

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Caracterización Morfológica y Cuantificación de la Fijación
Biológica de Nitrógeno en 5 Especies de Leguminosas
Silvestres (*Crotalaria pumila*, *Crotalaria incana*,
Chamaechrista rotundifolia, *Aeschynomene americana* y
Dalea leporina), Bajo Condiciones de Campo y sin Inocular.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUDITH CAMPOS GONZALEZ

Guadalajara, Jal. 1991



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

Página

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
3.- Objetivos	4
4.- Hipótesis	5
5.- Revisión Bibliográfica	6
6.- Materiales y Métodos	
A) Caracterización del sitio	26
B) Parámetros evaluados	
- En campo	29
- En laboratorio	31
7.- Resultados	37
8.- Discusión	68
9.- Conclusiones	79
10.- Bibliografía	80

RESUMEN

La concentración actual de la población, requiere una intensificación en la producción de los alimentos, lo cual requiere de un mejor aprovechamiento del suelo. Una alternativa para la conservación del suelo y la mejor producción alimentaria es el Sistema de Labranza de Conservación, con el uso de leguminosas silvestres como abono en cobertura foliar, dada su capacidad de fijar nitrógeno biológicamente. El presente trabajo se llevó a cabo en dos partes, una de campo y una en laboratorio. En el trabajo de campo se caracterizó morfológicamente a las 5 especies de leguminosas, se realizaron observaciones de su desarrollo y se prepararon las plantas para evaluar su capacidad de fijación de nitrógeno. En el trabajo de laboratorio se determinó la actividad nitrogenasa de las leguminosas y se caracterizaron las cepas nativas de Rhizobium. Con los resultados obtenidos, se correlacionó el potencial de fijación de nitrógeno con el peso seco de los nódulos y con el peso seco de follaje. Se encontró una correlación directa entre el potencial de fijación con el peso seco de los nódulos, y se encontró una correlación indirecta entre el potencial de fijación con el peso seco del follaje. Cabe mencionar que dos leguminosas sobresalieron para ser usadas en el Sistema de Labranza de Conservación: Aeschynomene americana y Crotalaria pumila.

INTRODUCCION

En los últimos años la producción agrícola a aumentado considerablemente para poder satisfacer las necesidades humanas, lo cual ha requerido también, un aumento en la utilización de fertilizantes nitrogenados, ya que el nitrógeno es un elemento esencial para las plantas . El nitrógeno interviene en la estructura de la moléculas proteicas, así mismo se encuentra en el ADN, ARN, citocromos y vitaminas.

La fuente de nitrógeno más abundante en la naturaleza es el de la atmósfera, donde se encuentra en forma inaccesible para las plantas, sin embargo, algunas plantas superiores como las leguminosas lo hacen indirectamente con ayuda de microorganismos del suelo, a esta utilización de nitrógeno molecular se le llama fijación simbiótica de nitrógeno. Otra vía de adición de nitrógeno a las plantas son los fertilizantes químicos, los cuales al utilizarse excesivamente han acelerado el proceso erosivo, perdiéndose con esto grandes zonas agrícolas, disminuyendo la fertilidad de los suelos y la calidad y producción agrícola. Además los altos costos de los fertilizantes químicos, se ha traducido en altos costos de producción, sin que esto se refleje en aumento en la relación beneficio - costo. Esto ha conducido a buscar alternativas para mejorar la producción, conservar los suelos y disminuir los costos.

Una alternativa confiable, es el Sistema de Labranza de Conservación con el uso de leguminosas silvestres como abono orgánico en cobertura foliar, dada la capacidad de estas plantas de fijar nitrógeno biológicamente.

Hasta el momento sólo se ha trabajado con las leguminosas cultivadas y no con leguminosas silvestres, para determinar su capacidad de fijación biológica de nitrógeno. Algunas experiencias sobre este tópico han dejado en claro que existen abundantes ejemplares en el estado de Jalisco que pueden servir al propósito de ser coberturas foliares, aportar nitrógeno y evitar la erosión del suelo (Moreno, 1989; Martínez, 1989; Parra, 1991).

El presente trabajo pretende dar respuestas a varias cuestiones que parcialmente se han planteado y que se especifican en los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar morfológicamente cinco géneros de leguminosas silvestres (Crotalaria incana, Crotalaria pumila, Chamaechrista rotundifolia, Aeschynomene americana y Dalea leporina) cultivadas en condiciones de campo.
- 2.- Determinar la Capacidad de Fijación Biológica de Nitrógeno bajo condiciones de campo de los cinco géneros de leguminosas silvestres sin inocular.
- 3.- Determinar el grado de nodulación de los cinco géneros de leguminosas silvestres y caracterizarlos de acuerdo al esquema propuesto por Corby (1981).
- 4.- Aislar y caracterizar las cepas de apariencia más efectivas de Rhizobium que se desarrollen en los nódulos de los cinco géneros de leguminosas silvestres en condiciones de campo.

HIPOTESIS

- 1.- Existen diferencias en la capacidad de fijación de nitrógeno de los cinco géneros de leguminosas silvestres en simbiosis con Rhizobium sp en condiciones de campo y sin uso de inoculantes.
- 2.- Existen diferentes cepas de Rhizobium sp en el suelo, que permite que cada uno de los géneros sean capaces de producir nodulación y a su vez fijación de nitrógeno.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.- Fijación Biológica de Nitrógeno.

El nitrógeno además de ser el componente más abundante de la atmósfera es un elemento esencial para la vida, en los organismos vivos lo encontramos en compuestos tan importantes como los ácidos nucleicos, reguladores de crecimiento y vitaminas, e interviniendo en la mayoría de las reacciones bioquímicas de éstos (Devlin, 1975).

Las plantas requieren un suministro continuo de nitrógeno para mantener su estructura y metabolismo, sin embargo en la atmósfera se encuentra en forma molecular, la cual es inaprovechable por las plantas, y sólo algunos microorganismos procarióticos, como ciertos grupos de bacterias y algas (verde-azules) presentan la maquinaria enzimática capaz de realizar la conversión biológica del nitrógeno molecular en forma asimilable. (Devlin, 1975; Bidweel, 1979; Vincent, 1977; Lie, 1981).

Las plantas de la Familia Leguminosae tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno molecular de forma indirecta por medio de una asociación simbiótica con bacterias del suelo del género Rhizobium, las cuales convierten el nitrógeno de la atmósfera en amonio, una forma fácilmente utilizable por las plantas (Devlin, 1975; Bidweel, 1979).

Las raíces de las leguminosas excretan ciertos factores de crecimiento, la pared de la célula radicular sufre una invaginación formando un tubo de infección que contiene una colonia de células de Rhizobium proliferantes (Brill, citado por Gandarillas, 1987), así las bacterias atraviesan los pelos radicales blandos o rotos y progresan a través del tubo de infección. Las bacterias sólo infectan células con doble número de cromosomas del normal donde realizan una actividad de tipo merismático y originan el nódulo. Otro factor que estimula la formación de nódulos es la producción de ácido indolil acético por Rhizobium.

La capacidad de fijación de nitrógeno de una leguminosa está en relación directa con el contenido de pigmento rojo (leg-hemoglobina) en los nódulos, el cual solo se va a presentar cuando exista el complejo Rhizobium-leguminosa (Devlin, 1975; Lie, 1981).

2.- Microsimbionte.

El género Rhizobium es una bacteria gram negativa con una longitud de 0.5 a 0.9 μ m de ancho por 1.2 a 3.0 μ m de largo. Aparecen individualmente o en pares, con flagelos polares o subpolares con frecuencia con granulos prominentes de poli-B-hidroxibutirato, y no forman esporas (Vincent, 1977).

3.- Familia Leguminosae.

Hutchinson (1973), citado por Moreno (1989), caracteriza a la familia Leguminosae de la siguiente manera: pueden ser árboles, arbustos o hierbas; con las hojas simples o bipinadas; flores actinomorfas o cigomorfas, con pétalos libres o parcialmente unidos; estambres frecuentemente diadelfos; carpelo solitario, superior; fruto una legumbre, indehiscente, algunas veces alado; semillas sin endosperma.

Comprende unos 650 géneros y 18000 especies distribuidas en tres grandes subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Polhill, et. al., 1981, citado por Moreno, 1989), cuyos caracteres diagnósticos principales se presentan en la tabla 1.

Dentro de la subfamilia Papilionoideae encontramos el género *Crotalaria*, *Dalea* y *Aeschynomene*, y dentro de la subfamilia Caesalpinioideae encontramos el género *Chamaecrista* (Sanchez, 1980), para familiarizarse con los géneros que fueron utilizados en el presente estudio.

TABLA 1.- Características sobresalientes para separar a las tres mayores familias de las leguminosas (Heywood, 1971, citado por Moreno, 1989).

Subfamilia	Habitat	Flores	Cáliz en botón	Corona en botón
Mimosoidea	Arborea y arbustivo	Actinomorfas	Valvado (imbrincado en Parkieae)	Valvada (raramente imbrincada)
Caesalpinoidea	Arboreo o arbustivo	+ Zigomorfas -	Imbrincado (raramente valvado)	Imbrincado, el pétalo adaxial sobrepuesto por las laterales.
Papilionoidea	Arboreo o arbustivo	Fuertemente zigomorfas	Imbrincado o valvado	Imbrincado el pétalo adaxial (estandarte) extremo a los laterales (alas).

La capacidad de las leguminosas de fijar el nitrógeno atmosférico es una característica que sólo esta familia presenta en forma clara y ayuda a mantener el balance de la naturaleza, Bond (1976) citado por Aguilera (1986), ya que constituye un eslabón importante en el ciclo del nitrógeno (Castillo y Cárdenas, 1987). Además las leguminosas son las plantas que producen la mayor cantidad de nitrógeno fijado biológicamente, lo cual es una contribución vital para mantener la productividad de los suelos por largos períodos, NAS (1979) citado por Aguilera (1986).

El Sistema de Labranza de Conservación es una técnica agrícola que tiene como objetivos el de mantener la productividad de los suelos y conservarlos evitando la erosión. Se han desarrollado métodos de labranza de conservación, en los cuales las leguminosas juegan un papel importante. Estos sistemas ayudan a prevenir la erosión de los suelos dejando o induciendo una cubierta vegetal sobre el suelo, lo cual es un problema que se debe de atender de inmediato (Acosta 1986); ya que disminuye el fenómeno de escurrimiento y formación de agregados, aumenta la conservación de la humedad y la infiltración del agua, conserva la fauna del suelo y mantiene la temperatura del suelo a niveles que se evitan los cambios bruscos durante el día, lo cual influye o favorecer la germinación de la semilla y desarrollo de la planta, Bathker y Blake (1984);

Brow et. al. (1985); Dancer y Jansen (1981); Berpsh et. al. (1986); Hargrove et. al. (1984); Hoyt y Hargrove (1986); Kadivko et. al (1986); Sojka et. al. (1984) citados por Moreno (1989); García (1985). Además las leguminosas no sólo aportan nitrógeno, sino también carbono orgánico, Ca, Mg, K y P (Lal, 1976), lo que las hacen más importantes.

Algunos de los factores que pueden afectar en la fijación de nitrógeno son la temperatura fuera del óptimo, aunque ésta no se ve afectada entre los 12 - 32 °c, Gibson (1972), citado por Cubero (1983); el oxígeno es esencial en este proceso, el exceso de humedad restringe la difusión de gases y la sequía produce anaerobiosis en el interior del nódulo, Spren y Gallacher (1976), citados por Cubero (1983).

Se han observado en estudios realizados en distintos cultivos de leguminosas que las forrajeras fijan más nitrógeno que las de grano (Burns y Hardy, 1975) citados por Cubero (1983).

