

98  
29:



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCION Bradyrhizobium japonicum-Glycine  
max (L.) MERRIL-SUELO CON DIFERENTES DOSIS  
DE NITROGENO

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 :

GEORGINA LUNA RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE CIENCIAS

1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A mis padres por el gran cariño e incondicional apoyo que siempre me han brindado, muchas gracias.

Irene Rodríguez de Luna.

y

Jorge Luna Cendejas.

A mis hermanas con cariño: María de Lourdes  
Mónica y  
Gabriela

A mi abuelita por su gran ejemplo de amor a la vida, con todo cariño

Mercedes Cendejas Vda. de Luna.

A la personita que más quiero, mi sobrino José Manuel.

A mi gran amiga:

Biol. María de la Luz Sosa Iturbe.

A mi cuñado y su mamá:

José Antonio Manriquez Martínez.  
Sra. Luz Martínez Ramírez.

## AGRADECIMIENTOS

Al jurado:

M. en C. Rosa María Ramírez Gama.

M. en C. Alfredo Echegaray Alemán.

M. en C. Nicolás Aguilera Herrera.

Biol. María Cristina Julia Pérez Reyes.

M. en C. Rodrigo Arturo Cárdenas y Espinosa.

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama mi más sincero agradecimiento por su valiosa asesoría, consejos y enseñanzas.

A la Q.F.B. María Guadalupe Tsuzuki Reyes por la ayuda incondicional que me brindó durante la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez por la ayuda y apoyo brindado.

A la Facultad de Ciencias por mi formación profesional.

A el Lab. de Microbiología Experimental de la Fac. de Química de la U.N.A.M. por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis amigas Luz, Gaby, Rocío y Martha por su incondicional apoyo.

A la Q.F.B. Valery Méndez Rocha por su apoyo y amistad.

A mis amigos y compañeros del Lab. de Microbiología Experimental, y a todas aquellas personas que de alguna manera ayudaron a la culminación de este trabajo.

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	3
2.0 GENERALIDADES	6
2.1 Aspectos Generales de la Soya ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	6
2.2 Fijación Biológica de Nitrógeno	24
2.3 Características de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	27
2.4 Efecto del Nitrógeno en la Interacción <i>Rhizobium</i> -Leguminosa	45
3.0 OBJETIVOS	69
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS	71
4.1 Suelos	71
4.2 Inoculantes	72
4.3 Preparación de Semillas	75
4.4 Experimento en Invernadero	75
4.5 Ensayos Microbiológicos Complementarios	81
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5.1 Determinaciones Físicas y Químicas de los Suelos	85
5.2 Cepas.	85
5.3 Experimentos en Invernadero	87
5.4 Ensayos Microbiológicos Adicionales	104
6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	106
7.0 LITERATURA CITADA	108
8.0 APÉNDICE	115

## RESUMEN

La demanda creciente de alimentos y el problema de la contaminación ambiental, han determinado que en los últimos años, se de especial atención al proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno, particularmente al efectuado por la asociación Rhizobium-Leguminosa; estableciéndose que la eficiencia de esta asociación y el rendimiento de las leguminosas puede ser mejorado mediante la utilización de cepas y variedades seleccionadas, y que este efecto puede ser limitado o favorecido por las condiciones ambientales.

Considerando lo anterior, así como, la importancia que tiene en nuestro país el cultivo de la soya (Glycine max (L.) Merrill) y los reportes que indican que el rendimiento de este cultivo puede ser incrementado mediante la inoculación y fertilización nitrogenada simultáneas, pero que esta respuesta varía con el tipo de cepa, de variedad y dosis de fertilizante nitrogenado; en el presente trabajo se procedió a evaluar el efecto de la fertilización nitrogenada sobre la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merrill-Suelo. Con tal fin se emplearon dos cepas de Bradyrhizobium japonicum (FQ-9 y FQ-12), con estas se inocularon semillas de soya variedad Júpiter; las semillas inoculadas se sembraron en dos suelos diferentes (Feozem y Fluvisol), a los que se les aplicaron los siguientes tratamientos: sin fertilizante, superfosfato sólo o superfosfato más nitrato de amonio. Los experimentos se realizaron en invernadero y a los 45 días de desarrollo se determinó la presencia o ausencia de nódulos y el peso seco de la parte aérea. El contenido de nitrógeno en el suelo en forma de amonio y nitratos se determinó al tiempo cero y después de la cosecha.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar que las características del suelo influyen de manera decisiva en el

establecimiento de la simbiosis y en la fijación de nitrógeno, procesos que fueron totalmente inhibidos en uno de los suelos en estudio (Feozem), el cual se caracterizó como calcáreo, tipo de suelo en el que se reportan deficiencias de fósforo, hierro, manganeso y otros nutrimentos. En tanto que en el otro suelo (Fluvisol), se logró confirmar la eficiencia y especificidad de las cepas, así como la respuesta a la fertilización nitrogenada que varió en función no sólo de la cepa sino también del hospedero. Observándose que la cepa FQ-9 en asociación con la variedad Júpiter (que es una de las variedades que más se cultivan en México), es tolerante a nitratos y que en presencia de nitratos no sólo es capaz de fijar nitrógeno sino que su rendimiento es mayor a cuando se aplica sólo el inoculante o sólo el nitrógeno mineral

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La soya (Glycine max (L.) Merrill), es una leguminosa, que en México fue introducida por primera vez en 1911, y fue hasta 1958 que se inició en forma comercial, sembrándose una superficie de 300 hectáreas. Apartir de entonces su cultivo ha aumentado de manera impresionante, llegando a sembrarse 282,000 hectáreas en 1992.

La importancia de la soya radica en que puede ser una fuente alternativa de proteína en la dieta del humano, debido a que su calidad proteica es considerada como la mejor del reino vegetal, semejante a la proteína animal.

Otro aspecto relevante de la soya y en la mayoría de las leguminosas, es que son capaces de establecer una relación simbiótica con bacterias del género Bradyrhizobium y Rhizobium, las que tienen la capacidad de formar nódulos en las raíces de las plantas y fijar nitrógeno atmosférico. Estos microorganismos al estar asociados con las plantas utilizan como fuente de energía los compuestos orgánicos (fotosintatos) producidos por el hospedero, y reducen el nitrógeno atmosférico a amoníaco, forma que es utilizada por la planta y por los mismos microorganismos para la síntesis de proteínas, lo que determina el aumento en el desarrollo y rendimiento de las leguminosas, así como, en el contenido de nitrógeno en el suelo.

Con objeto de mejorar este tipo de interacción y los beneficios que derivan de la misma, se introdujo la tecnología de la inoculación, también conocida como fertilización biológica, que consiste en introducir cepas bacterianas seleccionadas por su alta capacidad fijadora de nitrógeno. Esta tecnología permite reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, los que debidos a la

crisis energética actual, han tenido un aumento drástico en su costo.

No obstante lo anterior, se debe considerar que el éxito de la fertilización biológica, depende del establecimiento de una simbiosis eficiente, la cual es regulada por la bacteria, por el hospedero, por los factores climáticos como: temperatura, humedad, intensidad luminosa y periodo de luminosidad, así como por, los factores edáficos, tales como: textura, pH, contenido de materia orgánica y de nutrimentos en general. En relación al contenido de nitrógeno orgánico e inorgánico presente en el suelo, se ha establecido, que cuando se encuentra en forma disponible en altas concentraciones este elemento inhibe el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-Leguminosa, lo que se manifiesta por la reducción de: número de nódulos, masa nodular, actividad de la nitrogenasa y consecuentemente del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Asimismo existen numerosos reportes que indican que en suelos deficientes en este elemento, es necesario aplicar una pequeña dosis de fertilizante mineral, especialmente en la primera etapa del desarrollo de las leguminosas, cuando los nódulos empiezan a formarse y no han iniciado su actividad fijadora de nitrógeno, por lo que la planta y las mismas bacterias abastecen sus necesidades de nitrógeno del que le proporciona el nitrógeno mineral añadido al suelo, considerándose este pequeño suplemento como una dosis de arranque que favorece el desarrollo inicial de la planta, el establecimiento de la simbiosis eficiente y consecuentemente en un buen rendimiento.

Por otra parte, también se sabe que el nitrógeno asimilado por la soya deriva en 60% de la fijación biológica de nitrógeno y en un 40% del suelo, lo que indica que en suelos deficientes de nitrógeno, para asegurar el buen rendimiento de este tipo de cultivo, además de aplicar el inoculante, es necesario asegurar la presencia de cantidades adecuadas de

nitrógeno mineral en el suelo, cuya adición en ocasiones puede limitar la fijación biológica de nitrógeno. Lo anterior ha conducido al estudio y selección de cepas bacterianas que toleren altas concentraciones de nitrógeno mineral y que en presencia de este conserven su capacidad para infectar a la leguminosa, formar nódulos y fijar nitrógeno. Por lo que en este trabajo se pretende establecer el efecto de diferentes dosis de nitrógeno en la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merrill; para ello, se emplearon cepas previamente seleccionadas con una alta capacidad fijadora de nitrógeno y la variedad de soya Júpiter, con la que en estudios previos se ha determinado establecen simbiosis eficientes, los experimentos se condujeron en invernadero en presencia de dos tipos de suelos

## 2.0 GENERALIDADES

### 2.1 Aspectos Generales de la Soya

#### 2.1.1 Importancia

La soya es un cultivo de importancia mundial, por sus propiedades alimenticias e industriales, se le considera como una buena alternativa para satisfacer el déficit de proteínas y aceite de consumo humano; además de ser una fuente de proteína barata.

La semilla de soya contiene un promedio de 36% de proteína y 18% de aceite. (Sánchez, 1988)

La semilla verde contiene vitamina A, buena cantidad de la vitamina B y riboflavina.

El forraje y la semilla son ricos en minerales tales como el potasio, fósforo, calcio y fierro. (Crispín y Barriga, 1990)

#### 2.1.2 Usos

La soya puede usarse como forraje y como abono verde. El forraje constituye una fuente de proteína para la alimentación del ganado, que influye en una mayor producción de leche, grasa y carne. Como abono verde se emplean variedades que producen grandes cantidades de materia verde.

El aceite de soya es empleado principalmente para elaborar manteca, margarina y aceite para cocinar. En mantecas, el aceite de soya es combinado con otros aceites y grasas.

La soya también se usa para la elaboración de otros productos alimenticios como harina, leche, carne, cereal, galletas,

pan, tortillas, alimento de infantes, dulces, salsas, etc. Generalmente los productos derivados de la soya no se usan solos, sino como complementos de otros alimentos, para aumentar el contenido proteico. (Barriga y Nieto, 1983; Crispín y Barriga, 1990)

También se emplea para la obtención de derivados como: lacas, jabones, lecitina (que es usada como agente hidratante y estabilizante en alimentos, cosméticos, medicamentos, plásticos y detergentes), etc... (Hernández y Meza, 1987; SARH, 1982)

### 2.1.3 La Soya en México

La soya fue introducida por primera vez a México en el año de 1911 por la Secretaría de Agricultura y Fomento en forma experimental, pero no tuvo éxito debido a que los campesinos no mostraron interés y los trabajos fueron abandonados. En 1928 se volvió a experimentar con algunas variedades en terrenos de la Escuela Nacional de Agricultura en Chapingo, Edo. de México.

En 1932 se iniciaron trabajos en Veracruz por el Centro de Agricultura del estado en campos de Jalapa, Las Animas, Tecumilca y el Carrizal, donde se logró la adaptación de algunas variedades. Con estas variedades se experimento de nuevo en 1937 en un Campo Agrícola e Industrial en Tlalnepantla, Edo. de México dando buenos resultados, pero otra vez se tropezó con la resistencia de los campesinos, que no tenían mercado para su producto, ni lo podían utilizar para la alimentación o para la industria.

En 1942 la Dirección General de Agricultura, de la Secretaría de Agricultura y Fomento inició otros experimentos en los estados de México, Querétaro, Guanajuato y Jalisco; en este mismo año el Banco Nacional de Crédito Ejidal importó semilla

de los Estados Unidos, para sembrar en la Comarca Lagunera, siendo también un fracaso. (Yepez, 1988; Saules, 1986)

Fue hasta 1959 que el cultivo de la soya se inició a escala comercial en el Valle del Yaqui, Sonora; en este mismo estado el cultivo continuo a la costa en 1960 y al Valle del Mayo en 1961; luego se extendió a los Valles de Culiacán, del Fuerte y del Carrizo en Sinaloa, en 1962, 1963, 1964 respectivamente. Extendiéndose más tarde las siembras a otras partes del país como la región de Delicias, Chihuahua en 1967 y al sur de Tamaulipas en 1969 (Barriga y Nieto, 1983)

La superficie sembrada en Sonora durante 1958 fue aproximadamente de 300 hectáreas, y a partir de entonces su cultivo aumentó en forma importante como se observa en las tablas 1 y 2.

