilization of the *Azolla Anabaena* complex as Nitrogen Fertilizer for Rice". International Rice Research. Institute. Paper Ser. No.11.
- 84.- Winkenbach, F. and Work, C.P. 1973. " Activities of Enzymes of the Oxidative and the Reductive Pentose Phosphate Pathways in Heterocysts of a Blue-Green Algae". Plant Physiol. 52,480-483.

- 85.- Wolk, C.P. 1979 b. "Nitrogen Fixation by Cyanobacterial Heterocysts ". In: Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen.. Edited by Lyons., J.M., Valentine, R.C., Phillips D.A. Basic. Life Series Vol.17. Plenum Press. New. York. U.S.A. pp. 315-331.
- 86.- Yates. M.G. 1977 " Heterocysts in Blue Green algae" Physiology of N₂ Fixation. pp.244-247.
- 87.- Zhejiang Academy Agric. Sci. 1975. " Cultivation Propagation and Utilization of *Azolla* ". Agriculture Publ. Beijing 127 pp (in Chinese). In. International Rice Research Institute 1984. Organic Matter and Rice. Los Baños , Laguna , Philippines.
- 88.- Zumft. W.G. 1981. " The Biochemistry of Dinitrogen Fixation". In: Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur". Edited. by Bothe H. and Trebst. A. Ed. Springer Verlag New. York. pp 117-129.