Según estudios recientes, el nitrógeno fijado por las leguminosas cultivadas fue de 32 x 10 ton / año y si se toman en cuenta los pastos naturales la cifra se eleva considerablemente, en tanto que el consumo mundial de fertilizantes nitrogenados fue de 43 x 10 ton / año, Burns y Hardy (1975) citados por Cubero (1983).

Las leguminosas son una opción como fuente de abono orgánico que restituye la fertilidad y los fertilizantes químicos, los cuales por un lado tienen un elevado costo y como consecuencia altos costos en los alimentos, y por otro lado son una fuente de contaminación. Además, la mala administración de los fertilizantes con uso excesivo de los mismos afectan la calidad y cantidad de producción, acidifican los suelos, disminuyendo su productividad (Martínez, 1988).

Si se tiene un buen conocimiento sobre las condiciones en que la fijación de nitrógeno por leguminosas es la óptima y cuáles de estas plantas son las más eficientes en este proceso, se tendrán mejores resultados en el aporte del nitrógeno al suelo y como consecuencia mejores cosechas, además de elevar su nivel proteico (Pelletier, 1967).

Los estudios sobre el Sistema de Labranza de Conservación en Estados Unidos de Norteamérica, México y otros países, utilizando las leguminosas como cobertura foliar han sido satisfactorios, incrementan la productividad del suelo, mejoran la calidad y cantidad de los alimentos y ayudan a la conservación del suelo (Acosta, 1986).

La erosión en nuestro país alcanza magnitudes alarmantes, lo que ha provocado serias pérdidas de suelo y productividad, además de la pobreza natural de los suelos, la escasez de agua, la inconstancia en la producción, ya

que actualmente existen bastantes zonas en donde se han perdido completamente el suelo. Es lamentable que en nuestro país no haya grandes esfuerzos para utilizar prácticas agrícolas que se evoquen a conservar la humedad y el suelo. Esto ha originado que se acelere el proceso erosivo. El Sistema de Labranza de Conservación, es una práctica que evita las pérdidas de suelos por erosión, favorece la mejor captación de humedad por los suelos, deja en el suelo residuos de cosecha que ayuda a incrementar la fertilidad, lo que sirve para producir más (Acosta, 1986).

Es por esto que ha sido el interés del presente trabajo estudiar a las leguminosas silvestres, primero caracterizarlas taxonómicamente y bromatológicamente, (Moreno 1989, Martínez 1989), después se intentó saber como influían en diferentes tipos de suelo cuando se incorporaban sobre la productividad de las mismas (España, 1990). También se han estudiado las leguminosas desde el punto de vista de caracterización de cepas de los géneros en estudio (Ruiz, 1991). En el presente trabajo se desea conocer como influye el medio ambiente natural en la fijación de nitrógeno, de Aeschynomene americana, Dalea leporina, Chamaecrista rotundifolia, Crotalaria pumila y Crotalaria incana.

En el estudio realizado por Parra (1991) sobre la Distribución Geográfica de la Leguminosas Herbáceas de interés en el Sistema de Labranza de Conservación, se encontró que los géneros de Crotalaria, Aeschynomene, Dalea y Chamaecrista están distribuidos en el estado de Jalisco de acuerdo como se muestra en los mapas de las figuras 1, 2, 3, 4 y 5.

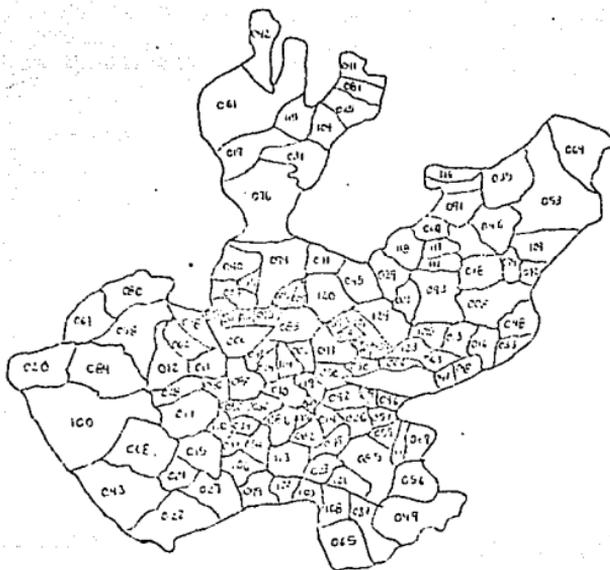


Fig.1. Municipios localizados en el estado de Jalisco
(INEGI, 1988).

001 Acatic	032 Chiquilistla	063 Ocotlán
002 Acatlán de Juárez	033 Degollado	064 Ojuelos de Jal.
003 Anualulco	034 Ejutla	065 Pihuamo
004 Amacueca	035 Encarnación de Diaz	066 Poncitlán
005 Amatitlán	036 Etzatlán	067 Puerto Vallarta
006 Ameca	037 Grullo, El	068 Purificación
007 Antonio E.	038 Guachinango	069 Qumupán
008 Arandas	039 Guadalajara	070 Salto, El
009 Arenal	040 Hostotipaquillo	071 San Cristobal de la Berranca
010 Atemajac de Brizuela	041 Huejucar	072 San Diego de Alejandria
011 Atengo	042 Huejuguiña el Alto	073 San Juan de los Lagos
012 Atenguillo	043 Huerta, Al	074 San Julián
013 Atotonilco el Alto	044 Ixtlahuacán de los Membrillos	075 San Marcos
014 Atoyac	045 Ixtlahuacan del los Membrillos	076 San Martin de Bolaños
015 Autlán	046 Jalostotitlán	077 San Martín Hidalgo
016 Ayotlán	047 Jamay	078 San Miguel el Alto
017 Ayutla	048 Jesús María	079 Gómez Farías

018 Barca, Ja	049 Jilotlan de los Dolores	080 San Sebastian del Oeste
019 Bolaños	050 Jocotepec	081 Sta. Ma. de los A
020 Cabo Corrientes	051 Juanacatlán	082 Sayula
021 Casimiro Castillo	052 Juchitlán	083 Tala
022 Cihuatlán	053 Lagos de Moreno	084 Talpa de Allende
023 Ciudad Guzmán	054 Limón, El	085 Tamazula de Gordiano
024 Cocula	055 Magdalena	086 Tapalpa
025 Colotlán	056 Manuel M. Dieguez	087 Tecalitlán
026 Concepción de Buenos Aires	057 Manzanilla de la Paz, La.	088 Tecolotlán
027 Cuahutitlán	058 Mascota	089 Techalutia
028 Cuanutla	059 Mazamitla	090 Tenamaxtlan
029 Cuquio	060 Mexxicacán	091 Teocaltiche
030 Chapala	061 Mexquitic	092 Teocuitaatlan de Corona
031 Chimaltitlán	062 Mixtlán	093 Tepatitlán de Morelos
094 Tequila	095 Tehuchitlán	096 Ticapan el Alto
097 Tlajomulco de Zúñiga	098 Tlaquepaque	099 Tolimán
100 Tomatlán	101 Tonalá	102 Tonaya.
103 Tonia	104 Totatiche	105 Tototlán

106 Tuxcacuosco	107 Tuxcuaca	108 Tuxpán
109 Union de San Antonio	110 Unión de Tula	111 Valle de Guadalupe
112 Valle de Juárez	113 Venustiano Carranza	114 Villa Corona
115 Villa Guerrero	116 Villa Hidalgo	117 Cañadas de Obregón
118 Yahualica de Glez.Gallo	119 Zacualco de Torres	120 Zapopan
121 Zapotiltic	122 Zapotitlán de Vadillo	123 Zapotlan del Rey
124		Zapotlanejo.

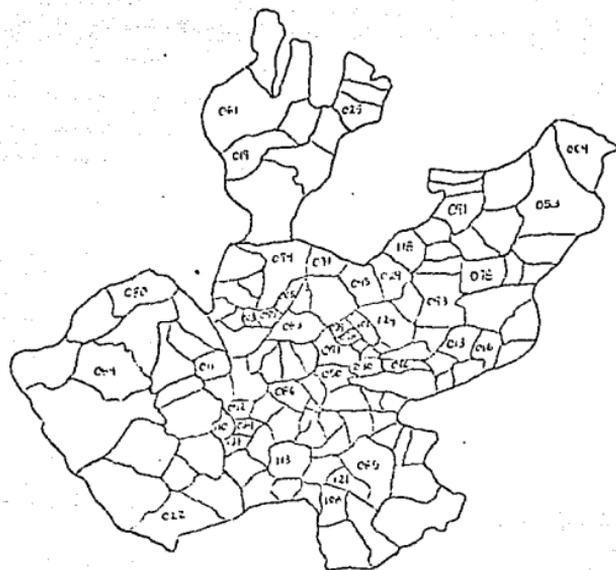


Fig.2. Distribución del género Dalea en el estado de Jalisco, Parra(1991).

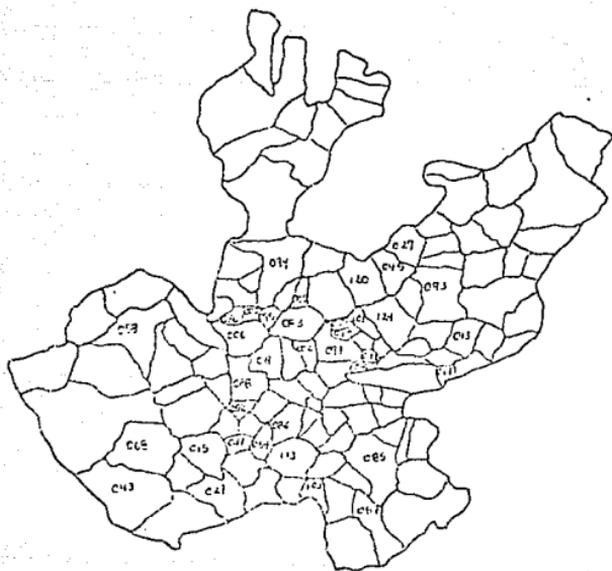


Fig.3. Distribución del género Aeschynomene en el estado de Jalisco, Parra (1991).

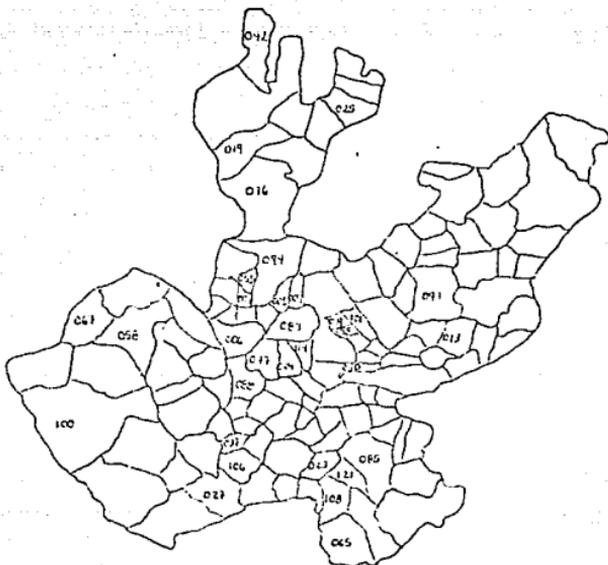


Fig.4. Distribución del género Chamaechaerista en el estado de Jalisco, Parra(1991).