Durante el período de 1959 a 1979, se registró en el país una producción acumulada de 3.1 millones de toneladas de soya, con un valor total de producción de 18,937 millones de pesos; lo que demuestra la importancia económica de la soya en México, ya que promovió el desarrollo de la industria alimenticia humana y animal (Barriga y Nieto, 1983), originando mayores necesidades de producción de este grano, como se puede observar en la tabla 2.

Aun cuando la producción de la soya ha aumentado considerablemente y de que las condiciones ecológicas y técnicas agrícolas hayan causado rendimientos por hectárea similares a los obtenidos a nivel mundial (Tabla 2), la producción de esta leguminosa actualmente cubre aproximadamente solo el 50% de las necesidades, por lo que el Banco de México reporta importaciones para 1990 de 896 mil toneladas y para 1991, 1,489 mil toneladas. (SARH, 1992b)

TABLA 1

CULTIVO DE LA SOYA EN MÉXICO 1958-1980  
(CRISPÍN Y BARRIGA, 1990)

AÑO	SUPERFICIE SEMBRADA (Ha)
1958	300
1959	1,600
1960	2,570
1961	8,363
1962	28,532
1963	9,000
1964	12,000
1968	124,000
1969	152,000
1970 - 1979	300,000/año
1980	130,000

TABLA 2

SERIE HISTÓRICA DE LA SOYA EN MÉXICO, 1980-1992  
(SARH, 1992a; SARH 1992b; SARH 1992c)

AÑO	SUPERFICIE (1)		PRODUCCION (2)		RENDIMIENTO (3)	
	SEMBRADA	COSECHADA	NACIONAL	MUNDIAL *	NACIONAL	MUNDIAL *
1980	130		322	( 80,000)	2.09	(1.60)
1981			707	( 88,500)	1.95	(1.80)
1982			661	( 93,200)	1.69	(1.80)
1983			688	( 79,400)	1.76	(1.60)
1984			685	( 90,200)	1.76	(1.70)
1985			929	(101,100)	1.76	(1.70)
1986			709	( 94,200)	1.86	(1.80)
1987	496	470	828	(100,200)	1.76	(1.90)
1988	155	139	226	( 93,500)	1.63	(1.72)
1989	508	490	992	(106,900)	2.02	(1.86)
1990	297	286	575	(108,600)	2.01	(1.92)
1991	348	342	725		2.10	
1992	282					

(1) miles de hectáreas

(2) miles de toneladas

(3) toneladas por hectárea

\* datos de producción y rendimiento mundiales

En México la soya se cultiva en áreas de riego y de temporal; correspondiendo el mayor porcentaje (90%) a condiciones de riego y en menor proporción a temporal, obteniéndose en ambas condiciones un rendimiento cercano a los 1900 kilogramos por hectárea . (SARH, 1989)

Las primeras siembras de temporal se hicieron en los estados de Veracruz, Chiapas, Campeche, Jalisco y Yucatán; y las de riego en los estados de San Luis Potosí, Nuevo León y Baja California Sur durante 1978. Al año siguiente se iniciaron las siembras de temporal en Nayarit y Oaxaca, y las de riego en Coahuila. (Barriga y Nieto, 1983)

Los principales estados productores de soya a nivel nacional son: Sonora, Sinaloa, Chihuahua y Tamaulipas; y se ha extendido más lentamente al centro y sur del país a los estados de Veracruz, Coahuila, Jalisco, Guanajuato, Chiapas y Yucatán. Por su alta adaptabilidad, así como por su rentabilidad, este cultivo se ha colocado en situación ventajosa con respecto a otros cultivos. (Barriga y Nieto, 1983; Yopez, 1988)

De 1959 a 1969 en México se sembraron únicamente variedades americanas de soya, sin embargo de 1970 a 1980, gracias a las nuevas variedades originadas por la investigación agrícola nacional, se logró que el 80% del área ocupada por esta leguminosa en los diferentes estados productores se sembrara con híbridos obtenidos en México. (Barriga y Nieto, 1983)

Las variedades que actualmente se siembran en las diferentes regiones del país se observan en la Tabla 3.

#### 2.1.4 Clasificación Taxonómica

La soya pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionidea y al género Glycine; este género comprende de 12

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (Kg/ha)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Baja California Norte	Valle de Mexicali	Cajeme	120			15 Jun. a 15 Jul.		(1)
Campeche	Ciclo Primavera-Verano Norte, Centro y Costa	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula 86	105	50 a 70		15 Jun. a 15 Jul.	15 Sep. a 15 Oct.	(2, 3 y 4)
Colima	Tecomán	Júpiter UFV-1			Temporal	15 Jul.		(2)
Chiapas	Ciclo Primavera-Verano Costa de Chiapas y Soconusco, Mpio. Suchiate, Frontera, Mgo. y parte de Tapachula	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula 86 Hartz - 9190	100 a 125	70 a 100	Temporal	20 Jun. a 25 Jul.	15 Oct. a 30 Nov.	(3, 5 y 6)
	Mpio. de Tuxtla Chico y parte de Tapachula	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula 86	110 a 125	70 a 100		1 Jul. a 30 Jul.	1 Nov. a 30 Nov.	(3)
	Depresión Central Mpio. de Villahermosa	Júpiter Tapachula 86 UFV-1 Visoja	110 a 125	70 a 100		1 Jul. a 15 Jul.	1 Nov. a 30 Nov.	(2 y 3)
	Mpios. de Ocozacoautla, Cintapa y Jiquipilas	Júpiter UFV-1 Tapachula 86	110 a 125	70 a 100		Inicio Temporal a 30 Jul. (Opción del 1 al 15 de Jul.)	1 Nov. a 30 Nov.	(3)
	Ciclo Otoño-Invierno Costa (Acapetahua, Acacoyahua, Huixtla y Villa Comaltán)	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula 86 125	115 100 110 125	70 a 100	Hum Residual	20 Oct. a 25 Nov.	20 Feb. a 25 Nov.	(3)
	Soconusco	Tapachula 86 Júpiter	100	110	Rego	25 Dic. a 20 Ene.	1 Abr. a 30 Abr.	(7 y 8)

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (Kg/ha)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Chihuahua	Ciclo Primavera - Verano Cd. Delicias y regiones semitárricas	Santana 77 Cajeme Rosales S-80 Tamazula S-80 Culiacan Suprema Precoc UF-82 Susqui-86 Mayo 80	130 a 165	80 a 100		1 May. a 15 Jun.	30 Sep. a 30 Oct.	(2 y 3)
	Cd. Delicias	Constancia-86 Rosales S-80 Tamazula S-80 Cajeme Susqui-86 Suprema Culiacan Mayo-80	130 a 165	80 a 100		16 Jun. a 5 Jul.	1 Nov. a 15 Dic.	(2 y 3)
Coahuila	La Laguna	Cajeme Davis Laguna-86	100	70 a 80	Rego	1 May. a 15 Jun.	20 Sep. a 30 Oct.	(4)
Guanajuato	El Bajo	Suprema Cajeme BM2 Brigg				15 Jun. a 15 Jul.		(2)
Guerrero	Ciclo Primavera - Verano Tierra Caliente, Iguala y Costas	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula-86	120	75		15 Jun. a 15 Jul.	1 Nov. a 30 Nov.	(2 y 3)
Jalisco	Valle de Guadalupe	Jalisco Cajeme Brigg Forrest Telesiete				15 Jun. a 30 Jun.		(2)

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (K/HA)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Michoacán	El Bajo	Cajeme Terablate Davis			Riego	15 Abr. a 15 Jun.		(2)
	Antunex y Apetzingán	Cajeme Terablate Júpiter Santa Rosa UFV-1				1 Jul. a 31 Jul.		(2)
Nuevo León	Ciclo Primavera - Verano Regiones de Chrea, Los Ramones y Pasquerías	Júpiter	120	70		1 Jul. a 30 Jul.	1 Nov. a 30 Nov.	(2 y 3)
Nayarit	Costa	Sanalora 77 Culiacan Tamazula Bragg Davis	110 113 100 111 110		Temporal	15 Jun. a 15 Jul.		(9)
Quintana Roo	Centro y Sur	UFV-1 Júpiter				15 Jun. a 30 Jul.		(2)
	Costa	Júpiter				1 Dic. a 31 Dic.		(2)
San Luis Potosí	Ciclo Primavera - Verano La Huasteca Potosina	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Hartz-9190 Tapachula-88	135	50		1 Jun. a 15 Jul.	15 Oct. a 15 Nov.	(2, 3 y 10)
	Ciclo Otoño - Invierno Las Huastecas	Júpiter	120	50		1 Dic. a 31 Dic.	1 Abr. a 30 Abr.	(2, 7 y 8)

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (Kg/ha)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Sinaloa	Ciclo Primavera - Verano Valle del Carrizo	Tamazula S-80	125	80	Riego	1 May. a 30 Jun. 1 May. a 15 Jun.	1 Oct. a 15 Nov.	(2, 3, 11 y 12)
		Rosales S-80 Cajeme Davis Harbar-88 Perez VF-82 Tetabiate						
	Valle del Fuerte	Harbar-88	125 a 135	80	Riego	1 May. a 20 Jun.	1 Sep. a 30 Oct.	(2, 3, 11 y 12)
		Rosales S-80 Cajeme Tamazula S-80 Davis Hartz 5370 Perez VF-82 Hartz-7110 Cuicacán						
	Valle de Culiacán	Rosales S-80	120	80 a 90	Riego	15 May. a 30 Jun.	15 Oct. a 10 Dic.	(2, 3, 11 y 12)
		Tamazula S-80 Davis Bragg Cajeme Hartz 7110						
	Ciclo Otoño - Invierno Valle de Culiacán	Rosales S-80	110 a 130	110 a 130	Riego	1 Dic. a 20 Dic.	15 Mar. a 15 Abr.	(2, 7, 8, 11 y 13)
		Sanatona 77 Cajeme Tamazula S-80 Cuicacán Huites 77 Perez VF-82 Davis Cajeme Tetabiate Rosales S-80						
	Valle del Fuerte	Perez VF-82	120 a 130	110		1 Dic. a 15 Dic.	31 Mar. a 25 Abr.	(2, 7, 8, 11 y 13)

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (Kg/ha)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Sonora	Ciclo Primavera - Verano Valle del Yaqui, Mayo y Guaymas	Cajeme Davis	130 a 140	70 a 80	Riego	1 May. a 15 Jun.	15 Sep. a 30 Oct.	(2, 3 y 4)
	Valle del Yaqui y Mayo	Tetabiate Cajeme Suaqui-88 Harbar-88 Davis Batic-88 Tamazula S-80 Mayo-80	130 a 140	70 a 80	Riego	15 Abr. a 15 May. 1 May. a 15 Jun.	15 Sep. a 30 Oct.	(2, 3, 4, 14 y 15)
	Costa de Hermosillo y Caborca	Cajeme	140 a 150	70 a 80		1 Jun. a 30 Jun.	1 Oct. a 30 Oct.	(3)
Tamaulipas	Ciclo Primavera - Verano Huastecas	Júpiter UFV-1 Santa Rosa Tapachula-88 Hertz-9190	118 a 120 115 111 110 a 120	65 65 65 65	Riego	15 Jun. a 30 Jul. 1 Jun. a 15 Jul.	1 Nov. a 30 Nov. 15 Oct. a 15 Nov.	(2, 3 y 16)
	Tampico y Marita	UFV-1 Santa Rosa Júpiter Tapachula 88 Hertz-9190	115 a 130	50 70		15 Jun. a 20 Jul.	1 Nov. a 30 Nov.	(2 y 3)
	Río Bravo	Júpiter Santa Rosa	120 a 130	65 a 70	Riego	1 Jul. a 15 Ago. 10 Jun. a 10 Jul.	15 Nov. a 15 Dic. 20 Oct. a 15 Nov.	(2 y 3)
	Centro del Estado	UFV-1 Santa Rosa Júpiter Tapachula 88	110 a 120 120 a 130	60 a 70	Riego	15 Jul. a 30 Jul. 1 Jul. a 30 Jul.	1 Oct. a 30 Oct.	(3 y 17)
	Ciclo Otoño - Invierno Huastecas	Júpiter	110 a 115	60	Temporal	15 Dic. a 5 Ene.	5 Abr. a 30 Abr.	(7 y 8)

### TABLA 3

ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA EN DONDE SE CULTIVA SOYA, VARIETADES QUE SE RECOMIENDAN Y ALGUNAS CARACTERÍSTICAS.