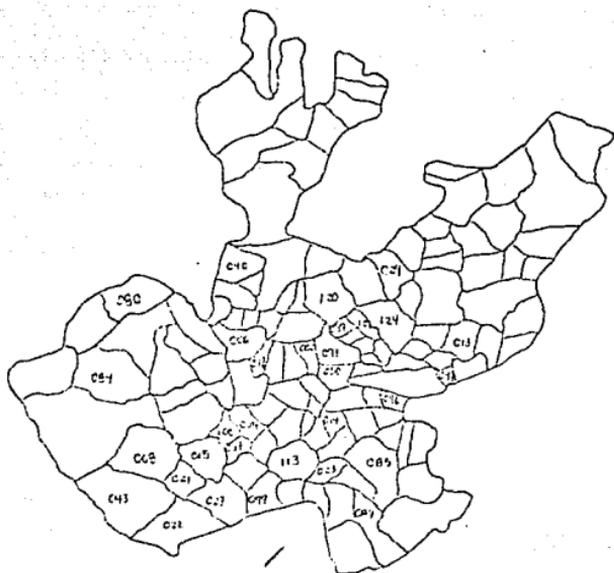


Fig. 5. Distribución del género Crotalaria en el estado de Jalisco, Parra (1991).

AESCHYNOMENE	CHAMAECRISTA	DALEA
002 Acatlán de Juárez	005 Amatitlán	003 Ahualulco
003 Ahualulco	006 Ameca	005 Amatitlán
005 Amatitlán	007 Antonio Escobedo	011 Atengo
006 Ameca	009 Arena	013 Atotonilco
015 Autlán	019 Bolaños	016 Ayotlán
		018 La Barca
		019 Bolaños
027 Cuahutitlán	021 Casimiro Castillo	022 Cihuatlán
029 Cuquío	023 Cd. Guzmán	025 Colotlán
030 Chapala	024 Cocula	029 Cuquío
036 Etzatlán	025 Colotlán	030 Chapala
037 El Grullo	025 Colotlán	034 Ejutla
039 Guadalajara	027 Cuautitlán	037 El Grullo
043 La huerta	030 Chapala	039 Guadalajara
044 Ixtl. de los Membrillos	037 Manantla = El grullo	045 Ixtl. del Río
047 Jamay	039 Guadalajara	050 Jocotepec
052 Juchitlán	042 Huejoquilla el Alto	052 Juchitlan
054 El Limón	045 Ixtl. del Río	053 Lagos de Mo.

056 Mascota	055 Magdalena	061 Mezquitic
068 Purificación	058 Mascota	064 Ojuelos
077 San Martín Tlgo.	065 Pihuamo	066 Poncitlán
083 Tala	067 Puerto Vallarta	071 San Cristobal de la Barca
085 Tamazula	071 San Cristobal de la Barca	078 San Miguel el Alto
086 Tapalpa	076 San Martín de Palaño	080 San Sebastián
087 Tecalitlán	083 Tala	083 Tala
088 Tecolotlán	085 Tamazula	084 Talpa
093 Tepatitlán	088 Tecolotlán	085 Tamazula
094 Tequila	093 Tepatitlán	086 Talpa
095 Tlaxiutlán	094 Tequila	091 Teocaltiche
097 Tlajomulco	098 Tlaquepaque	093 Tepatitlán
098 Tlaquepaque	100 Tomatlán	094 Tequila
101 Tonalá	101 Tonalá	095 Teuchitlán
103 Tónila	106 Tuxcacuesco	097 Tlajomulco
113 Venustiano C.	108 Tuxpan	098 Tlaquepaque
120 Zapopan	114 Villa Corona	101 Tonalá
124 Zapotlán	120 Zapopan	105 Tuxpán
	121 Zapotiltic	110 Unión de Tula
		178 Yahualica
		124 Zapotlán
		120 Zapopan
		121 Zapotiltic
		113 Venustiano C.

CRQLATARIA

002 Acatlán de Juárez	101 Tonalá
006 Ameca	110 Unión de Tula
013 Atotonilco el Alto	113 Venustiano
015 Autlán	Carranza
021 Casimiro Castillo	120 Zapopan
022 Cihuatlán	124 Zapotlanejo
023 Cd. Guzmán	
027 Cuautitlán	
029 Cuquío	
034 Ejutla	
037 El grullo	
039 Guadalajara	
040 Hostotipaquillo	
043 La huerta	
047 Jamay	
050 Jocotepec	
068 Purificación	
077 San Martín Hgo.	
080 San Sebastián	
084 Talpa	
085 Tamazula	
087 Tecalitlán	
096 Tzacapan el Alto	
097 Tlajomulco	
099 Toluca	

MATERIALES Y METODOS

CARACTERIZACION DEL SITIO.

1.- LOCALIZACION.

El experimento de campo se realizó en la huerta "La Torcasita" localizada en San Sebastián el Grande, Municipio de Tlajomulco Zuñiga, Jalisco (Fig.6). El Municipio se encuentra en la Región Central del estado; limitado al norte con Zapopan y Tlaquepaque, al sur con Jocotepec y Chapala, al oeste con Tala y Acatlán de Juárez y al este con Juanacatlán e Ixtlahuacán (Fig.7). Tiene una extensión territorial de 63,653 ha. Presenta una topografía irregular, suelo féozemhaplico.

El clima es semi-seco en otoño y en invierno, y en primavera es seco y semi-cálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual alcanza un promedio de 20.5°C, teniendo registrada como máxima 37°C y 4°C como mínima.

Se localiza en los 20°28' de latitud norte y a 103°27' latitud oeste, altura de 1575 m sobre el nivel del mar. Su actividad principal es la agricultura (Mora, 1980).

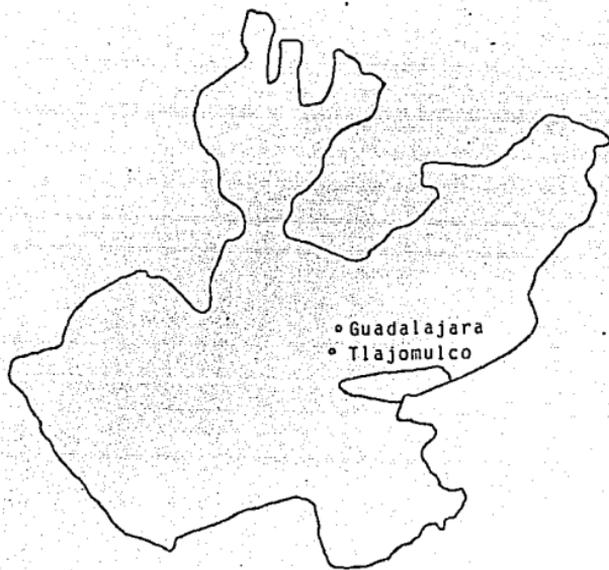


Fig 6. Localización del Municipio de Tlajomulco de Zuñiga en el estado de Jalisco.

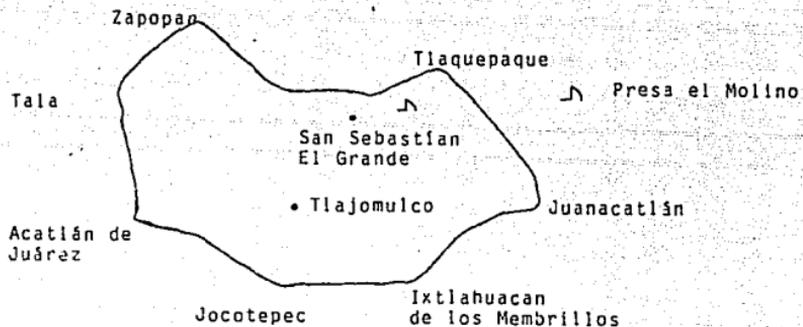


Fig.7. Localización de San Sebastián el Grande en el
 Municipio de Tlajomulco de Zúñiga.

PARAMETROS EVALUADOS:

A) EN CAMPO.

- Suelo.

Para conocer el suelo donde se estableció el trabajo, se tomaron 3 muestras al azar y se mandaron analizar a la SARH.

- Colecta de semillas.

Las semillas de Crotalaria inçana, Crotalaria pumila, Dalea leporina, Aeschynomene americana, Chamaechrista rotundifolia fueron colectadas de un campo experimental de Bugambillas en la zona centro de Jalisco, subregión Guadalajara.

- Siembra.

Para obtener una mejor germinación de las semillas, se consideró necesario humedecerlas un día anterior a la siembra. La siembra se realizó en el mes de agosto de 1969.

Las semillas se sembraron, cada una en un surco de 10 m de largo y la distancia entre surcos fue de 50 cm.

- Desarrollo vegetativo.

Se hicieron observaciones semanales de las 5 especies de leguminosas silvestres, tomando en cuenta las siguientes características:

1.-Datos de la planta:

- Aspecto Vegetativo
- Tipo de planta
- Altura final
- Tallo
- Acame

2.-Datos de la hoja:

- Tipo de hoja
- Longitud de la hoja

3.-Datos de la inflorescencia:

- Tamaño
- Color
- Días a floración
- Duración

4.-Datos del fruto:

- Color
- Curvatura
- Madurez fisiológica
- Días a madurez
- Persistencia foliar
- Vainas por planta
- Semillas por vaina

5.-Datos de la semilla:

- Tamaño
- Color
- Forma
- Brillantez

(Acosta, 1988).

B) EN LABORATORIO:

- Muestreo.

Se colectaron 3 plantas al azar de cada género en floración.

- Tipo de nodulación.

Después de colectadas las plantas, las raíces se sacudieron y lavaron, tratando de no dañar los nódulos. Se determinó el número y posición de los nódulos en la raíz. Se observaron a simple vista y al microscopio estereoscópico para determinar el tipo de nódulo que presentaban de acuerdo a Corby (1981).

- Actividad Nitrogenosa (Reducción de Acetileno).

Se seleccionaron aquellas plantas que presentaban nódulos con una apariencia más efectiva (sin inocular) para determinar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de las cepas nativas. Se separó la raíz de la parte aérea. Las raíces se sacudieron suavemente para eliminar los residuos del soporte donde se desarrollaron. El sistema radicular se colocó en frascos y se cerraron inmediatamente.

Se extrajo el 10 % del volumen de la atmósfera del aire del frasco con una jeringa. Inmediatamente se inyectó el mismo volumen con acetileno y se incubó por una hora a temperatura ambiente (29 °C. Transcurrido este tiempo se extrajeron 3 muestras de 1 ml de la atmósfera de los frascos y se inyectaron en el cromatógrafo (Shimadzu GC-4CPF),

equipado con una columna de poropack N de acero inoxidable con dimensiones de 1.5 m x 1.5 mm, la temperatura del horno de 100°C y la del detector de ionización de flama de 150°C, el gas acarreador fue de N₂ en flujo de 40 ml/min. La calibración fue hecha con 3 estándares de etileno 1000, 100 y 10 ppm (INFRA).

- Aislamiento.

Se separaron 3 nódulos por planta (con 3 repeticiones) de apariencia más efectiva, dejándoles una pequeña parte de la raíz para facilitar su manipulación y no dañar al microorganismo durante el proceso de esterilización de la superficie nodular.

Los nódulos se colocaron en pequeños cedazos y se desinfectaron sumergiéndolos en alcohol durante 10 segundos, y después se trataron en MgCl₂ 0.1 % durante 3 minutos para nódulos grandes y durante 1 minuto para nódulos pequeños. Se pasaron por agua destilada estéril tres veces, una vez por leche estéril y dos veces en agua destilada estéril. Toda esa secuencia se efectuó en una área de protección del mechero.

El nódulo se pasó a un tubo con dos gotas de agua estéril y se trituró con una varilla de vidrio estéril. Ya macerado el nódulo se tomó con el asa una muestra y se aisló por el método de estrias cruzadas (Vincent, 1971) sobre la superficie de una placa con medio extracto de levadura y manitol con agar (ELMA) (Vincent, 1975).