ESTADO	REGIÓN	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DÍAS)	DENSIDAD DE SIEMBRA (Kg/ha)	MODALIDAD	ÉPOCA DE SIEMBRA	ÉPOCA DE COSECHA	REFERENCIA
Veracruz	Ciclo Primavera - Verano Cuenca Baja del Papaloapan y Cuenca del Río Coatzacoalcos	UFV-1 Júpiter Tapachula-86	120	65	Temporal	1 Jul. a 15 Sep.	1 Nov. a 15 Ene.	(2 y 3)
	Pedras Negras, Medellín y Cardel	Júpiter Tapachula-86	126	65		15 Jun. a 30 Jul.	1 Oct. a 30 Nov.	(3)
	Ciclo Otoño - Invierno Las Huastecas	Júpiter	120	50	Hum Residual	1 Dic. a 31 Dic.	1 Abr. a 15 May.	(2, 7 y 8)
Yucatán	Mun. Oriente y Sur	Júpiter	130	70 a 80	Temporal	15 Jun. a 15 Jul.	15 Sep. a 15 Oct.	(2 y 4)

**REFERENCIAS**

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>1) SARH, 1987</li> <li>2) Crispín y Berriga, 1990</li> <li>3) SARH, 1991b</li> <li>4) Berriga y Nieto, 1983</li> <li>5) Reza et al., 1983</li> <li>6) Reza et al., 1989</li> <li>7) SARH, 1991a</li> <li>8) SARH, 1992d</li> <li>9) SARH, 1989</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>10) SARH, 1990</li> <li>11) López et al., 1985</li> <li>12) Hernández et al., 1985</li> <li>13) Paredes et al., 1984</li> <li>14) Castillo et al., 1986</li> <li>15) Montoya y Castillo, 1980</li> <li>16) Maldonado et al., 1982</li> <li>17) Osorio y Pedraza, 1985</li> </ul> |
|--|---|

a 15 especies, de las cuales Glycine max (L.) Merrill es la de mayor importancia económica.

#### 2.1.5 Origen e Historia

Se considera que la soya es originaria de las provincias del noreste de China.

La forma cultivada (Glycine max (L.) Merrill) deriva del progenitor Glycine ussuriensis, especie cultivada que crece espontáneamente en Corea, Japón, Taiwán, norte de China y las zonas colindantes de la Comunidad de Estados Independientes (antes URSS). (Venturi y Amaducci, 1988)

Hymowitz (1950) (citado por Yepez, 1988) determinó mediante estudios citogenéticos que G. max y G. ussuriensis son la misma especie.

La cita más antigua del cultivo de la soya está contenida en el Pen Ts'ao Kang Mu (publicación médica que describe las plantas chinas) del emperador Shen Nung, cuya fecha de publicación se remota al año 2838 antes de Cristo..

La soya es considerada una planta esencial para la civilización china, siendo la leguminosa cultivada más importante y junto con el arroz, trigo, cebada y mijo, uno de los cinco Wu Ku (granos sagrados). (Venturi y Amaducci, 1988)

Hernández (1950) (citado por Yepez, 1988) afirma que la soya fue llevada de China a Japón y después a Europa.

En Europa el interés por la soya comienza a principios de 1900, pero ya anteriormente en el Jardín Botánico de París (1740) y en el Jardín Real de Kew, Inglaterra (1790) habían sido cultivadas semillas traídas por los misioneros desde China. (Venturi y Amaducci, 1988)

En Norteamérica fue introducida por Samuel Bowen en 1765. Los primeros estudios y plantaciones que se hicieron en Estados Unidos, fueron con fines de utilización forrajera. No es hasta después de la Segunda Guerra Mundial que adquiere importancia en la utilización industrial, como suministrador de aceite y proteínas. (Venturí y Amaducci, 1988; Yepez, 1988)

En Latinoamérica, sólo algunos países tales como Brasil, Argentina, Paraguay y México la cultivan extensamente, en tanto que en los otros se siembra eventualmente o con fines experimentales (SARH, 1992c)

#### 2.1.6 Descripción Botánica

Planta herbácea, anual; raíz pivotante; tallo erguido o rastrero, bien ramificado, con una altura entre los 45 cm y 180 cm; con hojas trifoliadas, raramente pentafoliadas. Tanto el tallo como las hojas y vainas suelen ser más o menos pubescentes.

Raíz - el sistema radicular esta formado por una raíz principal que puede alcanzar hasta 2m de profundidad, sin penetrar por debajo de la capa arable; de esta se originan las raíces secundarias y terciarias, con muchos pelos radicales.

Tallo - es erguido y bien ramificado, en algunas variedades el tallo es rastrero. De acuerdo con la reacción de la variedad al fotoperíodo y a su hábito de crecimiento, este puede ser: determinado cuando el tallo termina en un racimo floral que origina las vainas; o indeterminado en el cual el tallo continua creciendo a medida que produce flores y vainas.

Hojas - son de diferentes tipos: Dos cotiledones de forma semicircular, las cuales contienen la reserva de energía hasta que la planta se vuelva autótrofa; durante los primeros estadios amarillean y caen. Dos hojas simple unifoliadas, opuestas, que salen del nudo inmediato superior de los cotiledones, estas son de forma ovalada con peciolo largos. Las hojas siguientes a las unifoliadas y todas las posteriores son trifoliadas, alternas; los folíolos tienen borde entero y forma variable de alargada a oval o forma de lanza, con una longitud que va de 4 a 20cm de largo y 3 a 10cm de ancho.

Las hojas se vuelven amarillas al llegar a la maduración y normalmente caen antes de que las vainas estén maduras y cuando la semilla tiene todavía bastante humedad.

Flores - son de color blanco, violeta o con base violeta y el resto de la corola blanco, miden entre 5 y 7 mm de longitud; son de fecundación autógena (el polen producido dentro de una flor fecunda el ovario de esa misma flor).

La flor tiene cáliz tubular, corola dividida en cinco pétalos, diez estambres y un ovario generalmente con dos o cinco óvulos, los estambres rodean el pistilo.

Inflorescencia - en forma de racimos, con un número de flores entre 8 y 16. En las variedades indeterminadas los racimos son axilares, aparecen normalmente entre el cuarto o quinto nudo y la floración progresa hacia la parte apical del tallo y de las ramificaciones, produciendo vainas distribuidas uniformemente sobre el tallo y las ramificaciones y menos espesas hacia la parte apical. En las variedades determinadas son axilares y terminales, la floración comienza casi simultáneamente en todos los nudos, terminando con un racimo de vainas.

El número de flores es casi siempre muy superior al de las vainas producidas, con un porcentaje de abortos variables entre el 20 y 80%.

Vainas - miden de 2 a 7 cm de largo y 1 cm de ancho, ligeramente curvas o rectas, con las valvas constreñidas contra las semillas; dehiscentes en variedades silvestres e indehiscentes en variedades mejoradas, son pubescentes de color amarillo pálido, gris, café o negro. Una vaina puede tener de 1 a 5 semillas, pero más frecuentemente se encuentran de 2 a 3 semillas.

Semilla - la forma varía desde casi esférica hasta achatada o también ovalada; superficie lisa y de color verde, café, amarillo, negro o combinación de estos colores, con un hilio pequeño.

Las semillas son de peso variable entre 50 y más de 400 miligramos con valores que oscilan entre 100 y 200 miligramos en las variedades cultivadas para aceite. (Venturi y Amaducci, 1988; Yepez, 1988; SARH, 1982; Crispín y Barriga, 1990; Scott y Aldrich, 1975; Saules, 1986; Sánchez, 1988)

Los factores ambientales juegan un papel determinante en el desarrollo y rendimiento de todos los cultivos. En el caso particular de la soya el fotoperíodo determina el comienzo de la floración. La soya se considera como una planta de días cortos ya que es muy sensible a la duración del día; el período de oscuridad es el que controla el inicio de la floración. (Yepez, 1988; Venturi y Amaducci, 1988; Crispín y Barriga, 1990). Los períodos de oscuridad son determinantes en la producción de primordios florales, por lo que algunas variedades requieren 10 o más horas de oscuridad, y todas florecen más rápidamente con períodos de oscuridad entre 14 y 16 horas. Lo que hace que las variedades tengan un área de adaptación limitada en las que producen sus más altos

rendimientos y cuando son cultivadas fuera de esta área los rendimientos decrecen. (Crispín y Barriga, 1990)

Existen variedades precoces y tardías. Las precoces están adaptadas a latitudes altas, donde los días son más largos y pueden florecer independientemente de las horas de oscuridad; mientras que las variedades tardías están adaptadas a días cortos, latitudes bajas y necesitan días por lo menos con 10 horas de oscuridad antes de comenzar la floración. (Venturi y Amaducci, 1988)

De acuerdo a la adaptación a diferentes latitudes la soya se ha clasificado en 14 grupos de maduración que van desde 00, 0. I hasta XII, correspondiendo los primeros a los grupos del ciclo temprano y los últimos a los ciclos tardíos. (Barriga y Nieto, 1983)

En la tabla 4 se observan algunas de las variedades que se cultivan en México y el grupo de madurez al que pertenecen.

El efecto de otros factores ambientales se describe en páginas posteriores en donde se analiza su acción no sólo sobre el desarrollo de la soya sino también sobre la interacción con Bradyrhizobium japonicum y el proceso de fijación de nitrógeno.

#### 2.1.7 Plagas y Enfermedades.

Plagas - algunas de las plagas más comunes de la soya son: Trips Hercotrips phaseoli; gusano bellotero, Heliothis spp; chinche apestosa, Euchistus spp y Nezaso sp; gusano falso mediador de la soya Pseudoplusia includena; gusano falso mediador de la col Trichoplusia; gusano soldado, Spodoptera sp; gusano peludo, Estigmene acrea; diabroticas, Diabrotica balteata; colapsis o esquelotizadores, Colaspis brunnea y C. hypochalara; periquito tricornudo, Spissistilus festinus;

TABLA 4

VARIETADES DE SOYA EN MÉXICO Y GRUPO DE MADURACIÓN AL QUE PERTENECEN (BARRIGA Y NIETO, 1983)

VARIEDAD	GRUPO	ESTADOS DONDE SE ADAPTA
Tetablate	V	Jalisco, Chihuahua, Sinaloa y Sonora
Forrest	V	Jalisco, Chiapas y Campeche
Bacatete	V	Sonora
Cajeme	VI	Chihuahua, Coahuila, Sinaloa y Sonora
Davis	VI	Chihuahua, Coahuila, Sinaloa y Sonora
Hood	VI	Chihuahua y Sinaloa
Huites	VI	Sinaloa
Mayo 80	VI	Sonora
Yaqui 80	VI	Sonora
Corerepe	VII	Sinaloa
Bragg	VII	Chihuahua
Conchos	VII	Chihuahua
Sanalona	VII	Nayarit y Sinaloa
Culiacán	VII	Nayarit, Sinaloa y Veracruz
Júpiter	X	Jalisco, Nayarit, Campeche, Chiapas, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán

picudo de la soya, Sternechus paludatus; torito de la soya, Dectes texanus; chinche verde, Nezara viridula; gusano terciopelo, Anticarsia gemmatalis. (Saules, 1986; Aviles, 1986)

Enfermedades - una enfermedad bacteriana común es la "mancha de la hoja" (Pseudomonas glycinea y P. solanacearum).

Entre las enfermedades de la soya más comunes causadas por hongos se encuentra: "mildiu veloso" (Peronospora mshurica), "pudrición de raíz y tallo" (Phytophthora sp., Fusarium sp. y Rhizoctonia sp.), "marchitamiento" (Fusarium sp.), "antracnosis" (Colletotrichum sp.). y "mancha violácea". (Cercospora sp.).

También la soya es afectada por enfermedades causadas por virus como: el "mosaico del frijol" y el "machismo". (SARH, 1976; Saules, 1986)

## 2.2 Fijación Biológica del Nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso en el cual el nitrógeno molecular de la atmósfera ( $N_2$ ), es transformado a amoníaco ( $NH_3$ ) por la acción de los microorganismos, para que de esta forma pueda ser utilizado por las plantas.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se pueden dividir en dos grupos: microorganismos no simbióticos y microorganismos simbióticos.

Microorganismos no simbióticos. Estos fijan nitrógeno en condiciones de vida libre, como ejemplos se tienen a: Azotobacter vinelandii, Clostridium pasteurianum, Klebsiella pneumoniae, Rhodospirillum rubrum, etc..

Microorganismos simbióticos. La relación mejor conocida es la que se da entre las bacterias del género Rhizobium y leguminosas, pero también se han descrito aquellas en las que participan: el alga verde azul (cianobacteria) Anabaena azollae y el helecho acuático Azolla; Frankia alni que es un actinomiceto que se asocia con el aliso y otras plantas no leguminosas; así como la relación entre las bacterias del género Azospirillum y diversas gramíneas. (Brill, 1977; ADIFAL, 1986)

La reacción química en la fijación biológica del nitrógeno, consiste primero en romper el triple enlace de la molécula de  $N_2$ , para que luego tres átomos de hidrógeno se unan a cada átomo de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno obtienen el hidrógeno de moléculas orgánicas como la glucosa, que es el principal azúcar producido en la fotosíntesis. El medio acuoso de las células aporta los protones o iones hidronio que se combinan con los electrones que son transportados activamente y de esta manera, la glucosa es oxidada (dona protones) y el nitrógeno es reducido (acepta protones). Las dos moléculas no interactúan directamente, la ruta que las conecta es compleja y algunas de sus etapas no han sido suficientemente exploradas. (Brill, 1977)

La conversión de una molécula de  $N_2$  en dos moléculas de amoníaco, necesita de 12 a 14 moléculas de ATP. (Brill, 1977)

En todos los microorganismos fijadores de nitrógeno, la enzima nitrogenasa es el agente responsable de la fijación, la nitrogenasa se encarga de catalizar la conversión del nitrógeno molecular en amoníaco. (Brill, 1981)

La enzima nitrogenasa esta constituida por dos proteínas denominadas Componente I y Componente II. El Componente I tiene un peso molecular de 220,000 unidades de masa atómica y está integrada por cuatro subunidades, cada una de las cuales

es una cadena simple de aminoácidos; además contiene veinticuatro átomos de hierro y dos átomos de molibdeno (el papel de estos dos átomos de molibdeno es muy importante, ya que parece estar en una parte del sitio activo de la enzima). Y el Componente II tiene un peso molecular de 55,000 unidades de masa atómica, esta formado por dos subunidades de proteína y contiene cuatro átomos de hierro.

En la fijación de nitrógeno catalizada por la enzima nitrogenasa, primero se efectúa la reducción del Componente II de la enzima por una proteína transportadora de electrones externa a la nitrogenasa; el Componente II reducido reacciona con el ATP y reduce luego al Componente I; y finalmente el Componente I reduce al nitrógeno molecular formando amoníaco. (Brill, 1977)

#### 2.2.1 Importancia de la Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento fundamental para los seres vivos, porque forma parte esencial de las proteínas. A la vez es un elemento abundante, dado que la atmósfera terrestre contiene aproximadamente el 80% de éste en forma molecular ( $N_2$ ); pero el nitrógeno atmosférico es inerte y no pueden aprovecharlo la mayoría de los seres vivos, por lo que únicamente se incorpora en los sistemas biológicos cuando es fijado o combinado con otros elementos como el hidrógeno y el oxígeno. (Brill, 1977; ADIFAL, 1986)

En la agricultura este elemento es muy importante para elevar la producción de los cultivos y poder satisfacer las necesidades del consumo humano de alimentos ricos en proteínas. En la mayoría de los casos, este es abastecido mediante la aplicación de fertilizantes nitrogenados, no obstante, el crecimiento de la población a nivel mundial, ha determinado el agotamiento continuo de nitrógeno en el suelo y la necesidad creciente del empleo de fertilizantes; lo que

aunado a la crisis energética actual ha derivado en el aumento drástico en el costo de este tipo de fertilizantes.

Lo anterior ha dado pie al interés por la fijación biológica de nitrógeno en la agricultura, calculándose que a través de este proceso se incorporan al suelo 860 kg de nitrógeno por hectárea al año

La fijación de nitrógeno atmosférico que lleva a cabo la relación simbiótica Rhizobium-Leguminosa que como ya se mencionó anteriormente es la mejor conocida, ha despertado un gran interés debido a que numerosas leguminosas se encuentran entre los cultivos más importantes del mundo, debido a que son fuente de alimento tanto para el hombre como para los animales, este alimento es rico en proteínas, minerales y vitaminas. (FAO, 1985)

Otra ventaja de las leguminosas es que parte del nitrógeno fijado es incorporado en el suelo, por lo que estas son empleadas en la rotación de cultivos, en sistemas múltiples en los que se intercalan con otros cultivos o bien como abonos verdes para otros cultivos. (FAO, 1985)

En el presente trabajo la leguminosa de interés es la soya que establece relación simbiótica con la bacteria Bradyrhizobium japonicum de la cual hablaremos a continuación.

## 2.3 Característica de Bradyrhizobium japonicum

### 2.3.1 Taxonomía

En la octava edición del Manual de Bergey's (1974) la familia Rhizobiaceae incluye dos géneros: Agrobacterium y Rhizobium. Rhizobium ubicado en la parte VII; género que incluye a todas las especies capaces de establecer una simbiosis de tipo

mutualista con las leguminosas. A nivel de especie la taxonomía de Rhizobium esta basada en la formación de nódulos con su leguminosa específica.

Especie	Planta Hospedera
<u>R. meliloti</u>	alfalfa y trébol dulce
<u>R. trifoli</u>	trébol común
<u>R. leguminosarum</u>	chicharo, haba y lenteja
<u>R. phaseoli</u>	frijol
<u>R. lupini</u>	lupino y soya
<u>R. japonicum</u>	soya
<u>R. sp.</u>	cacahuete, frijol, lima, jícama, arveja, coronada y otras especies

Los estudios de taxonomía numérica y de composición de bases del ADN demostraron la conveniencia de revisar esta clasificación. (citado en Córdoba, 1985; Hernández y Meza, 1987)

Graham (1976) (citado por Elkan, 1984 ), expuso las limitaciones de esta clasificación:

1) Infección cruzada. Los rhizobia que infectan un grupo de leguminosas pueden ser, capaces de infectar y nodular a plantas de grupos afines, observandose que en forma natural o inducida; cada especie muestra cierto grado de infección cruzada.

2) Datos insuficientes de nodulación. De las 14,000 especies conocidas solo del 8 a 9 % han sido estudiadas desde el punto de vista de nodulación y solo del 0.3 al 0.4 % se han estudiado con respecto a sus relaciones simbióticas. Por otra parte se tienen reportes de que Rhizobium puede formar asociaciones simbióticas con no leguminosas.

3) Escasez de datos bioquímicos. Muchos de los datos bioquímicos derivan de estudios de un número reducidos de cepas, lo que dificulta la generalización del significado taxonómico de diferencias bioquímicas.

Por estas razones en la novena, edición del Manual de Bergey's el género Rhizobium quedó dividido en dos géneros: Rhizobium (de crecimiento rápido) y Bradyrhizobium (de crecimiento lento); otros criterios en los que se basa esta clasificación se describen en la tabla 5. (Jordan, 1984)

Del género Bradyrhizobium la única especie que se conoce es japonicum. A continuación se describen las diferentes especies de Rhizobium, así como las leguminosas con las que se asocian estos géneros. (Jordan, 1984; FAO, 1985)

Crecimiento Rápido	Hospedero
<u>Rhizobium meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus y Trigonella</u>
<u>Rhizobium leguminosarum</u>	
biovar. <u>trifoli</u>	<u>Trifolium spp.</u>
biovar. <u>phaseoli</u>	<u>Phaseolus vulgaris y P. multifloris</u>
biovar. <u>vicia</u>	<u>Pisum, Lathyrus, Lens y Vicia</u>
<u>Rhizobium loti</u>	<u>Lupinus, Lotus, Anthyllis y Ornithopus.</u>
Crecimiento Lento	
<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	<u>Glycine max</u>
<u>Bradyrhizobium spp.</u>	
<u>Bradyrhizobium sp. (Vignia)</u>	<u>Vignia, otros géneros y especies.</u>
<u>Bradyrhizobium sp. (Lupinus)</u>	<u>Lotus pedunculatus y Lupinus sp.</u>

TABLA 5

CRITERIOS PARA DIVIDIR EL GÉNERO *Rhizobium* EN *Rhizobium* Y *Bradyrhizobium*  
(JORDAN, 1984)

CRITERIOS	GÉNEROS	
	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
1) Capacidad de nodulación en leguminosas independientemente que fije o no nitrógeno	+	+
2) Infección		
Leguminosas tropicales	-	+
Leguminosas templadas	+	-
3) Crecimiento en Extracto de Levadura Manitol Agar (ELMA)		
a) Rápido	+	-
b) Lento	-	+
4) En ELMA producen		
a) Acidez	+	-
b) Alcalinidad	-	+
5) Flagelación		
a) Peritrica	+	-
b) Subpolar	-	+
6) Carbohidratos de preferencia		
a) Pentosas	-	+
b) Hexosas	+	-
7) Porcentaje de G + C en su DNA	59 a 64	61 a 65
8) pH óptimo 6.0 a 7.0	+	+

El grupo de crecimiento rápido se caracteriza por producir enturbiamiento en medio líquido y colonias visibles en medio sólido en un período de 3 a 5 días de incubación a 28°C y el de crecimiento lento requiere de 8 a 10 días para producir desarrollo visible, tanto en medio líquido como sólido.

### 2.3.2 Característica Morfológicas.

Las bacterias del género Bradyrhizobium son bacilos Gram negativos, de 0.5 a 0.9 x 1.2 a 3.0 micras. Comúnmente pleomorfas en condiciones adversas de desarrollo. Los cultivos viejos presentan gránulos de poli-β-hidroxi-butirato. No forman esporas. Móviles mediante un flagelo polar o subpolar. Aerobias. La temperatura óptima de desarrollo es de 25 a 30°C sin embargo algunas cepas toleran temperaturas de 30 a 42°C. El pH óptimo varía de 6.0 a 7.0, aunque puede ser más bajo en cepas procedentes de suelos ácidos.

Las colonias sobre Extracto de Levadura Manitol Agar Sales Minerales, son circulares, opacas, rara vez traslúcidas, blancas raramente rosas, convexas, textura granular, no exceden de un milímetro de diámetro y es considerada como una bacteria de crecimiento lento, porque su desarrollo se observa después de 5 a 7 días de incubación a 28°C.

Son quimiorganotróficas, utilizando como fuente de carbono diversos carbohidratos como: la glucosa, galactosa, gluconato, glicerol, fructuosa, arabinosa y manitol; así como las sales de ácidos orgánicos como: fumárico, málico, succínico, cítrico y pirúvico.

Como fuente de nitrógeno utilizan preferentemente sales de amonio. aunque también emplean nitratos y algunos aminoácidos como: glutamato, histidina, aspartato y prolina. (Jordan, 1984)

### 2.3.3 Características Asociativas

Bradyrhizobium es un microorganismo caracterizado por invadir los pelos radiculares de plantas leguminosas de zonas tropicales y algunas templadas; formando nódulos en la raíz, en las cuales la bacteria se encuentra como simbionte intracelular. Todas las cepas presentan un rango de afinidad con su huésped a lo que se le denomina "especificidad de hospedero". Las bacterias presentes en los nódulos radiculares presentan formas pleomorfas (bacteroides), que son responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico, transformándolo a una forma combinada (amonio) utilizable por la planta hospedera. (Jordan, 1984)

### 2.3.4 Proceso de Infección y Formación de Nódulos

En la infección y desarrollo de los nódulos se han descrito las siguientes etapas:

"Estimulación de la multiplicación de las bacterias en la rizosfera". Numerosos autores han reportado que las plantas secretan gran cantidad de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos al suelo, estas sustancias al acumularse en zonas cercanas a la raíz estimulan la multiplicación de los microorganismos como los rhizobia. (Hernández y Meza, 1987; Monterrubio, 1987)

"Reconocimiento superficial de los simbioses" Dazzo (1981) menciona que el reconocimiento entre la bacteria y el hospedero es determinado por la lectinas de las leguminosas y diferentes polisacáridos de la superficie del Rhizobium específico.

Currier y Strobel (1977) (citados por Hernández y Meza, 1987) caracterizaron a las glicoproteínas o lectinas, atribuyendo a estas sustancias la especificidad del hospedero.

Sharon y Lis (1972) (citados por Hernández y Meza, 1987; Monterrubio, 1987) afirmaron que las lectinas del hospedero se enlazan a los polisacáridos presentes en la superficie de la bacteria, indicando que esta combinación se realiza de manera análoga a la reacción antígeno-anticuerpo donde parte de la molécula de los polisacáridos bacterianos actúan como receptores variables.

Bhuvanesivare (1977) y Mort Bover (1978) (citados por Peres y Vidor, 1980) atribuyen como sitio receptor en Rhizobium japonicum a la hexosa D- galactosa.

"Penetración de las bacterias a las raíces" las bacterias penetran por la pared celular del pelo radicular y forman un tubo de infección.

Varios autores han propuesto diferentes teorías:

Nutman (1956) (citado por Hernández y Meza, 1987) propuso la teoría de infección por invaginación de la pared celular. En este caso el crecimiento activo de la pared celular es reorientado desde la punta del pelo radicular hacia el punto de infección y el pelo radicular sigue creciendo hacia adentro de si mismo. La dificultad de este mecanismo es que debe formarse un poro o apertura que no se ha podido observar en cortes al microscopio electrónico.