Se incubaron las cajas a 29°C hasta obtener colonias aisladas, las cuales aparecieron entre los 3 y 5 días dependiendo de la leguminosa que procedían los aislados. De las cajas se tomó una muestra con el asa y se aisló por el método de estrias en un tubo de ensayo sobre una superficie de medio ELMA. Se incubaron los tubos a 29°C hasta obtener colonias aisladas.

- Características de los aislados.

De los aislados de cada leguminosa se observaron las siguientes características:

- | | |
|------------|------------------|
| -Tamaño | -Luz transmitida |
| -Forma | -Luz reflejada |
| -Borde | -Aspecto |
| -Elevación | -Superficie |
| -Color | -Consistencia |

- Morfología microscópica.

De los tubos se tomó una muestra con el asa, se colocó en un portaobjetos con unas gotas de agua y se dejó secar al aire.

Se fijó al calor sin llegar al sobrecalentamiento, se realizó la tinción de Gram y se observó al microscopio compuesto 100x, con aceite de inmersión.

- Peso seco.

Se determinó el peso seco de la parte aérea de la planta y nodular de cada planta en un horno de circulación forzada a 100°C (FELI Aut. SC-DGE-11524) por 24 h y después se pasaron a un desecador el cual contenía cloruro de calcio, durante 2 h y posteriormente se pesaron en una balanza digital.

- Antibiógramas.

Cada aislado de Rhizobium sp se creció en caldo extracto de levadura y manitol (ELM) bajo condiciones de agitación de 80 rpm en un baño metabólico (Forma Scientific Model 2564) a 25°C por 24 h. De este cultivo se tomó una alícuota de 0.5 ml extendiéndose sobre la superficie de una placa con medio extracto de levadura y manitol con agar (ELMA). Inmediatamente se colocaron sensidiscos con antibióticos. Los antibióticos empleados fueron:

Ac. Nalidixico (ND) 30 ug	Cloranfenicol (CL) 30ug
Rifamicina (RF) 5 ug	Ampicilina (A) 10 ug
Lincomicina (LI) 2 ug	Tetraciclina (TE) 10 ug
Penicilina (PE) 10 u	Estreptomicina (ES) 20 ug
Kanamicina (KA) 30 ug	

Después de colocar los sensidiscos, las placas se mantuvieron por 30 min a 4°C y luego se incubaron a 29°C durante 24 h, al término de las cuales se hicieron registros de resistencia (-) y susceptibilidad (+) de acuerdo a la presencia o ausencia de halo al rededor del sensidisco en

cada uno de los aislados para su caracterización de acuerdo a Bryant (1976). Todos los antiogramas se hicieron por duplicado.

- Pruebas Bioquímicas.
- Medio MR-VP

Se disolvieron 17 g del medio en 1000 ml de agua destilada y se distribuyó en volúmenes de 10, se esterilizó en autoclave 15 minutos a 121°C (15 Lb). Cada tubo se inoculó del cultivo puro y se incubó durante 5 días a 30°C.

- Prueba de Voges-Proskaver.

A 5 ml del cultivo se añadieron 5 ml de una solución al 10 % de hidróxido potásico, se mezcló bien, se dejó reposar expuesto al aire y se observó a intervalos de 2, 12 y 24 h. Una reacción positiva se indica por el desarrollo de un color rosa de eosina.

- Rojo de metilo.

A 5 ml de cultivo se añadieron 5 gota de solución de rojo de metilo. Una reacción positiva se indica por un distinguible color rojo (ácido), y una reacción negativa se indica por un color amarillo.

- Medio XLD.

Se suspendieron 57 g del medio en 1000 ml de agua destilada caliente hasta la ebullición para disolverlo (no autoclave), se enfrió a 55°C, ya solidificado se sembró. Se incubó a 35°C durante 24 h. Una reacción positiva se indica por un vire de color del medio. La producción de ácido se indica por la aparición de un color amarillo.

- Prueba de utilización de diferentes carbohidratos.
- Rojo de fenol y lactosa, de maltosa, de dextrosa, manitol y sacarosa.

La caracterización de cultivos puros se fundamenta en las propiedades de fermentación de las bacterias y cuyos criterios son valiosos para su identificación, y pueden determinarse cultivando los organismos en un medio adecuado que contenga la sustancia fermentable apropiada.

Se disolvieron 20 g del medio en 1000 ml de agua destilada. A cada tubo se le colocó un tubo de Durham. Se esterilizaron a 12 lb por 15 minutos. Se inocularon e incubaron a 29°C. Una reacción positiva se indica por un virre de color amarillo y/o la presencia de gas. Todas las pruebas bioquímicas se hicieron por duplicado (Difco, 1984).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para saber si existía alguna relación entre la actividad nitrogenasa de cada planta y la cantidad de nódulos o el peso seco de la parte aérea de la planta y nodular, se realizó un análisis estadístico de correlación.

RESULTADOS

1.- SUELO.

De las 2 muestras de suelo analizadas en la SARH se obtuvieron los siguientes resultados.

DETERMINACION	UNIDADES	METODO	PROFUNDIDAD EN CM
TEXTURA			
Arena	%	Hidrómetro	63.173
Arcilla	%	"	11.546
Limo	%	"	25.28
Textura		Bouyoucos	
Agua equivalente	%		12.28
MATERIA ORGANICA.			
Materia orgánica	%	Walkley-Black	2.436
SALINIDAD Y SODICIDAD.			
Cond. eléctrica	m-mhos/cm	Solu Bridge	1.886
Cationes totales	mc/l	Cálculo	18.666
Calcio	"	E.D.T.A.	24.4
Magnesio	"	"	4.33
Sodio soluble	"	Cálculo	6.2
Sodio intercambiable	%	Nomograma	2.416
Clasificación			Normal
Bicarbonatos	mc/l	Warder	3.5
Carbonatos	"	"	0.00
Cloruros	"	Mhor	3.433
Sulfatos	"	"	11.7
NUTRIENTES			
Calcio	500ppm	Morgan	muy bajo
Potasio	250ppm	"	rico
Magnesio	12ppm	"	bajo
Manganeso	25ppm	"	medio
Fósforo	12ppm	"	bajo
Nitrogeno Nitrico	25ppm	"	alto
Nitrogeno amoniacal	150ppm	"	alto
pH 1:2		Potenciómetro	7.36

Cuadro No.1.- Principales características físicas y químicas del suelo de la huerta "La Tornasita" donde se realizó el trabajo de campo.

2.- CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LAS LEGUMINOSAS.

En el cuadro 2 y 3 se concentra la información obtenida durante el desarrollo del experimento, en dichos cuadros se observa que:

Aschynomene americana. Es una hierba erecta con una altura final de 65 cm y un tallo de 4 mm de diámetro, no presentó acame; hoja pinada compuesta de 8 cm de longitud; una inflorescencia de 3mm, color naranja, 8 semanas a floración y con una duración de 11 semanas, un fruto color verde claro, curvatura concava, con una madurez fisiológica de 9 semanas, días a madurez de 9 semanas, persistencia foliar de 11 semanas, con 25 vainas por planta y 6 semillas por vaina. La semilla tiene un tamaño de 1mm, un color negro, forma de frijol y es opaca.

Crotalaria pumila. Es una hierba erecta con una altura final de 45 cm y un tallo de 3mm de diámetro, no presentó acame; hoja trifoliada de 1.5cm de longitud; una inflorescencia de 7mm, color amarillo con rojo, 4 semanas a floración y con una duración de 9 semanas; un fruto color verde claro, no curvatura, con una madurez fisiológica de 8 semanas, días a madurez de 8 semanas, persistencia foliar de 11 semanas, con 47 vainas por planta y 12 semillas por vaina. La semilla tiene un tamaño de 1mm, un color café, forma de corazón y es opaca.

Chamaecrista rotundifolia. Es una hierba erecta con una altura final de 22cm y un tallo de 1cm de diámetro, no presentó acame; hoja pinada compuesta de 2.5cm de longitud; una inflorescencia de 5mm, color amarillo, 9 semanas a floración y con una duración de 12 semanas; un fruto color verde, no curvatura, con una madurez fisiológica de 10 semanas, persistencia foliar de 13 semanas, 10 semanas de madurez, con 3 vainas por planta y semillas por vaina. La semilla tiene un tamaño de 2 mm, un color café, es cuadrada y opaca.

Dalea leporina. Es una hierba erecta, con una altura final de 70 cm y un tallo de 4 mm de diámetro, no presentó acame; hoja pinada compuesta de 4 cm de longitud, la inflorescencia es una espiga color morado, días de floración de 9 semanas y una duración de 13 semanas, con 50 vainas por planta y 10 semillas por vaina. La semilla tiene un tamaño de 2mm, color café, forma de corazón y opaca.

Crotalaria incana. Es una hierba erecta con una altura final de 30 cm y un tallo de 3 mm de diámetro, no presentó acame, hoja trifoliada de 3cm de longitud; inflorescencia de 3 cm, color amarillo, días a floración 9 semanas y duración de 13 semanas, fruto color amarillo, no curvatura, madurez fisiológica de 12 semanas, persistencia foliar 15 semanas, con 10 vainas por planta y 33 semillas por vaina. La semilla tiene un tamaño de 2 mm, color amarillo, forma de corazón y es opaca.

	Aeschynomene americana	Crotalaria pumila	Chamaechrista rotundifolia
1.-Datos de la planta			
Aspecto vegetativo	Hierba	Hierba	Hierba
Tipo de planta	Erecta	Erecta	Erecta
Altura final	65 cm	45 cm	22 cm
Diámetro de tallo	4 mm	3 mm	1 mm
Acame	No	No	No
2.-Datos de la hoja			
Tipo de hoja	Bipinnado comp.	Trifoliada	Pinada
Longitud	8 cm	1.5 cm	2.5 cm
3.-Datos de la inflorescencia			
Tamaño	3 mm	7 mm	5 mm
Color	Naranja	Amarillo con rojo	Amarillo
Días a floración	8 sem.	4 sem.	9 sem.
Duración	11 sem.	9 sem.	12 sem.
4.-Datos del fruto			
Color	verde claro	verde claro	verde
Curvatura	concava	nocurvatura	nocurvatura
Madurez fisiológica	9 sem.	8 sem.	10 sem.
Días a madurez	9 sem.	8 sem.	10 sem.
Persistencia foliar	11 sem.	11 sem.	13 sem.
Vainas por planta	35 sem.	47 sem.	3 sem.
Semillas por vaina	6 sem.	12 sem.	4 sem.
5.-Datos de la semilla.			
Tamaño	1mm	1mm	2mm
Color	negro	negro	café
Forma	frijol	corazón	cuadrada
Brillantez	opaca	opaca	opaca.

Cuadro 2.- Observaciones generales del desarrollo fenológico de Aeschynomene americana, Crotalaria pumila y Chamaechrista rotundifolia en condiciones de campo.

	Dalea leporina	Crotalaria incana
1.- Datos de la planta		
Aspecto vegetativo	Hierba	Hierba
Tipo de planta	Erecta	Erecta
Altura final	70 cm	30 cm
Diámetro de tallo	4 mm	3 mm
Acame	No	No
2.- Datos de la hoja		
Tipo de hoja	Pinnado compuesta	Trifoliada
Longitud	9 cm	3 cm
3.- Datos de la inflorescencia		
Tamaño	Racimo 4 cm. c/u 3 mm	3 cm
Color	Morado	Amarillo
Días a floración	9 sem.	9 sem.
Duración	13 sem.	13 sem.
4.- Datos de fruto		
Color	Crema	Amarillo
Curvatura	ovoide	No curvatura
Madurez fisiológica	11 sem.	12 sem.
Días a madurez	11 sem.	12 sem.
Persistencia foliar	13 sem.	15 sem.
Vainas por planta	50	10
Semilla por vaina	10	35
5.- Datos de la semilla		
Tamaño	2 mm	2 mm
Color	Cafe	Amarillo
Forma	Corazón	Corazón
Brillantes	Opaco	Opaca

Cuadro 3.- Observaciones semanales del desarrollo fenológico de Dalea leporina y Crotalaria incana, en condiciones de campo.

3.-CARACTERIZACION NODULAR.

Después de la cosecha se realizaron observaciones nodulares para hacer la caracterización nodular (cuadro 4) (fig. 8)

Aeschynomene americana. Presentó 86 nódulos en la raíz principal y 90 nódulos en raíces secundarias, pero cercanas a la parte aérea; con un tamaño de 1mm y color crema.

Crotalaria pumila. Presentó 8 nódulos en raíz principal y 32 nódulos en raíces secundarias; con un tamaño de 1mm y color rosa claro.

Chamaecrista rotundifolia. Presentó 8 nódulos en raíz principal y 3 nódulos en raíces secundarias; con un tamaño de 1mm y color rosa claro.

Dalea leporina. No presentó nódulos en la raíz principal pero presentó 58 nódulos en raíces secundarias; con un tamaño de 2mm y un color rosa claro.

Crotalaria incana. No presentó nódulos en raíz principal pero presentó 7 nódulos en raíces secundarias; con un tamaño de 1mm y un color rosa claro.

	<i>Aeschynomene americana</i>	<i>Crotalaria pumila</i>	<i>Chamaechrista rotundifolia</i>	<i>Dalea leporina</i>	<i>Crotalaria incana</i>
No. de nódulos en raíz principal	86	8	8	-	-
No. de nódulos en raíces secundarias	90	32	3	58	7
Tamaño	1 mm	1 mm	1 mm	2 mm	1 mm
Color	crema	rosa claro	rosa claro	rosa claro	rosa claro

CUADRO 4.- Observaciones nodulares de las 5 especies de leguminosas en estudio, al momento de la cosecha.

La caracterización de los nódulos de acuerdo al esquema propuesto por Corby (1981) fue de la manera siguiente: Aeschynomene americana presentó nódulos de tipo Aeschynomenoide; Crotalaria pumila y Crotalaria incana presentaron nódulos de tipo Crotaloide y Dalea leporina y Chamaecrista rotundifolia presentaron nódulos de tipo Astragaloides.

4.- ACTIVIDAD NITROGENASA (REDUCCION DE ACETILENO).

En el cuadro 5 se observa que las cepas de Chamaecrista rotundifolia mostraron una tasa más alta en la reducción de acetileno con 4442.6 nmol de etileno/h / g de nódulo seco; seguida por Aeschynomene americana con 922.2 nmol de etileno/h / g de nódulo seco; Crotalaria pumila con 902.6 nmol de etileno/h / g de nódulo seco; Dalea leporina con 703.3 nmol de etileno/h / g de nódulo seco y Crotalaria incana con 445.3 nmol de etileno/h / g de nódulo seco. (fig. 9).

5.- MORFOLOGIA COLONIAL.

Después de la cromatografía de gases, se realizaron aislados de los nódulos de apariencia más efectiva. Los aislados de los cinco géneros de leguminosas silvestres presentaron la misma morfología nodular. Las colonias presentaron un tamaño grande, forma circular, borde entero, elevación convexa, la luz transmitida fue translúcida, la luz reflejada fue brillante, tenía un aspecto liso, superficie húmeda y una consistencia blanda (cuadro 6).

6.- MORFOLOGIA MICROSCOPICA.

De los aislados se tomaron muestras con un asa, se colocaron en portaobjetos, se realizó la tinción de Gram y se observaron al microscopio compuesto 100x con aceite de inmersión para observar la morfología microscópica de los aislados. Los Rhizobium sp observados presentaron una morfología de cocobacilo.

PLANTA	nmol etileno/h/g nódulo seco
Aeschynomene americana	922
Crotalaria pumila	902
Camachocharista rotundifolia	4,442
Dalea leporina	703
Crotalaria incana	445

CUADRO 5.- Resultados obtenidos en la cromatografía de gases , que nos muestran la cantidad de nmol de etileno producido por hora por gramo de nódulo seco.

Morfología colonial	Aeschynomene americana	Crotalaria pumila	Chamaechrista rotundifolia	Dalea leporina	Crotalaria incana
Tamaño	Grande	Grande	Grande	Grande	Grande
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Borde	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
Elevación	Convexo	Convexo	Convexo	Convexo	Convexo
Luz transmitida	Translucida	Translucida	Translucida	Translucida	Transluc.
Luz reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
Aspecto	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Superficie	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
Consistencia	Blanda	Blanda	Blanda	Blanda	Blanda

CUADRO 6.- Todos los aislados de las 5 especies de leguminosas en estudio, presentaron las mismas características coloniales.

7.- PESO HUMEDO Y PESO SECO.

De las cinco especies de leguminosas silvestre se tomó tanto el peso húmedo como el peso seco de la parte aérea y de los nódulos (cuadro 7).

El peso húmedo de Chamaechrista rotundifolia de la parte aérea de la planta fue 4.4 g y de nódulo fue de 4 g, la parte aérea de Crotalaria pumila peso 9.7 g y los nódulos 4.2 g , la parte aérea de Aeschynomene americana peso 11.6 g y los nódulos 4.4 g, la parte aérea de Crotalaria incana peso 7.2 g y los nódulos 4.1 g, y la parte aérea de Dalea leprina peso 6.5 g los nódulos 4.1 g.

El peso seco de la parte aérea de Chamaechrista rotundifolia fue de 4.0 g y de los nódulos de 0.02 g; la parte aérea de Crotalaria pumila peso 6.5g y los nódulos 0.03 g; la parte aérea de Aeschynomene americana peso 10.0g y los nódulos 0.11 gr; la parte aérea de Crotalaria incana peso 5.2 g y los nódulos 0.05 g y la parte aérea de Dalea leprina peso 7.0 y los nódulos 0.04. (Fig.10 y 11).

	PESO HUMEDO		PESO SECO	
	Parte aérea	Nódulos	Parte aérea	Nódulos
<i>Camachoista rotundifolia</i>	4.4	4.0	4.0	.02
<i>Crotalaria pumila</i>	9.7	4.2	8.5	.03
<i>Aeschynomene americana</i>	11.6	4.4	10.0	.11
<i>Crotalaria incana</i>	7.6	4.1	5.2	.05
<i>Dalea leporina</i>	8.5	4.1	7.0	.04

CUADRO 7.- Peso húmedo y seco en gramos, de la parte aérea y nodular de las 5 especies de leguminosas silvestres en estudio.

8.- ANTIBIOGRAMAS.

Algunas observaciones adicionales a los antibiogramas son las que se presentan en el cuadro 8, las cuales nos sirven para ratificar la pureza de nuestros aislados.

Se hicieron inculos de los aislados, creciendo los bajo las condiciones preestablecidas, para realizar los antibiogramas y las pruebas bioquímicas. No todos los inculos presentaron crecimiento a las 24 hr de incubación, ni tampoco presentaron las mismas características. Los inculos que crecieron a las 24 hr fueron: D1 color amarillo, D2 verde claro, Cp3 verde muy claro, Cin3 verde, Ch3 verde claro y A3 amarillo. Los inculos que crecieron a las 48 hr fueron: A1 verde muy claro, D3 verde claro, Chi verde esmeralda, Ch2 verde claro, Cp1 verde claro, Cini verde claro y Cin3 verde esmeralda. Los que crecieron a las 72 hr fueron A2 azul claro, D3 azul claro y Cp2 azul claro.

Un color amarillo indica que son bacterias de crecimiento rápido y un color azul indica que son bacterias de crecimiento lento.

Obtenidos los aislados se realizaron los antibiogramas.

24 horas		48 horas		72 horas	
Inoculo	Color	Inoculo	Color	Inoculo	Color
D1	amarillo	A1	verde muy claro	A2	azul claro
D2	verde claro	D3	verde claro	D3	azul claro
Cp3	verde muy claro	Ch1	verde esmeralda	Cp2	azul claro
Cin2	verde	Ch2	verde claro		
Ch3	verde claro	Cp1	verde claro		
A3	amarillo	Cin1	verde claro		
		Cin3	verde esmeralda		

CUADRO 8.- Tiempo de crecimiento de los inoculos y características de crecimiento.

De los aislados obtenidos de Aeschynomene americana se caracterizaron 3 cepas de Rhizobium sp en cuanto a resistencia y susceptibilidad a 9 antibióticos (cuadro 9).

De los aislados obtenidos de Dalea leporina se caracterizaron 3 cepas de Rhizobium sp en cuanto a resistencia y susceptibilidad a 9 antibióticos (cuadro 10).

De los aislados obtenidos de Chamaechrista rotundifolia se caracterizaron 5 cepas de Rhizobium sp en cuanto a resistencia y susceptibilidad a 9 antibióticos (cuadro 11).

De los aislados obtenidos de Crotalaria incana se caracterizaron 5 cepas de Rhizobium sp en cuanto a resistencia y susceptibilidad a 9 antibióticos (cuadro 12).

De los aislados obtenidos de Crotalaria pumila se caracterizaron 3 cepas de Rhizobium sp en cuanto a resistencia y susceptibilidad a 9 antibióticos (cuadro 13).

	Li 1	Rf 5	Cl 30	ND 30	ES 10	KA 30	DE 10	A 10	TE 10
Rhizobium sp (A 1)	-	-	+	-	+	+	-	-	+
" (A 2)	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Rhizobium sp (A 3)	-	+	+	+	+	+	-	-	+

Cuadro 9. Antibiogramas de los aislados de Rhizobium sp obtenidos de los nódulos de Aeschynomene americana. (-) Resistente, (+) Susceptible.

	Li 2	Rf 5	Cl 30	ND 30	ES 10	KA 30	PE 10	A 10	TE 30
Rhizobium sp (D 1)	-	-	-	-	+	+	-	-	-
" (D 2)	-	+	-	-	+	+	-	-	+
" (D 3)	-	+	+	-	+	+	-	+	+

Cuadro 10. Antibiogramas de los aislados de Rhizobium sp obtenidos de los nódulos de Dalea leporina. (-) Resistente, (+) Susceptible.

	Li 2	RE 5	Cl 30	ND 30	ES 10	KA 30	PE 10	A 10	TE 10
Rhizobium sp (Ch 1)	-	+	-	-	-	-	-	-	+
" (Ch 1)	-	+	-	-	-	+	-	-	+
" (Ch 2)	-	+	-	-	-	+	-	-	+
" (Ch 2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" (Ch 3)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Cuadro 11. Antibiogramas de los aislados de Rhizobium sp obtenido de los nódulos de Chamaecrista rotundifolia. (-) Resistente, (+) Susceptible.

Li 2 RE 5 C1 30 ND 30 ES 10 KA 30 PE 10 A 10 TE 30

56

Rhizobium sp (Cln 1)	-	+	+	+	+	+	-	+	+
" (Cln 2)	-	+	+	-	+	+	-	-	+
" (Cln 2)	-	+	-	-	+	+	-	-	+
" (Cln 3)	-	+	+	+	+	+	-	+	+
" (Cln 3)	-	+	-	+	+	+	-	+	+

Cuadro 12. Antibiogramas de los aislados de Rhizobium sp obtenidos de los nódulos de Crotalaria incana. (-) Resistente, (+) Susceptible.

Li 2 Rf 5 Cl 30 ND 30 ES 10 KA 30 PE 10 A 10 TE 30

Rhizobium sp (Cp 1)	-	+	+	+	-	+	-	-	+
" (Cp 2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
" (Cp 3)	-	-	-	-	+	+	-	-	+

Cuadro 13. Antibiogramas de los aislados de Rhizobium sp obtenidos de los nódulos de Crotalaria pumila. (-) Resistente, (+) Susceptible.