Fahraeus y Shalman (1977) (citados por Hernández y Meza, 1987) mencionan la presencia de un polisacárido extracelular bacteriano, que induce una mayor actividad de la enzima poligalactouronasa producida por la planta, la que ocasiona el ablandamiento de la pared celular radicular facilitando la penetración de la bacteria. Una vez que la bacteria penetra hasta la membrana del pelo radicular, se inicia la formación de un hilo de infección . Estos autores relacionan la capacidad del polisacárido bacteriano para aumentar la

actividad enzimática de la planta con la especificidad de la bacteria por la planta.

"Formación del nódulo", los tubos o filamentos de infección se desplazan hacia las células corticales de la raíz donde las bacterias son liberadas, provocando luego un hinchamiento y la división de las células; dando como resultado la formación de un nódulo constituido por una densa masa de células infectadas por la bacteria simbiote. (Brill, 1977 y 1981)

Las diferencias de tiempo en que aparecen los primeros nódulos así como el número de ellos sobre la raíz son regulados por el hospedero; también la nodulación puede verse afectada por los factores del medio ambiente.

Las bacterias dentro del nódulo se transforman en bacteroides que corresponden a la forma simbiótica de las bacterias, estas se alojan en las células del tejido nodular formando hasta el 30% de la materia seca. La fijación de nitrógeno se inicia cuando ocurre esta transformación.

En los bacteroides se encuentra la enzima nitrogenasa que es la responsable de la fijación de nitrógeno.

El amoníaco producido por las bacterias se combina con compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis de la planta, para producir aminoácidos que se van incorporando a las proteínas vegetales.

Una particularidad de la nitrogenasa es que los dos componentes proteicos de la enzima se desnaturalizan por el contacto con el oxígeno. En la relación simbiótica entre Rhizobium-leguminosa, el oxígeno es atrapado antes que alcance a las bacterias, por una proteína que se enlaza con

el, la leghemoglobina, que es sintetizada en el tejido vegetal de los nódulos. (Brill. 1977)

El que se establezca una relación simbiótica entre la bacteria y la leguminosa no asegura que la Fijación de Nitrógeno se lleve a cabo, porque una simbiosis eficiente está regulada por la interacción de características genéticas de la bacteria y de la leguminosa, así como de la influencia que pueden ejercer los factores ambientales.

Los aspectos más estudiados en esta simbiosis corresponden: con respecto a la bacteria: infectividad, efectividad, capacidad competitiva y capacidad de sobrevivencia en el suelo; con respecto a la interacción bacteria-leguminosa: la interespecificidad y su respuesta a los factores ambientales tales como, contenido de nutrimentos, pH, temperatura del suelo, etc.

### 2.3.5 Factores Ambientales que Afectan la Fijación Biológica del Nitrógeno

**Temperatura** - las temperaturas óptimas para el buen desarrollo y máximo rendimiento de la soya corresponden a: temperaturas diurnas entre 25°C y 30°C y nocturnas entre 18°C y 25°C; aunque algunas variedades pueden tolerar temperaturas hasta de 4°C durante el desarrollo vegetativo.

La temperatura mínima, máxima y óptima para la germinación son: 5°C, 40°C y 30°C respectivamente. En condiciones de campo la temperatura mínima del suelo para la germinación es de 10°C aunque la emergencia es muy lenta (más de 15 días); la temperatura óptima es entre los 18°C y 20°C, germinando en menos de una semana, y a temperaturas mayores de 35°C, disminuyendo el vigor y el poder germinativo de la semilla. La floración también se ve influenciada por la temperatura, el inicio de la floración es inhibido a temperaturas por

debajo de los 10°C y el rango óptimo tanto para la fase vegetativa como reproductiva es de 26°C a 28°C; valores superiores a los 32°C provocan desprendimiento de flores y vainas, especialmente en condiciones de estrés hídrico. (Venturi y Amaducci, 1988)

La temperatura óptima para el período de madurez es de 20°C a 33°C. (Yepez, 1988)

El efecto de la temperatura en la raíz es complejo ya que puede variar dependiendo de la planta hospedera así como de la cepa de Rhizobium..

Las temperaturas elevadas afectan los siguientes aspectos de la interacción Rhizobium-Leguminosa.

- 1) El desarrollo y sobrevivencia de los rhizobia en la rizosfera.
- 2) La formación de pelos radiculares.
- 3) La unión de rhizobios a las células de los pelos de la raíz.
- 4) La formación los hilos de infección.
- 5) La estructura, desarrollo y crecimiento de los nódulos.
- 6) El contenido de leghemoglobina de los nódulos.
- 7) La actividad de la enzima nitrogenasa.
- 8) Y consecuentemente el contenido de nitrógeno y producción de materia seca de la planta nodulada. (Munérva y Wollum, 1981)

Las temperaturas elevadas son, las causantes de la disminución del número y peso de los nódulos formados, de la actividad de la nitrogenasa del contenido de nitrógeno y de la producción de materia seca en la soya. (Munérva y Wollum, 1981)

La temperatura óptima para varias especies de Rhizobium se encuentra en el rango de 25°C a 35°C. Reportandose 27°C como la mejor temperatura tanto para la soya como para la nódulación y la Fijación Biológica de Nitrógeno. (Norris y Date, 1976)

Humedad - la germinación es la etapa más crítica en los requerimientos de humedad, ya que una sequía prolongada o una humedad excesiva son perjudiciales. Pero iniciado el crecimiento tolera períodos cortos de sequía y un período lluvioso no perjudica ni su crecimiento, ni su rendimiento. (Crispín y Barriga, 1990)

En la fase vegetativa el déficit hídrico provoca la reducción del número de hojas y el diámetro y altura del tallo, así como del crecimiento de la planta, hasta reducir la fotosíntesis y fijación de nitrógeno.

El déficit hídrico durante la floración provoca el aborto de flores y vainas jóvenes, pero si este déficit es corto y sólo afecta las fases iniciales, puede tener un período de floración largo y con ello formar mayor número de flores.

Cuando el suelo sufre deficiencias de humedad el rendimiento de la soya es afectado en el momento del llenado de las vainas, lo cual lleva a la pérdida de estas y en la fase final da lugar a la reducción del tamaño de las semillas. Asimismo el contenido reducido o excesivo de humedad afecta la sobrevivencia de la población rhizobiana. (Venturi y Amaducci, 1988)

La textura del suelo esta muy relacionada con la humedad, ya que la textura influye en la infiltración, permeabilidad, capacidad de retención y disponibilidad del agua. La sobrevivencia rhizobiana es mayor en suelos con bajo potencial de agua como en suelos migajón franco arenoso, franco limoso y franco arcillo arenoso, en tanto que en arenosos o franco arcillosos la población rhizobiana disminuye. (Eaglesham y Ayanaba, 1984)

No obstante Corzart (1982) y Weaber (1972) (citados por Monterrubio, 1987) reportan una buena sobrevivencia Bradyrhizobium japonicum en suelos arcillosos pH 6.0.

La soya crece en suelos desde arcillosos hasta ligeramente arenosos, teniendo su óptimo desarrollo en suelos francos y arcillo arenosos. (Yepez, 1988; Hernández y Meza, 1987)

Luminosidad - la duración del día e intensidad de la luz afecta el desarrollo de la planta y también en el número de nódulos; generalmente el peso de los nódulos aumenta con el incremento de la intensidad de la luz y días largos, y por el contrario la falta de luz tiende a disminuir el peso de los nódulos. (Monterrubio, 1987; Norris y Date, 1976)

EL pH - el pH adecuado del suelo tanto para el desarrollo de la soya como para el crecimiento de Bradyrhizobium japonicum esta entre 6.0 y 6.5, ya que por debajo de este se afecta el crecimiento de la planta y a las bacterias fijadoras de nitrógeno, en tanto que se han obtenido buenos resultados a pH entre 8.0 y 8.5. (Alexander, 1980; Venturi y Amaducci, 1988; Crispín y Barriga, 1990)

En suelos demasiado alcalinos, puede desarrollarse una clorosis generalizada en todo el follaje, que se controla mediante la aplicación foliar de solución de sulfato ferroso; este problema esta sujeto a la variedad ya que como se

menciona anteriormente hay variedades que han dado buenos resultados en pH de 8.0 y 8.5. (Crispín y Barriga, 1990)

Los suelos ácidos pueden reducir el desarrollo y rendimiento de la planta, por el incremento en el suelo de la concentración de hierro, aluminio y manganeso a niveles tóxicos, disminuyendo la disponibilidad de calcio, magnesio y molibdeno, afectando adversamente la nodulación y fijación de nitrógeno. (Board y Caldwell, 1991)

Andrew (1978) (citado por Monterrubio, 1987) encontró que las leguminosas tropicales son más tolerantes a la acidez que las de regiones templadas, por que son eficientes para extraer el calcio.

La acidez también afecta el encurvamiento de los pelos radiculares de la planta lo que impide la infección.

Los niveles óptimos de pH para el desarrollo son del orden de 6.8 a 7.2 para la rhizobia del trébol; 7.0 a 7.5 para la rhizobia del alfalfa y de 5.8 a 6.2 para la rhizobia de lupinos, lotus y leguminosas tropicales. (Norris y Date, 1976)

#### Elementos Químicos:

Nitrógeno - las necesidades de nitrógeno en el cultivo de la soya son muy elevadas especialmente las dos semanas que proceden a la floración.

La planta es capaz de proveer sus propias necesidades de nitrógeno utilizando las dotaciones que el suelo le ofrece o a través del nitrógeno fijado simbióticamente; por lo que la soya inoculada no necesita de la aportación de fertilizantes nitrogenados (Venturi y Amaducci, 1988); no obstante Harper (1974) y Senaratne *et al.*, (1987), indican que esta

leguminosa sólo obtiene de 20% a 65% de su nitrógeno a través del proceso de fijación, por lo que algunos autores recomiendan efectuar la fertilización. El efecto de este tratamiento sobre la asociación Bradyrhizobium japonicum-Soya se analiza posteriormente.

Fósforo - la soya absorbe fósforo durante todo su ciclo de crecimiento; el período de mayor demanda se inicia poco antes de que las vainas comiencen a formarse, continúa hasta aproximadamente 10 días antes que las semillas se hayan desarrollado por completo. Pueden aparecer efectos de carencia en las primeras fases de crecimiento, cuando el sistema radicular está todavía poco desarrollado. Una disponibilidad adecuada de fósforo en el período de formación de la semilla influye positivamente en la producción y en el contenido proteico. (Venturi y Amaducci, 1988; Scott y Aldrich, 1975)

Gran parte del fósforo que necesita la soya es absorbido y transportado después desde las hojas, tallos y peciolas a la semilla. (Scott y Aldrich, 1975)

El fósforo también puede tener efectos indirectos sobre la nodulación, habiéndose comprobado que una suficiente disponibilidad de fósforo favorece la formación y actividad de nódulos lo que se traduce en mayor fijación de nitrógeno, especialmente en la presencia de una adecuada pero no excesiva dotación de calcio en el suelo (caliza activa menor del 15%). (Venturi y Amaducci, 1988)

Muchos de los suelos tropicales son pobres en fósforo disponible, lo que hace necesario la fertilización fosfatada, habiendo respuestas altamente significativas, las que se manifiestan en el aumento en el número de nódulos, de masa nodular, de la eficiencia en la fijación de nitrógeno y por

lo tanto en el contenido de nitrógeno en las plantas y en el rendimiento total. (Monterrubio, 1987; Norris y Date, 1976)

Potasio - la soya necesita cantidades relativamente grandes de potasio, ya que entre los cultivos de grano es una consumidora fuerte de potasio, por que la semilla contiene una cantidad elevada de este elemento. (Scott y Aldrich, 1975)

La absorción de potasio asciende al máximo durante el período de rápido crecimiento vegetativo y después decrece cuando empiezan a formarse las semillas, finalizando de 15 a 20 días antes de que maduren; al llegar a la maduración la semilla de soya contiene el 60% del potasio de la planta. (Venturi y Amaducci, 1988)

Calcio - el calcio además de ser un elemento esencial para la planta, es necesario para el proceso simbiótico de la fijación de nitrógeno. Por lo que las deficiencias de calcio pueden disminuir la cantidad de nitrógeno fijado alterando el desarrollo de la planta hospedera, la que presenta un aspecto típico de carencia de nitrógeno. Cuando las deficiencias son mínimas, el efecto directo es sobre la simbiosis interfiriendo en el encurvamiento del pelo radicular. (Bowen y Kratky, 1982; Alexander, 1980)

En terrenos con pH inferior a 6.0 (ácidos) el calcio facilita la absorción por la planta de fósforo y potasio. (Venturi y Amaducci, 1988)

Si el pH del suelo es de 6.0 o más, es improbable que se presenten deficiencias de calcio en la soya. (Scott y Aldrich, 1975)

Magnesio - la soya no es muy sensible a una deficiencia de magnesio.