7.- PRUEBAS BIOQUIMICAS.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, de los aislados obtenidos de los nódulos de Dalea leporina se caracterizaron 4 cepas de Rhizobium sp (cuadro 14); de Aeschynomene americana se caracterizaron 3 cepas de Rhizobium sp (cuadro 15); de Chaemaechrista rotundifolia se caracterizaron 6 cepas de Rhizobium sp (cuadro 16); de Crotalaria incana se caracterizaron 6 cepas de Rhizobium sp (cuadro 17); y de Crotalaria pumila se caracterizaron 5 cepas de Rhizobium sp (cuadro 18).

En base a las pruebas bioquímicas, se observa que no se pueden diferenciar las cepas, ya que la mayoría utilizan los mismos sustratos. En el caso de Chaemaechrista, se observa que no utilizaron los sustratos.

Bioquímicas

Rhizobium sp (Dalea leporina)

	D 1	D 2	D 3	D 3
Xilosa	+	+	-	-
Lisina	+	+	-	-
Desoxicolato	-	-	-	-
Rojo de metilo	-	-	-	-
Voges-Proskaver	-	-	-	-
Dextrosa	-	-	(+)	-
Maltosa	-	-	(+)	-
Sacarosa	-	-	(+)	-
Manitol	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-

+ Cambios ocurridos a las 24 h.

(+) Cambios ocurridos a las 72 h.

Cuadro 14. Pruebas bioquímicas de los aislados de Rhizobium
sp, obtenidos de los nódulos de Dalea leporina.

Rhizobium sp (Aeschynomene americana)

	A 1	A 2	A 3
Xilosa	-	-	-
Lisina	-	-	-
Desoxicolato	-	-	-
Rojo de metilo	-	-	-
Voges -Proskaver	-	-	+
Dextrosa	-	+	+
Gas de la dextrosa	-	(+)	+
Maltosa	-	+	+
Gas de la maltosa	-	-	+
Sacarosa	-	(+)	-
Gas de la sacarosa	-	(+)	-
Manitol	-	(+)	-
Gas del manitol	-	(+)	+
Lactosa	-	-	-

+ Cambios ocurridos a las 24 h.

(+) Cambios ocurridos a las 72 h.

Cuadro 15. Pruebas bioquímicas de los aislados de Rhizobium

so obtenidos de los nódulos de Aeschynomene

peruviana.

Rhizobium sp (Chamaechaerista rotundifolia)

	Ch 1	Ch 1	Ch 2	Ch 2	Ch 3	Ch 3
Xilosa	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-
Desoxicolato	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskaver	+	+	-	+	-	-
Dextrosa	-	+	-	+	-	-
Maltosa	-	-	-	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	(+)
Manitol	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-

+ Cambios ocurridos a las 24 h.

(+) Cambios ocurridos a las 72 h.

Cuadro 16. Pruebas bioquímicas de los aislados de Rhizobium
sp obtenidos de los nódulos de Chamaechaerista
rotundifolia.

Rhizobium sp (Crotalaria incana)

	Cin 1	Cin 1	Cin 2	Cin 2	Cin 3	Cin 3
Xilosa	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-
Desoxicolato	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo-	-	-	-	-	-	-
Vogues-Proskaver	-	-	-	-	-	-
Dextrosa	-	(+)	(+)	(+)	+	(+)
Maltosa	+	-	-	-	+	(+)
Sacarosa	-	+	(+)	-	(+)	(+)
Manitol	-	-	(+)	-	-	(+)
Lactosa	-	-	(+)	-	-	(+)

+ Cambios ocurridos a las 24 h.

(+) Cambios ocurridos a las 72 h.

Cuadros 17. Pruebas bioquímicas de los aislados de Rhizobium
sp obtenidos de los nódulos de Crotalaria inca
na.

Rhizobium sp (Crotalaria pumila)

	Cp 1	Cp 1	Cp 2	Cp 2	Cp 3
Xilosa	+	-	-	-	-
Lisina	+	-	-	-	-
Desoxicolato	-	-	-	-	-
Vogues-Proskaver-	-	-	-	-	-
Dextrosa	+	-	-	(+)	-
Maltosa	+	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-

+ Cambios ocurridos a las 24 h.

(+) Cambios ocurridos a las 72 h.

Cuadro 18. Pruebas bioquímicas de los aislados de Rhizobium
sp obtenidos de los nódulos de Crotalaria pumila.

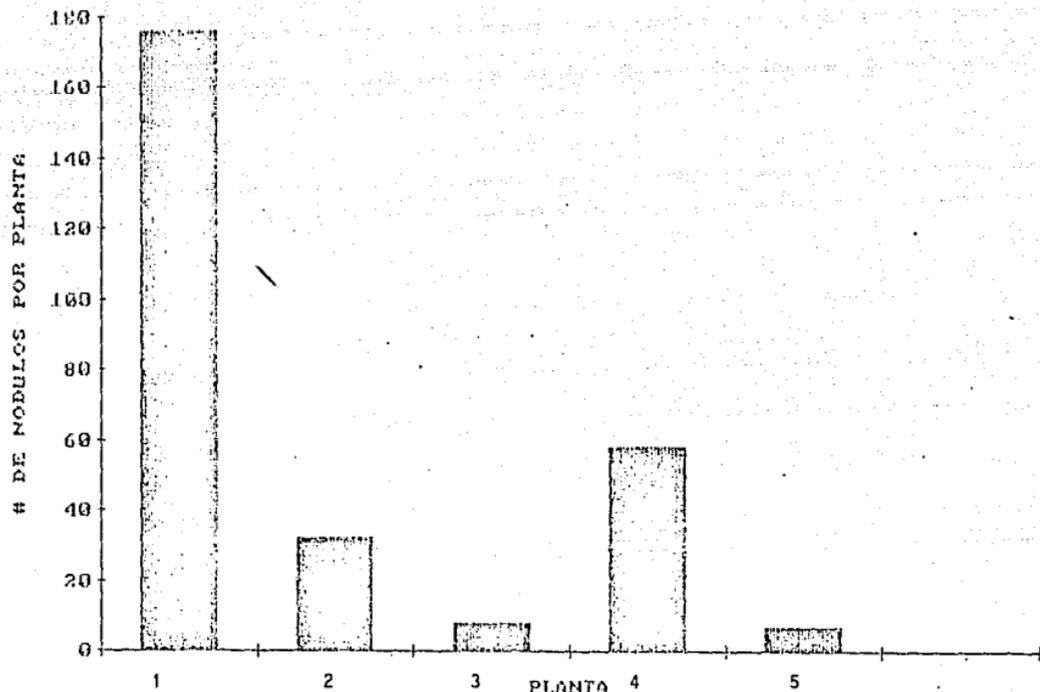


Fig.8 Número de nódulos formados por las diferentes cepas de Rhizobium sp en condiciones de campo y sin inocular. (1) A. americana (2) C. pumila (3) Ch. rotundifolia (4) D. leporina (5) C. incana

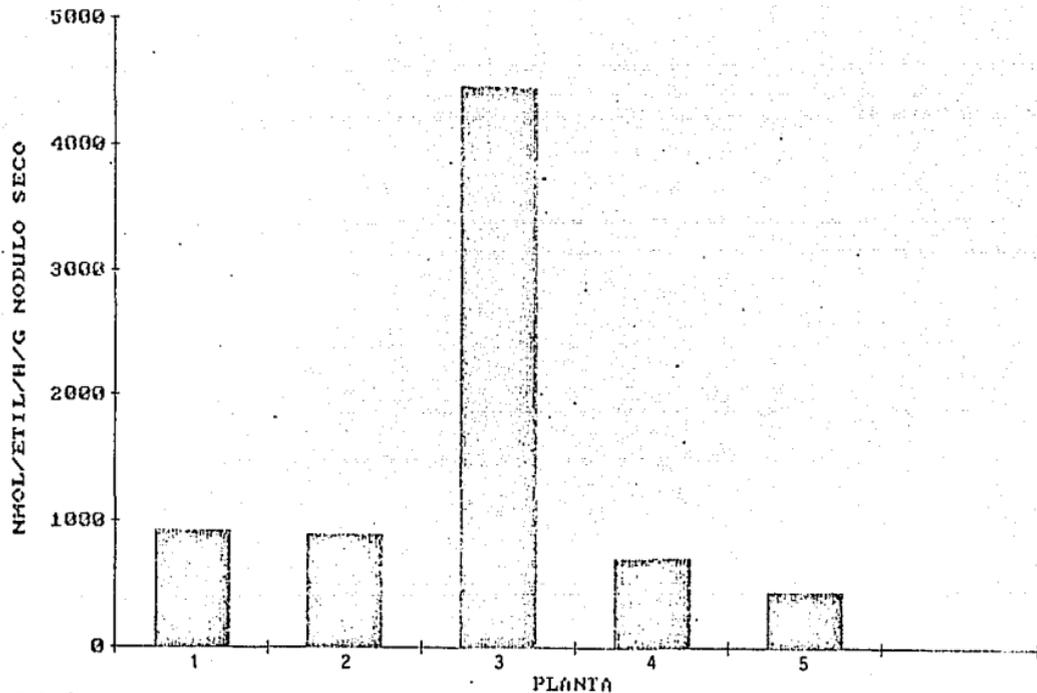


Fig. 9 Actividad nitrogenasa de plantas noduladas por diferentes cepas de *Rhizobium* sp en condiciones de campo y sin inocular. (1) *A. americana* (2) *C. pumila* (3) *Ch. rotundifolia* (4) *D. leporina* (5) *C. incana*.

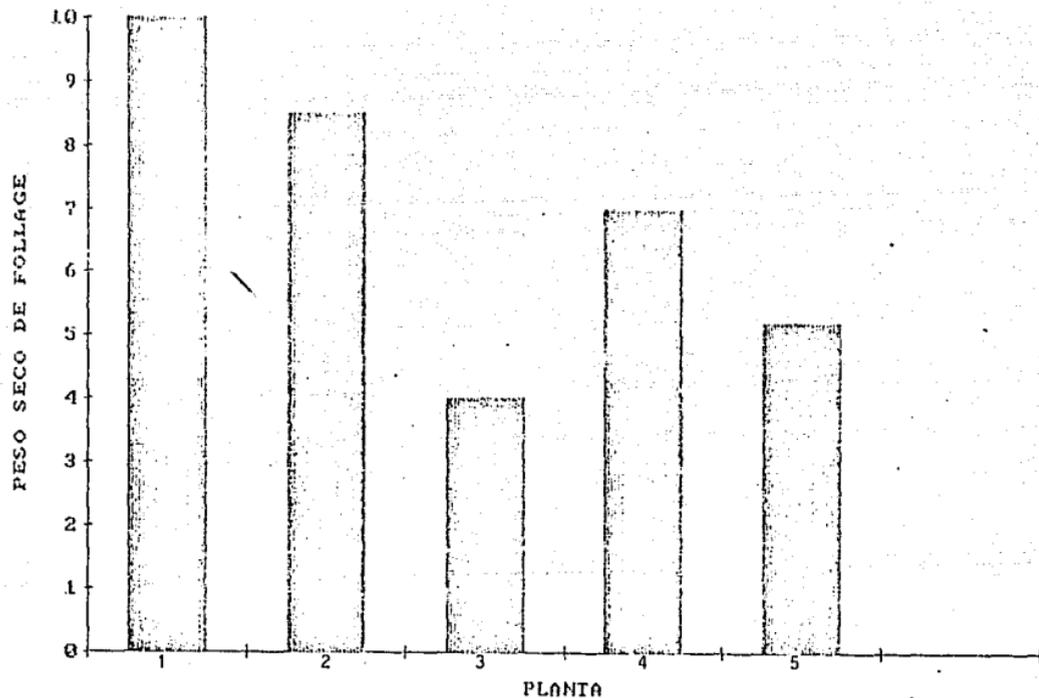


Fig. 10. Peso seco de follaje de plantas noduladas por diferentes cepas de *Rhizobium* sp en condiciones de campo y sin inocular. (1) *A. americana* (2) *C. pumila* (3) *Ch. rotundifolia* (4) *D. leporina* (5) *C. incana*.

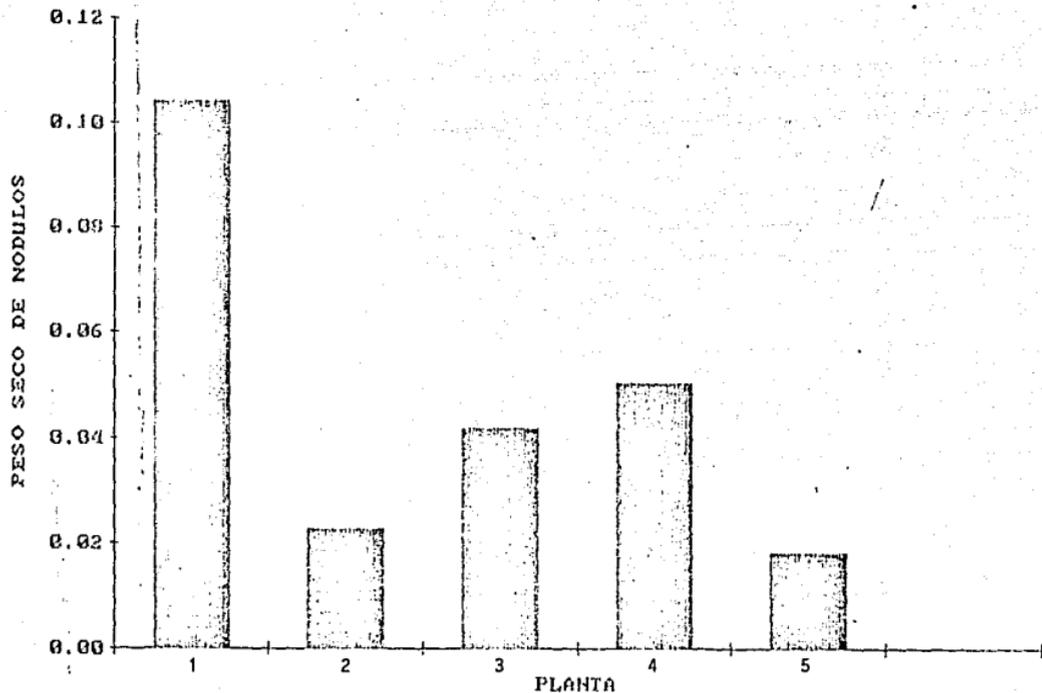


Fig. 11 Peso seco de nódulos producidos por las diferentes cepas de *Rhizobium* sp en condiciones de campo y sin inocular. (1) *A. americana*. (2) *C. pumila* (3) *Ch. rotundifolium* (4) *D. leporina* (5) *C. incana*.

DISCUSION

Ante la enorme preocupación del hombre por producir el suficiente alimento para su sustento, ha desarrollado diversas técnicas agrícolas, pero los altos costos que éstas implican, lo ha llevado a buscar alternativas tecnológicas, una de las cuales es el Sistema de Labranza de Conservación, con el uso de leguminosas silvestres como abono en cobertura foliar dada su capacidad de fijar nitrógeno biológicamente.

El presente trabajo llevó por objetivo determinar el potencial de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de cinco especies de leguminosas silvestres, y relacionar esa capacidad con sus características morfológicas.

En el cuadro 2 y 3 se muestran las características morfológicas de las 5 especies de leguminosas silvestres en estudio, y se observó que dichas características van de acuerdo a las reportadas por Mc Vaugh, 1987. A. americana y Ch. rotundifolia se caracterizaron como hierbas erectas; sin embargo, su crecimiento tiende a ser un poco inclinado, lo cual es favorable para el suelo, porque evita la erosión, conserva la humedad y la fauna del suelo, mantiene la temperatura y aporta nutrientes. D. leporina y C. pumila presentaron una mejor germinación, tanto en número de plantas como en rapidez de crecimiento, a éstas les siguieron A. americana y C. incana, y por último Ch. rotundifolia. C. incana, C. pumila y D. leporina presentaron mayor número de vainas y mayor número de semillas por vaina, lo cual da una mayor probabilidad de propagación.

Chamaechrista Moench. Hierbas, arbustos o pequeños árboles, con hojas uniformemente pinadas, hojillas opuestas; peciolo frecuentemente soportando la glándula nectararia. Glándulas adicionales, algunas veces nacen del peciolo o raquis, inflorescencias racimosas racimos algunas veces paniculados o reducidos a una o dos flores; pedicelos bibracteolados; cinco sépalos imbricados; cinco pétalos de naranja a amarillo, altamente heteromórficos; estambres funcionales son 2,5 ó 10 anteras basifijas más largas que el filamento, cada teca apicalmente dehiscente por un poro o incisión; androceo actinomorfo, anteras de diferentes longitudes; fruto elásticamente dehiscente, valvulas enrolladas, semillas deltoides, lisas, sin areola en su margen o cara (Mc Vaugh, 1987 citado por Parra, 1991).

Crotalaria L. Hierbas anuales o perennes o arbustos, hojas digitalmente trifoliadas o unifoliadas; pinas enteras; estipulas libres desde los peciolo, algunas veces decurrente sobre los tallos, algunas veces pequeños o deficientes, flores en racimos, estos morfológicamente terminales; brácteas florales pequeñas, bracteolas insertadas en la base del tubo del cáliz o aparentemente sobre el pedicelo; hipanto corto; cáliz con cinco dientes más largos que el tubo, el limbo en algunas especies con dos marcados labios. Corola papilionácea amarilla, normalmente orbicular, alas oblicuamente redondeadas u oblongas, más cortas que las normales, quilla encurvada o filosa

inclinada hacia dentro con pico, el cual frecuentemente esta torcido; diez estambres, los filamentos unidos dentro de un tubo abierto del lado adaxial, anteras alternativamente largas y basifijas, cortas y versátiles, ovario sésil o casi sésil, pocos ó muchos óvulos, estilo encurvado o doblado hacia dentro por encima del ovario, bandado distancialmente con dos líneas de pelos. Fruto (legumbre) marcadamente inflado, globoso u oblongo con 2 válvas continuas por dentro, semillas atestadas en el fruto, sobre funículos filiformes, comprimidos, oblicuamente cordiformes, con una hendidura central en los lóbulos a un lado de la hendidura desigual central (Mc Vaugh, 1987 citado por Parra, 1991).

Dalea. Hierbas o arbustos perenes o anuales, tallo, hojas y usualmente flores contienen vesículas secretoras (llamadas glándulas), éstas toman la forma exterior de ampollas, plantas más o menos pubescentes con pelos espirales, estos cuando se secan son rojizos, estípulas herbáceas o subglándulares, hojas raro - pinadas (raramente con 3 foliolos) pina terminal o sésil, glándulas comúnmente presentes en pares o sobre ambos lados de los peciolo. La inflorescencia es una espiga (usualmente) o racimo, moderadamente perdido terminal; brácteas de la inflorescencia decidua persistente, el más bajo a veces difiere de los interflorales, bracteolas usualmente diminutas; cáliz persistente, cayendo con el fruto, tubo del cáliz con 5 costillas producidas dentro del diente, cinco

costillas alternadas, bifurcadas en y debajo de las cavidades del diente y anastomosadas. Glándulas de patrones característicos; dientes del cáliz cortos a largos y aristados; pétalos del ala y quilla insertados en y la mayoría desarticulados, pétalos todos blancos o de varios colores excepto el verdadero rojo, normalmente insertados en la orilla del hipanto; variable en talla y forma; pétalos de la quilla libres o imbricados y adherentes por sus caras o valvadamente unidos por sus bordes; diez estambres, 4-5 funcionales, monodelfos; estilo glabro; dos óvulos colaterales, sólo madura uno; fruto indehiscente, corto, rechoncho o lateralmente comprimido, fuera de línea, oblicuamente ovalado a deltado, sutura ventral derecha o ligeramente curvada, el lado adaxial siempre más largo o inclinado (Mc Vaugh, 1987 citado por Parra, 1991).

Aeschynomene L.: Hierbas, arbustos o pequeños árboles, de habitats secos o húmedos, pubescentes o de pelos simples, glándulas basales multicelulares (base bulbosa); hojas pinnadamente compuestas, raquis terminando en un mucro, de 20 a 80 hojillas, la mayoría pequeñas o enteras, mucronadas, alternadas o subopuestas, estípulas peltadas, apendiculadas o terminales en racimos o panículos, bracteolas pareadas en la base del cáliz similar a las bracteas, hipanto corto; cáliz campanulado con 5 dientes; los dientes más bajos frecuentemente son más largos y angostos que los otros. Flores papilionáceas; corola básicamente amarilla, variando

de casi blanca, naranja, roja o morada; pétalos normalmente con uñas cortas, normalmente con pubescencia externa, este filo redondeado, inclinado hacia fuera de la flor, alas tan largas como las normales, uniauriculadas en la base, pétalos de la quilla con inclinación de 60-90°; diez estambres en grupos de cinco, anteras uniformes; ovarios estipitados con pocos óvulos (2), estilo encurvado no barbado, fruto subsésil, usualmente estipitado, de 1-18 articulaciones, articulos planos o convexos, dehiscentes o indehiscentes a lo largo de la sutura mas baja (carinal), semillas reniformes, suaves, más o menos lustrosas, hilum casi circular. (Mc Vaugh, 1987 citado por Parra, 1991).

Por otra parte, se realizó una caracterización nodular y se cuantificó el número de nódulos de cada planta.

En cuanto al tipo de nódulos que presentaron las cinco especies de leguminosas silvestres en estudio, la información se obtuvo de las plantas en floración, ya que los nódulos adquieren sus características en la madurez (Corby, 1981). Aeschynomene presentó nódulos tipo Aeschynomenoideos, C. pumila y C. incana presentaron nódulos tipo Crotaloide, y Dalea y Chamaechrista presentaron nódulos de tipo Astragaloide. Sin embargo, al revisar la literatura, Dalea de la tribu Galegeae, presenta nódulos Crotaloideos (Allen y Allen, 1981). Aeschynomene presenta nódulos Aeschynomenoideos y nódulos en el tallo, Eaglesham (1985), lo cual no se observó, ya que este caso sólo se da en lugares de gran humedad. C. pumila y C. incana presentaron nódulos tipo Crotaloideos; Chamaechrista presentó dos tipos de nódulos: desmoides y aeschynomenoideos (Aguilera, 1986).

En el caso de las plantas que presentan dos tipos de nódulos en una misma planta, pocos estudios se han realizado, y no se sabe si éstos son formados por un mismo Rhizobium. Así mismo, como se podría explicar tal observación, si se sabe que la forma del nódulo está dictada por la información genética de la planta huésped y no por la bacteria simbiote (Dart, 1977).

De las cinco especies de leguminosas, A. americana fue la que presentó mayor número de nódulos, tanto en la raíz principal, como en las raíces secundarias; a ésta le siguió E. leporina con gran número de nódulos en las raíces secundarias, pero sin nódulos en la raíz principal; y enseguida con nódulos tanto en raíz principal como en raíces secundarias fue C. pumila.