La absorción del magnesio por la soya puede reducirse por fuertes aplicaciones de potasio ó por la presencia de un alto nivel de potasio en el suelo. (Scott y y Aldrich, 1975)

El magnesio es esencial para la fijación de nitrógeno y puede tener efectos directos sobre la misma o indirectos a través de un incremento en la fotosíntesis y del crecimiento de la planta. (Venturi y Amaducci, 1988)

Azufre - son escasos los informes sobre deficiencia de azufre en la soya. La deficiencia de azufre produce en las leguminosas síntomas parecidos a la deficiencia de nitrógeno. Tales como achaparramiento de la planta y follaje con un color que va de verde pálido al amarillo (Scott y Aldrich, 1975; Norris y Date, 1976). Asimismo la deficiencia de este elemento provoca disminución en el número, tamaño y peso de los nódulos. Influye negativamente en la fijación de nitrógeno y en la calidad del producto, puesto que un bajo contenido de metionina (de la que el azufre es un componente importante) constituye un factor que limita el valor alimenticio de la soya. (Venturi y Amaducci, 1988; Norris y Date, 1976)

La soya es más sensible a las deficiencias de micronutrientes que otras plantas cultivadas.

Cobre - la escasez de cobre esta relacionada con la abundancia de materia orgánica que lo retiene bajo una forma no aprovechable.

También se han observado escasez de cobre en suelos ácidos, muy lixiviados y arenosos y en suelos calcáreos. (Scott y Aldrich, 1975)

Fierro - este micronutriente, en el suelo es utilizado tanto por los microorganismos, como por los vegetales. Forma parte

de las dos proteínas que constituyen la nitrogenasa. En condiciones de pH ácido el fierro forma parte de la solución del suelo causando toxicidad la que se refleja en el bajo rendimiento de la cosecha de leguminosas. (Hernández y Meza, 1987)

La soya puede superar los síntomas tempranos de la deficiencia de fierro, pero habrá disminución en el rendimiento; en situaciones extremas algunas variedades quedan achaparradas y amarillas, y por el contrario otras variedades crecen normalmente. (Scott y Aldrich, 1975)

Para corregir las deficiencias de fierro se aconseja la aspersión foliar con quelatos de fierro o sulfato férrico (0.5% a 1.0%). (Venturi y Amaducci, 1988; Scott y Aldrich, 1975)

Molibdeno - el molibdeno es un elemento indispensable para los microorganismos fijadores de nitrógeno debido a que forma parte de una de las proteínas de la nitrogenasa. (Venturi y Amaducci, 1988)

Para las leguminosas, la deficiencia de este elemento provoca la formación de nódulos inefectivos en la fijación de nitrógeno.

En los suelos muy ácidos y ácidos la utilización de molibdeno por la planta es mínimo, por lo que en este caso es recomendable un tratamiento de la semilla con molibdato de sodio y molibdato de amonio. (Venturi y Amaducci, 1988; Scott y Aldrich, 1975). También se recomienda agregar cal para elevar el pH y hacer disponible el molibdeno.

Síntomas extremos de deficiencia de molibdeno en suelos ácidos son más probables en trébol y alfalfa que en especies tropicales. (Norris y Date, 1976; Alexander, 1980)

Boro - no se ha comprobado sobre terreno ninguna deficiencia de boro en la soya. (Scott y Aldrich, 1975)

Manganeso - el manganeso puede ser deficitario o presentarse en cantidades tóxicas. La escasez del manganeso es la más común de las deficiencias de micronutrientes en la soya. (Scott y Aldrich, 1975)

La deficiencia de manganeso provoca el achaparramiento de las plantas; las hojas toman un color entre amarillo y blanuzco, pero las nervaduras se conservan verdes.

Las deficiencias moderadas de manganeso pueden corregirse con aplicaciones de fertilizantes fosfatados. También se pueden aplicar tratamientos foliares de sulfato de manganeso. (Scott y Aldrich, 1975; Venturi y Amaducci, 1988)

La toxicidad se corrige encalando los suelos minerales hasta llegar a un pH 6.0 o más y los suelos orgánicos hasta un pH de por lo menos de 5.5. (Scott y Aldrich, 1975)

El exceso de manganeso reduce la nodulación y la eficiencia del molibdeno en la fijación de nitrógeno. Afortunadamente, muchas leguminosas tropicales poseen una alta tolerancia al exceso de manganeso. Por otra parte para minimizar este problema se pueden cultivar especies tolerantes al manganeso y en casos extremos añadir además pequeñas cantidades de cal. (Norris y Date, 1976)

Zinc - la soya con deficiencias de zinc crecen achaparradas; las hojas son de color amarillo o verde claro, las hojas inferiores se pueden volver de color castaño y caer; las flores escasean; las pocas vainas que se forman son anormales y de maduración lenta. Si la deficiencia es leve, el crecimiento es precoz, atrofiado y las plantas son de color verde muy claro o cloróticas. (Scott y Aldrich, 1975)

En suelos pobres en zinc se recomienda aplicarlo al suelo o dar tratamientos foliares en forma orgánica, como quelato o como sulfato de zinc. (Venturi y Amaducci, 1975)

Cobalto - el cobalto es un componente de la vitamina B<sub>12</sub> y este elemento se encuentra en los nódulos. Los rhizobias en cultivo también necesitan cobalto para crecer y sus células poseen compuestos que contienen vitamina B<sub>12</sub>, lo que sugiere que la estimulación de la fijación por el cobalto se refleja simplemente en el aumento en la proliferación y metabolismo del simbionte dentro de la raíz.

La adición de cobalto en suelos deficientes de este elemento favorece y aumenta el crecimiento de la leguminosa y la asimilación de nitrógeno. (Norris y Date, 1976; Alexander, 1980)

Aluminio - en muchos de los suelos tropicales altamente ácidos con pH de alrededor de 4.5 o menos el aluminio es tóxico, por lo que la raíz de la planta es dañada, afectando su desarrollo terminal, lo que restringe severamente la nodulación.

Las leguminosas difieren grandemente en su tolerancia al aluminio, en general las especies tropicales son más tolerantes que las especies de zonas templadas. (Norris y Date, 1976)

#### 2.4 Efecto del Nitrógeno en la interacción Rhizobium-Leguminosa

Como se describió anteriormente el éxito de la interacción Rhizobium-Leguminosa es afectado por varios factores ambientales, tales como: temperatura, pH, humedad, luz, etc.; así como por la compatibilidad genética entre la planta hospedera y la cepa de Rhizobium. Otro factor muy importante,

es la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, aspecto sobre el que se profundiza en este trabajo.

En condiciones favorables, los nódulos se forman dentro de la semana siguiente a la germinación de la semilla, pero la fijación del nitrógeno se inicia hasta dos semanas después. Por lo que en suelos escasamente dotados de nitrógeno, es conveniente aportar nitrógeno antes de la siembra, y cubrir las exigencias de la planta en su fase temprana, cuando todavía no se ha iniciado la fijación de nitrógeno; cantidades reducidas de nitrógeno parecen no dañar sino más bien favorecer la actividad de las bacterias. (Venturi y Amaducci, 1988; Scott y Aldrich, 1975)

Mucho se ha discutido sobre el efecto inhibitorio que tiene la presencia de altos niveles de nitrógeno (principalmente nitratos) en la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Numerosos reportes indican que los nitratos repercuten en la reducción de: los sitios de infección en los pelos de la raíz (Munns, 1968; Dazzo y Brill, 1978; Munns, 1977); unión con la lectina (Dazzo et al., 1985); número de nódulos (Dart y Mercer, 1965); masa nodular (Summerfield et al., 1977); la actividad de la fijación de nitrógeno en los nódulos de la raíz (Gibson, 1974; Smith y Hume, 1985; La Favre y Eaglesham, 1987; Senaratne et al., 1987) y la cantidad total de nitrógeno fijado (Allos y Barthalomew, 1959) (citados por Eaglesham et al., 1983; Kucey et al., 1989; Martensson et al., 1989).

Por lo que normalmente no se recomienda la fertilización en las leguminosas inoculadas, puesto que, éstas en condiciones favorables, son capaces de desarrollarse bien con el nitrógeno derivado del suelo y de la fijación simbiótica. No obstante, cuando el suelo es pobre en nitrógeno, se recomienda la adición de pequeñas dosis de fertilizante mineral, las que abastecen las necesidades de las plantas en

el período temprano de desarrollo; este pequeño suplemento de nitrógeno es considerado, como una dosis de arranque, que no sólo estimula el desarrollo de la leguminosa, sino también, acelera la formación de nódulos y la iniciación de la fijación de nitrógeno; ya que cuando el nitrógeno se agota, la planta entra en una fase de deficiencia de nitrógeno, período en el que se forman abundantes nódulos para compensar la deficiencia de nitrógeno del suelo, lo que favorece el adecuado suplemento de nitrógeno a través de la simbiosis. (Eaglesham et al., 1983; Hardarson et al., 1984; Herridge et al., 1984; Mc.Neil, 1982; Kucey et al., 1989)

Algunos investigadores consideran que el efecto inhibitorio del nitrógeno sobre la nodulación es mediado, probablemente, por las características de la planta hospedera. (Herridge y Betts, 1988; Martensson et al., 1989)

Cada género de leguminosa tiene diferentes necesidades de nitrógeno para su desarrollo. Asimismo, la sensibilidad o tolerancia al nitrógeno por la cepa de Rhizobium correspondiente, también es diferente.

La soya (Glycine max (L.) Merrill); leguminosa de interés en este estudio, aún cuando establezca asociaciones eficientes con Bradyrhizobium japonicum sólo obtiene del 25 al 60% de su nitrógeno total, a través del proceso de fijación biológica, y el otro porcentaje lo obtiene del suelo, en tanto que otras leguminosas, como el haba, el chícharo y el chícharo de vaca satisfacen del 80 al 90% de sus necesidades de nitrógeno a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno. Lo anterior indica que para obtener rendimientos óptimos de la soya es necesario agregar fertilizante nitrogenado. (Harper, 1974; Senaratne et al., 1987)

Considerando lo anterior, es de gran importancia establecer las dosis adecuadas de nitrógeno que deben agregarse a fin de

asegurar el abastecimiento de nitrógeno mineral para este tipo de cultivo y que al mismo tiempo permitan la nodulación y fijación de nitrógeno, por lo que a continuación se presenta un resumen de algunos estudios realizados con objeto de determinar el efecto que tiene la adición de nitrógeno mineral en el desarrollo de la soya y sobre el sistema simbiótico Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merrill. Estos estudios incluyen experimentos realizados a nivel invernadero en sistemas hidropónicos y aquellos efectuados en campo. En los primeros la concentración de nitratos fue controlada, en tanto que los segundos aportan información real sobre el comportamiento de la asociación en condiciones naturales. En ambos, los tratamientos testigo corresponden a aquellos en los que únicamente se emplean los inoculantes, resultados que se comparan con los tratamientos inoculados y fertilizados. En general se observa que en los ensayos conducidos a nivel invernadero se han empleado diversas variedades de soya, diferentes cepas de B. japonicum y diferentes concentraciones de nitrógeno que se adicionarán en forma de nitratos; la aplicación de nitrógeno mineral la hicieron en tres formas: una sólo aplicación al inicio del experimento (concentración que se agota a través del desarrollo del cultivo); varias aplicaciones para mantener la concentración deseada a través de todo el experimento (concentración sostenida); o bien dos aplicaciones en dos períodos del desarrollo del cultivo.

Para determinar el efecto del nitrógeno mineral sobre la simbiosis, evalúan el tiempo al que aparecen los primeros nódulos, el número de nódulos, la actividad de la nitrogenasa por el método de reducción de acetileno, o el peso seco de la parte aérea y de la raíz y en ocasiones el peso seco de grano.

Respecto a los experimentos de campo se observa que se han empleado suelos con contenidos variables de nitrógeno y al

igual que en los cultivos hidropónicos se han hecho ensayos en diversas variedades o genotipos de soya, diferentes cepas de *B. japonicum* y concentraciones variables de fertilizante, el que se agrega en diferentes formas de nitrógeno. Los parámetros que emplean incluyen: número de nódulos, masa nodular, rendimiento de materia seca y de grano, nitrógeno total por planta; en algunos estudios se determinó el contenido de ureidos en el xilema y en algunos otros se hizo el seguimiento del nitrógeno mineral absorbido mediante el empleo de fertilizante marcado ( $N^{15}$ ) a fin de determinar en el nitrógeno total de la planta, la cantidad procedente del suelo y aquella derivada de la fijación biológica del nitrógeno

En las tablas de la 6 a la 8 se expone un resumen de los principales resultados obtenidos por diferentes investigadores y posteriormente se discuten los resultados y las conclusiones generados por estos.