C. incana y Ch. rotundifolia presentaron el menor número de nódulos. La baja nodulación de Chamaechrista era de esperarse, dado que la subfamilia Caesalpinoidea, en general, presenta baja nodulación como la reporta Allen y Allen (1931), quien propone que algunas de las barreras importantes para la nodulación de Rhizobium a dicha subfamilia, es la presencia de una corteza muy desarrollada y dura en la raíz, la presencia de compuestos tóxicos liberados por la raíz y la carencia de lactinas de reconocimiento.

La morfología microscópica de Rhizobium fue cocobacilo, igual a la observada por Aceves (1963).

En el presente estudio se llevó a cabo uno de los métodos más comúnmente utilizados para la clasificación de cepas de Rhizobium, que es determinando la resistencia/susceptibilidad a diferentes niveles de antibióticos.

Las cepas primeramente, se agruparon en lento y rápido crecimiento. Las cepas de Rhizobium de rápido crecimiento son resistentes al ácido nalidixico y las cepas de lento crecimiento son resistentes al resto de los antibióticos de la prueba presentada por Bryant, 1976 (Eaglesham, 1985). Esto se comprueba con los resultados obtenidos en el presente estudio y que se muestran en los cuadros 9, 10, 11, 12 y 13. Sin embargo, varios niveles de resistencia se presentan tanto en cepas de crecimiento lento como de rápido crecimiento (Cole y Elkan, 1969; Sinclair y Eaglesham, 1984; Ayanaba y Wong, 1982; Pankhorst, 1977; Chopra y Venkataraman, 1969, citados por Eaglesham, 1985), lo cual también se demuestra en los cuadros anteriormente mencionados.

En cuanto a la caracterización de las cepas de Rhizobium mediante pruebas bioquímicas, los resultados obtenidos muestran que los Rhizobium de rápido crecimiento, son capaces de utilizar como fuente de carbono un amplio rango de hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos y ácidos orgánicos (cuadros 14, 15, 16, 17 y 18), lo cual se relaciona con lo reportado por Stowers (1985).

Gracias a estas pruebas de caracterización de aislados, se mostró la gran diversidad de cepas nativas del suelo, ya que el estudio se realizó en condiciones de campo y sin inocular. Una sola prueba de caracterización de aislados, hubiera dado resultados erróneos, ya que en los antibiogramas se encontró que una misma cepa de Rhizobium, noduló dos plantas diferentes, sin embargo, gracias a las pruebas bioquímicas se mostró que se trataba de dos cepas diferentes.

La capacidad de fijación biológica de nitrógeno, es una característica importante de las leguminosas. Sin embargo, no todas las leguminosas tienen el mismo potencial para fijar nitrógeno. La principal interrogante de este trabajo, fue saber la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de cada especie y su posible relación con el peso seco de nódulos y follaje, así como con las características morfológicas de cada planta.

Ch. rotundifolia fue la leguminosa que presentó la mayor tasa de fijación de nitrógeno con 4442 nmol etileno/h/g/nódulo seco, le siguieron A. americana y C. pumila, y por último D. leporina y C. incana.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó en general, una relación directa entre el peso seco de nódulos y su mayor capacidad para fijar nitrógeno biológicamente.

Sin embargo, de manera excepcional, Ch. rotundifolia presentó menor peso seco de nodulos y una mayor tasa de fijación biológica de nitrógeno. Por otra parte, cabe mencionar que Chamaecrista tiene un crecimiento lento y difícil, además de producir poco follaje, por lo que su posible uso como única vegetación de cobertura es limitado. Sin embargo, se tendrá que estudiar cuando se encuentre en cultivo múltiple.

Cabe mencionar, que una planta que llamó mucho la atención fue A. americana, la cual presentó un hábito de crecimiento muy adecuado para ser utilizada en el Sistema de Labranza de Conservación. En cuanto a su capacidad para fijar nitrógeno, esta fue en una correlación inversa con el peso seco de la parte aérea de la planta, pero a pesar de no haber sido la que presentó mayor potencial de fijación, si presentó una tasa alta con 922 nmol/etileno/h/g/ nódulo seco.

C. pumila fue una leguminosa que también presentó características muy apropiadas para el Sistema de Labranza de Conservación, tanto en el potencial de fijación con 902 nmol/etileno/h/g/nódulo seco, como en el peso seco de follaje.

D. leporina y C. incana fueron las leguminosas con características menos apropiadas para utilizarse en el Sistema de Labranza de Conservación.

Si relacionamos estos resultados con las características morfológicas antes mencionadas, se recomienda a A. cinomene americana y Crotalaria pumila como cobertura foliar, ya que sin ser las que presentaron mayor capacidad en la fijación biológica de nitrógeno, si tuvieron una buena actividad nitrogenasa, además de tener mayor facilidad para su desarrollo, producir más follaje y tener una forma de crecimiento inclinado en el caso de A. americana, lo cual protegería al suelo de la erosión y serviría como abono en cobertura foliar dadas sus características.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Los analisis realizados en el laboratorio para la caracterización de cepas, mostraron la gran variedad de cepas nativas que existen en el suelo, ya que el trabajo se realizó en condiciones naturales y sin inocular, lo cual es de suma importancia considerar en el Sistema de Labranza de Conservación. Así mismo se observó la presencia de diferentes tipos de nodulación, en las 5 especies de leguminosas silvestres.

Existió una correlación directa entre la capacidad de fijación biológica de nitrógeno y el peso seco de nódulos, y existe una correlación indirecta entre la fijación biológica de nitrógeno y el peso seco de la parte aérea de la planta. Chamaecrista rotundifolia presentó el mas alto nivel de fijación biológica de nitrógeno, sin embargo no se recomienda como abono en cobertura foliar por su escaso follaje y lento crecimiento. Aeschynomene americana y Crotalaria pumila son las leguminosas que presentaron mayor peso seco de follaje y tuvieron un excelente crecimiento, por lo que se recomiendan como abono en cobertura foliar en el Sistema de Labranza de Conservación.

BIBLIOGRAFIA

- Aceves, O.A. 1983. Tasa de crecimiento de Rhizobium en medio de cultivo, suelo y rizosfera. Tesis de Maestría. Monterrey, N.L., México.
- Acosta, S. R. 1986. Proyecto Labranza de Conservación. CIFAP, INIFAP, Zapopan.
- Acosta, S. R. 1988. Descriptores del género Phaseolus . INIFAP, SARH.
- Aguilera G. L. 1986. Estudio sobre la nodulación de las leguminosas silvestres de la Mixteca Oaxaqueña. UNAM, Mexico.
- Allen, O. y E. Allen. 1981. The Leguminosae. A source book of characteristics uses and Nodulation. University of Wisconsin Press; Madison, Wisconsin, USA.
- Bidwell, R. 1979. Fisiología vegetal. Primera ed. en español, AGT editor, México.
- Bryant, M. C. 1976. Antibióticos y su control mediante el laboratorio. Ed. El Manual Moderno, S.A. México.
- Castillo, F y J Cardenas. 1987. Fijación Biológica del Nitrógeno. Ciencia y Desarrollo, ed. español, Scientific American, 134: 88-96.

- Corby, H. D. 1981. The systematic value of leguminous root-nodules. I. N: R. M. Polhill y P.H. Kaven (eds), Advances in legume systematics, Part 2, Royal Botanical Gardens, Kew, Rhichmond Surrey, England.
- Cubero, J. J. 1983. Leguminosas de Gram. Mundi-Prensa, Madril.
- Dart, P. 1977. Infection and Development of leguminous nodules. In: R.W. Hardy (ed.). A treatise on Dinitrogen Fixation, Section III, Biology. Wiley Interscience Publ. New York, USA.
- Devlin, R. 1975. Fisiología Vegetal. 2da. ed., Ed. Omega, S.A., Barcelona.
- Difco Laboratory. 1984. Manual Difco. 10 ma ed. Detroit Michigan, USA.
- Eaglesham, A.P.J. 1986. The use of intrinsic antibiotic resistance (IAR) for Rhizobium study. Gerald H. Elkan Ed. Boyce Thompson Institute. Ithaca, New York.
- España, M.V. 1991. Uso de las leguminosas silvestres para mejorar la productividad de suelos. Tesis profesional (en prensa). Escuela de Biología. UAG.

- Gandarillas, C.A. 1987. Aislamiento, caracterización y evaluación de cepas de Rhizobium sp obtenidos de los nódulos de cacahuete (A. hypogea) en el estado de Guanajuato. Tesis Profesional, UAG, Biólogo.
- García, B. A. 1985. Evaluación de métodos de labranza en la producción de maíz. CAECJAC, CIAPAC, INIA, SARH.
- INEGI, Copia de jal, deprode. 1988. Jalisco en síntesis. Impreso en México.
- Lal, R. 1976. No-trillage effects on soil properties under different crops in wester Nigeria. Soil Sci. Soc. Amer. J. 40: 762-768.
- Lie, T. A. 1981. Environmental physiology of the legumene Rhizobium symbiosis. In Nitrogen Fixation. Ed. by W. J. Broughton, Clavendon Press-Oxford.
- Martínez, C. A. 1988. Caracterización Bromatológica de las principales leguminosas silvestres colectadas en la zona centro de Jalisco, subregión Guadalajara. Tesis Profesional. Escuela de Biología. UAG.

- Mc Vaugh, R. 1987. Flora Novo-Galiciana. A descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico. General editor: William R. Anderson 5: 43-423.
- Mora, S. S. 1988. Métodos de labranza y herbicidas en la producción de maíz en Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco. Instituto tecnológico Agropecuario No.26. SEP, SEIT, DGETA.
- Moreno, Z. P. 1989. Leguminosas arvenses de la zona centro del estado de Jalisco. Un recurso potencial para labranza de conservación. Tesis Profesional. Escuela de Biología. UAG.
- Parra, D. A. 1991. Distribución de leguminosas herbáceas silvestres en Jalisco. Tesis profesional. (en prensa). Escuela de Biología. UAG.
- Palletier, C.P. 1967. Nuestros Fertilizantes. México, D.F. Boletín No. 50 de Gusanos y Fertilizantes de Mexico.
- Posgate, V. R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. Ribbous R. Ed. methods in Microbiology. Vol 6 B. Academic Press London.
- Ruiz, E.P. 1991. Aislamiento y caracterización de Rhizobium sp. de leguminosas silvestres. Tesis profesional (en prensa). Escuela de Biología.
- Sánchez S. O. 1980. La Flora del Valle de México. 6ta. ed., Ed. Herrero, México, D.F.

- Stowers, M.D. 1985. Carbon Metabolism in Rhizobium species. Ann. Rev. Microbiol. 39:89-108.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for practical study of root-nodule bacteria. Biological Program Handbook No.15, Blackwell Scientific publications, Oxford.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. Ed. Hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina.
- Vincent, J.M. 1977. Rhizobium: General Microbiology. En: A Treatise on Dinitrogen Fixation Section III. Biology. Chapter 7.277-366 Ed. Hardy, RWF. y W.S. Silver A Wiley-Interscience Publication, U.S.A.



Tesis Rápidas

AV. CHAPULTEPEC SUR 209

Tel. 26-51-07, 26-50-81 y 26-50-92

GUADALAJARA, JAL.

TESIS • INFORMES • MEMORIAS • TESINAS • COPIAS
TRANSCRIPCIONES IBM • REDUCCIONES EN
ALBANESE Y BOND • COPIAS A CUALQUIER
TAMAÑO Y EN COLOR • HELIOGRAFICAS •
MADUROS • POLIESTERS • IMPRESION DE FORMAS
Y PASTAS • OFFSET • ENCUADERNADO •
ENGARGOLADO • REFILADO • MIMEOGRAFO •
GRABADO DE ESTENCILES • REVELADO DE ROLLOS
S I S T E M A S X E R O X
SERVICIO A DOMICILIO • CREDITO • BANCOTARJETAS