#### 2.4.1 Experimentos en Cultivos Hidropónicos.

Los resultados obtenidos por Harper (1974), Tabla 6, indican que la actividad de la nitrato reductasa está estrechamente relacionada con la concentración de nitratos existentes en el medio; que la actividad de la nitrogenasa varía con la concentración de estos, siendo fuertemente inhibida por concentraciones elevadas de nitratos, tratamientos en los que se reporta la menor cantidad de acetileno reducido; en tanto que las concentraciones bajas (0.75mM) agregadas en la emergencia y en la floración, favorecieron la actividad de la nitrogenasa, lo que se tradujo en valores de acetileno reducido más elevados que los obtenidos en los tratamientos testigo o en aquellos en los que se agregó en una sóla etapa de desarrollo.

## TABLA 6

EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE NITRÓGENO SOBRE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO Y RENDIMIENTO DE SOYA.  
EXPERIMENTO REALIZADO EN CULTIVO HIDROPÓNICO (HARPER, 1974)

VARIEDAD DE SOYA	CEPA	DOSIS DE NITRÓGENO mM		ACTIVIDAD A LAS 10 SEMANAS DE:		PESO SECO g/planta	N TOTAL g/planta
		INICIAL	FLORACIÓN	NITRATO REDUCTASA micro moles NO <sub>2</sub> /planta/hr	NITROGENASA micro moles N <sub>2</sub> /planta/hr		
CALLAND	NITRAGÍN	0.00	0.00	2.2	10.9	7.2	0.48
		0.00	0.75	2.7	14.1	9.6 *	0.63
		0.00	7.50	43.1	1.3	11.9	0.81
		0.75	0.75	3.2	20.5	11.2 *	0.73
		0.75	0.00	2.8	4.2	8.9 *	0.59
		0.75	7.50	32.8	1.1	15.0	1.09
		7.50	7.50	30.2	0.0	12.9	0.93
		7.50	0.75	6.8	5.1	14.2	0.92

\* Tratamientos con dosis reducidas de Nitrógeno

Este autor concluye que la soya es capaz de desarrollarse y producir grano a partir del nitrógeno obtenido a través del proceso de fijación biológica, pero la producción óptima se obtiene cuando las plantas disponen de otras fuentes de nitrógeno como lo demuestran los resultados de materia seca obtenidos en los tratamientos en los que se agregaron dosis reducidas de nitrógeno (\* , tabla 6) las que fueron superiores a los obtenidos en plantas enteramente dependientes del nitrógeno atmosférico. Asimismo señala que la soya es capaz de responder a la fertilización nitrogenada durante la floración no obstante, que esta respuesta bajo condiciones de campo depende del contenido de humedad en el suelo que favorece o limita la disponibilidad de los nutrimentos. Esta información apoya la hipótesis de que las plantas inoculadas y desarrolladas en concentraciones bajas de nitratos son más vigorosas que aquellas que se desarrollan únicamente a partir del nitrógeno atmosférico y que para obtener los rendimientos máximos en soya, es conveniente que las plantas cuenten con ambos sistemas de utilización de nitrógeno.

El mismo Harper en colaboración con Gibson, evaluó el efecto de concentraciones variables de nitratos, estas fueron aplicadas al inicio del experimento o a través de todo el ensayo, a fin de mantener la concentración de nitrógeno constante. Asimismo evaluaron el comportamiento de diferentes cepas de *B. japonicum* y diferentes variedades de soya. Los resultados de estos trabajos (Tabla 7), indican que la presencia de nitratos ocasionó un retraso en la formación y aparición de nódulos, que este retraso es mayor con las concentraciones más altas probadas. Observaron que cuando la adición de nitratos se hizo únicamente al inicio del experimento, la desaparición de estos de la solución coincidió con la aparición de los nódulos (7 días para la concentración 1.0mM y 11 días para la concentración 4.0mM en el primer experimento) (Harper y Gibson, 1984). Este efecto fue confirmado en el siguiente ensayo (Gibson y Harper,

# TABLA 7

EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO MINERAL SOBRE LA ASOCIACIÓN *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max*  
(EXPERIMENTOS REALIZADOS EN CULTIVOS HIDROPONICOS)

VARIEDAD	CEPA	CONCENTRACIÓN DE NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mM	TIEMPO DE INICIO DE LA NODULACIÓN DÍAS	NÚMERO DE NODULOS 12 DÍAS	REDUCCIÓN DE ACETILENO nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /planta/seg.	% DE INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD DE NITROGENASA	PESO SECO PARTE AEREA mg/planta	REFERENCIA
Williams	USDA 110	0.0	5.0		3.00		446	Harper y Gibson, 1964
		1.0*	7.0		0.70	(77)	764	
		4.0*	11.0		0.06	(96)	1117	
Williams	USDA 110	0.0	6.0	> 40	1.43		375	Gibson y Harper, 1965
		0.5**	9.3	11	0.03	(97)	725	
		1.0**	11.3	3	0.00	(100)	781	
		1.0*	8.8	29	0.33	(77)	596	
		2.0*	12.0	3	0.02	(96)	695	
		4.0*	-	-	0.00	(100)	770	
Williams	USDA 110	0.0	6.0		3.55			Gibson y Harper, 1965
		1.0**	8.9		0.56	96		
	USDA 127	0.0	6.3		1.44			
		1.0**	10.2		0.03	98		
Avoyelles	USDA 110	0.0	8.3		2.78			Gibson y Harper, 1965
		1.0**	7.5		1.39	50		
Eli	USDA 110	0.0	6.9		3.50			
		1.0**	7.8		2.44	34		
Dickie	USDA 110	0.0	6.3		2.03			
		1.0**	11.6		0.03	98.5		

\* Concentración al inicio del experimento que no fué restituida

\*\* Concentración que se mantuvo constante durante todo el experimento

( ) Datos calculados

1985), en el que al no permitir que se agotara el nitrógeno (concentración 1.0mM), el tiempo del inicio de la nodulación aumento de 8.8 a 11.3 días. El aumento de la concentración de nitratos repercutió en una significativa disminución en el número de nódulos y en la actividad de la nitrogenasa.

Por otra parte comprobaron que las diferentes cepas de B. japonicum y variedades de soya, varían en su respuesta a la presencia de nitratos y que estas variaciones son más marcadas en las variedades de soya que en las diferentes cepas de B. japonicum Gibson y Harper (1985), indican que de 46 cepas estudiadas en asociación con la variedad de soya Williams, 5 resultaron tolerantes a los nitratos (ejemp: USDA110) y tres extremadamente sensibles (ejemp: USDA127), lo que se tradujo en la inhibición de la actividad de la nitrogenasa en valores de alrededor de 85% para las cepas tolerantes y 98% para las cepas sensibles. Respecto a las variedades de soya, probaron 23 y observaron que en ausencia de nitratos todas nodularon prontamente (6 días), en tanto que en presencia de 1.0mM de nitratos, la nodulación fue retardada de 1 hasta 6 días. Estas variaciones fueron más evidentes en la actividad de la nitrogenasa, registrándose del 34 al 98% de inhibición.

Mc.Neil (1982), trabajando con la variedad de soya Davis y 16 cepas de B. japonicum, obtuvo resultados similares a los antes expuestos. Este autor indica que la respuesta a la presencia de nitratos varía con las diferentes cepas y con las concentraciones de nitratos, como lo demuestran los tiempos de inicio de la nodulación registrados. En presencia de 1.5mM de nitratos, dos de las cepas en estudio (CB1809 y Nit61A18) formaron nódulos a los 10 días, en tanto que para las otras cepas el tiempo de inicio de la nodulación fue entre los 11 y 16 días. Asimismo observó que la cepa CB1809 en presencia de 0.5 mM de nitratos dio lugar a un aumento en la masa nodular de 30% con respecto al tratamiento testigo;

en tanto que en presencia de 2.0 mM mantuvo constante este parámetro, mientras que en 6 de las cepas probadas los valores de masa nodular fueron menores a los obtenidos en el testigo.

Este autor indica que la concentración de nitratos también influye en la competitividad de las cepas y que la cepa CB1809 parece no ser afectada por las dosis crecientes de nitratos empleadas (0, 0.5, 2.0 y 10 mM), en tanto que cuando empleo a la cepa USDA110, el número de nódulos ocupados por la misma fue notablemente reducido. Cuando en el medio existen niveles altos de nitratos, este efecto fue particularmente evidente cuando esta cepa se inoculó en la variedad P.I.171444, en donde el porcentaje de nódulos paso de 25% (concentración 0 mM) a 6% (0.5 y 1.0 mM) y a 0% (concentración 10 mM); lo que indica que la efectividad y la competitividad de las cepas son alteradas por la adición de nitratos externos.

Harper y Gibson (1984) en apoyo a los estudios que efectuaron exponen una excelente revisión sobre los reportes generados respecto al efecto de los nitratos en la asociación Rhizobium-Leguminosa, en esta se indica que la presencia de nitratos inhibe la asociación en tres fases:

- infección del pelo radicular,
- desarrollo del nódulo y
- función del nódulo (por lo que la actividad de la nitrogenasa es abatida).

Para explicar la inhibición de la infección se han propuesto dos mecanismos:

- Destrucción del ácido indol acético, reacción que es acelerada por la presencia de nitritos.
- Disminución en la producción de lectina por la raíz, así como de los puntos receptores en el pelo radicular (lo que disminuye la unión entre rhizobia y los pelos de la raíz).

En relación al desarrollo del nódulo y la actividad de la nitrogenasa se ha expuesto que la presencia de nitratos disminuye la disponibilidad de fotosintatos en los nódulos, debido a que estos son previamente utilizados en la asimilación de nitratos.

Otro autores indican que la actividad de la nitrogenasa es bloqueada por la acumulación de nitritos que se producen vía nitrato reductasa, proceso que es efectuado por la bacteria y por el hospedero. Aún cuando se ha logrado abatir la concentración de nitritos en el sistema mediante la inoculación con cepas mutantes deficientes en nitrato reductasa, los nitritos formados por el hospedero pueden atravesar la membrana que rodea a los bacteroides y afectar directamente a la nitrogenasa, concluyendo que aún cuando la asimilación de nitratos por la planta y las transformaciones de estos pueden afectar el desarrollo y función del nódulo, el efecto directo de los nitratos tiene lugar en el proceso de infección, aspectos que fueron confirmados en los estudios analizados, de los que podemos resumir:

- La aplicación de nitratos retarda el inicio de la nodulación.
- La aparición del primer nódulo, coincide con el agotamiento de nitratos en la solución nutritiva.
- La presencia constante de nitratos en el medio inhibe parcial o totalmente la nodulación, lo que depende de la concentración de nitrógeno existente.
- El suplemento de nitratos reduce el desarrollo y función de los nódulos.
- El efecto del nitrógeno circundante a la raíz ejerce un efecto más importante en el inicio de la nodulación.

- Se requieren más estudios sobre el efecto de la concentración de nitratos absorbidos por la planta en el metabolismo general y su posterior efecto sobre el desarrollo y función de los nódulos.

- Se requieren más estudios que permitan minimizar el efecto de los nitratos sobre la nodulación, y de este modo, poder establecer cultivos de soya que nodulen eficientemente en presencia de las cantidades adecuadas de fertilizante mineral que este tipo de planta requiere, y obtener rendimientos óptimos de este cultivo. En este sentido parece más prometedor continuar en la búsqueda de variedades de soya tolerantes a nodular en presencia de nitratos.

Un aspecto que no fue discutido por Harper (1974)(Tabla 6), y que es importante resaltar, especialmente si se considera el problema actual de la contaminación, es el referente al posible ahorro de fertilizantes minerales. En este trabajo se observa que con la aplicación de dos dosis de nitrógeno mineral (concentración 7.5 mM) se obtuvo un rendimiento inferior al obtenido en el tratamiento en el que se aplicó la dosis mínima (0.75 mM) al inicio del experimento la que favoreció el establecimiento de la simbiosis y un desarrollo eficiente de la planta que respondió a la segunda dosis de nitrógeno (7.5 mM) aplicado en la floración.

#### 2.4.2 Experimentos en Suelo.

Herridge y Betts (1988), evaluaron el efecto de los nitratos presentes en el suelo sobre la asociación Bradyrhizobium japonicum-Glycine max, para ello emplearon un suelo que contenía altos niveles de nitratos (260 KgN/ha.), 40 genotipos de soya (32 genotipos previamente seleccionados como tolerantes a nitratos (2.5 mM), 3 variedades comerciales y 5 variedades no-nodulantes), y la cepa CB1809 de B. japonicum. Determinaron los índices de nodulación y los

índices del contenido de ureidos en el xilema, los que resultaron inferiores a los obtenidos en invernadero. De los 32 genotipos tolerantes sólo 4 genotipos, todos de origen coreano (466, 468, 469 y 464) y una de las variedades comerciales (Avolles), mostraron alto nivel de actividad simbiótica en campo. Las variedades Davis, Lee y Hill (seleccionadas como genotipos tolerantes) mostraron pequeña tolerancia a nitratos en campo. La producción de grano en los 4 genotipos coreanos fue inferior al rendimiento obtenido con las variedades comerciales.

El nivel de nitratos residuales en el suelo fue más alto en las parcelas en las que se cultivaron los genotipos coreanos.

Hardarson *et al.* (1984) y Danso *et al.* (1987), evaluaron la fijación simbiótica en diversas variedades de soya. Las semillas se inocularon con cepas efectivas de *Bradyrhizobium japonicum*, mezcladas o individualmente, y se sembraron en presencia de sulfato de amonio o nitrato de amonio marcado ( $N^{15}$ ). Los fertilizantes se agregaron en niveles de 20 y 100 KgN/ha. Las determinaciones que realizaron corresponden a: peso seco de nódulos y materia seca, nitrógeno total y relación  $N^{15}/N^{14}$  con la que calcularon los kilogramos de nitrógeno fijado y los porcentajes de nitrógeno derivados del fertilizante (Ndff); del nitrógeno derivado del suelo (Ndffs) y del nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndffa). En la Tabla 8 se presentan algunos de los resultados reportados por estos investigadores, los que confirman que los genotipos de soya varían en su capacidad para formar nódulos, fijar nitrógeno y en el rendimiento que producen, asimismo se observa que también varían en su respuesta a los altos niveles de nitrógeno, en algunos el peso seco de nódulos y la cantidad de nitrógeno fijado (%Ndffa) disminuyó considerablemente en presencia del nivel alto de nitrógeno, tal es el caso de la variedad Altona y Evans (Hardarson *et al.*, 1984) (Exp. 1), en otros únicamente fue afectado el peso

**TABLA 8**

EFFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE NITRÓGENO EN LA ASOCIACIÓN *Bradyrhizobium japonicum*-*Glycine max* (EXPERIMENTOS REALIZADOS EN CAMPO).

EXPERIMENTO	VARIEDAD	PESO SECO DE NÚCULOS mg/planta		PESO SECO DE PARTE AÉREA ton/ha		REDUCCIÓN DE ACETILENO micro mol/ha/h		NITRÓGENO FIJADO Kg/ha		Ndfa %		REFERENCIA
		20 Kg N/ha	100 Kg N/ha	20 Kg N/ha	100 Kg N/ha	20 Kg N/ha	100 Kg N/ha	20 Kg N/ha	100 Kg N/ha	20 Kg N/ha	100 Kg N/ha	
1	Atona	192	50	9.0	9.3	13	2	29	0	19	0	Harderson et al., 1984
	Chopawa	205	218	11.6	11.6	17	16	45	18	26	11	
	Duradje	90	94	10.3	11.9	6	20	18	18	11	10	
	Estera	460	126	12.0	10.1	17	18	50	20	26	12	
2	Chopawa	611	346	4.7	4.7			64	57	29	24	Daneo et al., 1987
	Wilama	448	340	7.7	8.0			208	200	54	51	
	Amoy 71	647	453	7.6	8.0			235	250	64	62	
3	Hodgson	150	150	7.1	6.3			71	19	35	7	Daneo et al., 1987
	F74-412	370	210	9.6	9.2			61	75	24	29	
	Flora	140	140	10.6	10.3			132	35	41	23	

Ndfa: Nitrógeno derivado de la fijación simbiótica

seco de nódulos (variedades Chippewa, Williams y Amsoy 71; Exp. 2), en tanto que la cantidad de nitrógeno fijado fue similar en presencia de las dos dosis de nitrógeno aplicadas. De manera inversa en la variedad Chippewa (Exp. 1) y las variedades Hodgson y Flora (Exp. 3), el peso seco de nódulos permaneció constante en los dos niveles de nitrógeno, en tanto que el nitrógeno fijado disminuyó considerablemente, particularmente en la variedad Flora. Únicamente en las variedades Dunadja (Exp. 1) y F74-412 (Exp. 3) la asociación con *B. japonicum* fue mejorada por la presencia de niveles elevados de nitrógeno; lo que se manifestó en la variedad Dunadja a través de la reducción de acetileno y el peso seco de parte aérea. Hardarson *et al.* (1984) consideran que la variedad Dunadja puede ser particularmente útil en situaciones en donde el nivel de nitrógeno en el suelo es alto o cuando es necesario aplicar dosis elevadas de fertilizantes. Estos estudios revelan la gran variabilidad entre genotipos de soya en su capacidad para fijar nitrógeno en presencia de diferentes niveles de fertilizante nitrogenado, y la gran aplicación del método de  $N^{15}$  en este tipo de ensayos.

Danso *et al.* (1987) también compararon la respuesta de diferentes cepas de *B. japonicum* (datos no incluidos) y comprobaron que la cepa de Nitragin estableció asociaciones más eficientes con la variedad Chippewa, mientras que la variedad Williams inoculada con Nitragin o la cepa D obtuvo niveles similares de Ndfa. Asimismo observaron que la cepa D es más sensible que la cepa de Nitragin a niveles elevados de nitrógeno en el suelo, por lo que recomiendan considerar en este tipo de estudios diversas variedades de soya y cepas de *B. japonicum* ya que ambas presentan gran variabilidad.

Senaratne *et al.* (1987), realizaron un estudio en invernadero, con tratamientos similares a los arriba descritos, en sus experimentos emplearon: dos variedades de

soya (Chippewa y Dunadja), nueve cepas de *B. japonicum* y dos dosis de nitrógeno (20 y 100 KgN/ha.) que aplicaron como sulfato de amonio marcado ( $N^{15}$ ). Sus resultados confirman que las variedades de soya empleadas responden de manera diferente a las diversas cepas inoculadas y consecuentemente, la asociación establecida, también responde de manera diferente a las concentraciones de nitrógeno existente en el medio. Ellos reportan que en presencia de 20KgN/ha. la variedad Chippewa inoculada con las diferentes cepas, el porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Ndfa) fluctuó del 70 al 75%, en tanto que en la variedad, Dunadja los valores obtenidos fluctuaron de 39 a 61% registrándose en este caso diferencias significativas entre cepas. Asimismo, indican que en general, el %Ndfa disminuyó significativamente cuando el nivel de fertilizante aumento a 100 KgN/ha. Esta disminución varió entre cepas y entre variedades; por ejemplo en la variedad Chippewa con la cepa CB1809 la disminución fue de 98%, en tanto que con la cepa RCR3412 fue de 34%, mientras que en la variedad Dunadja con esta última cepa fue con la que obtuvo la mayor disminución (85%). Tampoco la variedad Chippewa mostró disminución significativa en el %Ndfa con las cepas USDA138 y 61A148 (22 y 30% respectivamente), ni la variedad Dunadja con la cepa RCR3443 (9% de disminución).

Los resultados anteriores indican que aun cuando la fijación de nitrógeno atmosférico es realizada por la bacteria, la cantidad o porcentaje de nitrógeno fijado, es fuertemente influenciada por el hospedero. Como ejemplo se tienen los resultados reportados por Danso *et al.* (1987), que al inocular Nitragin (inoculante constituido por cepas altamente eficientes en la fijación de nitrógeno atmosférico) en las variedades Amsoy 71 y Chippewa cultivadas en condiciones iguales, la primera obtuvo el 64% de su nitrógeno total del Ndfa., en tanto que Chippewa sólo obtuvo el 28% de su nitrógeno total a través de Ndfa.

En general la aplicación de dosis elevadas de nitrógeno mineral, ocasionan una disminución en el número y peso de nódulos, así como en la fijación de nitrógeno, excepto en algunos casos que estuvieron representados por las siguientes variedades y cepas:

-La variedad Dudnaja con la cepa Nitragin. (Hardarson et al., 1984)

- Las cuatro variedades de origen coreano (466, 468, 469 y 464) con la cepa CB1809. (Herridge y Betts, 1988)

-La variedad F74-412 con la cepa SO<sup>30</sup> y la variedad F74-412 con la cepa SO<sup>618</sup>. (Danso et al., 1987)

-La variedad Chippewa con la cepa USDA138, la variedad Chippewa con la cepa 61A148, la variedad Dunadja con la cepa RCR3443 y la variedad Dunadja con la cepa 61A124a. (Senaratne et al., 1987)

Por lo que la interacción de estas variedades de soya y cepas de B. japonicum podrían recomendarse para suelos con altos niveles de nitrógeno inorgánico o donde hay necesidad de aplicar altas cantidades de fertilizante nitrogenado. (Danso et al., 1987; Hardarson et al., 1984; Herridge y Betts, 1988; Senaratne et al., 1987)

#### 2.4.3 Influencia de la Forma de las Fuentes de Nitrógeno

Vigue et al. (1977), citan algunos autores que han propuesto que no sólo la concentración de nitrógeno aplicado tiene influencia en la interacción Rhizobium-Leguminosa en la formación de nódulos y fijación de nitrógeno atmosférico sino también, la forma o componente en que se aplica. En esta revisión se indica que Gibson y Nutman (1960) reportaron que NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> en cantidades traza retrasan la nodulación, del trébol blanco (Trifolium repens L.) cultivado en agar

inclinado, mientras que  $\text{NH}_4$ , asparagina y urea no; Richard *et al.* (1957) observaron que al cultivar alfalfa (*Medicago sativa* L.) en solución de Hoagland's, el  $\text{NH}_4$  en bajas concentraciones no inhibe la nodulación, mientras que los  $\text{NO}_3$  en iguales concentraciones sí; Mac.Connell y Bond (1957) observaron que la leguminosa *Ulex* nódulo bien en soluciones con  $\text{NH}_4$  en concentraciones de 8 mM.

Para comprobar esta hipótesis Vigue *et al.* (1977) determinaron el efecto de dos fuentes de nitrógeno (nitratos y urea en diferentes concentraciones) sobre la asociación soya (variedad Steele)-*Bradyrhizobium japonicum* (Nitragin) en sistema hidropónico, y observaron que al aumentar la concentración de nitratos la nodulación disminuyó, en tanto que con dosis crecientes de urea la nodulación se mantuvo constante. Al comparar la actividad de la nitrogenasa en presencia de 6.0 mM de nitrógeno en forma de nitratos y urea registraron mayor actividad en presencia de urea. Asimismo reportan que hay un mejor aprovechamiento del nitrógeno mineral cuando se aplica en forma de nitratos lo que se tradujo en mayores pesos de materia seca en estos tratamientos. Por otra parte al hacer el seguimiento de nitrógeno residual en las soluciones nutritivas encontraron que los nitratos se agotan rápidamente, en tanto que la urea no se agotó a través de todo el experimento. Estos investigadores concluyen que en condiciones hidropónicas se puede recomendar la adición de urea para obtener plantas vigorosas, bien noduladas y que sean capaces de fijar nitrógeno atmosférico, pero que en condiciones de campo se requieren estudios adicionales, porque la urea en el suelo es rápidamente convertida en nitratos.

Resultados similares fueron reportados por Eaglesham *et al.* (1983), quienes cultivaron soya (variedad Wilkin) inoculada con un inoculante de Nitragin, en soluciones con concentraciones de 30, 90, 180 y 360 mgN/maceta adicionadas

en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  o urea, registrando los más altos resultados de fijación de nitrógeno con urea en 90 mgN/maceta.

#### 2.4.4 Efectos de los Nitratos en la Competitividad y Sobrevivencia de Bradyrhizobium japonicum.

El éxito de la nodulación y fijación de nitrógeno que da por resultado el buen desarrollo de las leguminosas, esta sujeto al uso de inoculantes que contienen cepas infectivas, efectivas, competitivas, con capacidad de sobrevivencia en el suelo y como ya se ha mencionado, tolerantes a las condiciones del medio ambiente. (Kucey et al., 1989; Martensson et al., 1989; Abaidoo et al., 1990)

En relación a la competitividad de las cepas y en adición al trabajo de Mc.Neil, (1982) previamente discutido en el que se demostró que la competitividad de las cepas es afectada por altas concentraciones de nitratos y que las diferentes cepas varían en su respuesta, se tienen los siguientes reportes.

Somasegaran y Bohlool (1990) evaluaron la eficiencia en la fijación de nitrógeno y la competitividad de tres cepas de B. japonicum (USDA110, USDA138 y CB1809) que inocularon en forma individual o como inoculante multicepa el que contenía cantidades equivalentes de las tres cepas. Estas fueron inoculadas en semillas de soya variedad Lee, las que se sembraron en suelos carentes de rhizobia y con nitrógeno disponible o inmovilizado (mediante la adición de bagazo de caña de azúcar). Sus resultados indican que la cepa USDA110 fue altamente efectiva en presencia de nitrógeno disponible e inmovilizado, el inoculante multicepa y la cepa USDA138 se comportaron como medianamente efectivas y la cepa CB1809 como de baja efectividad, no obstante que la cantidad de nitrógeno fijado por esta última se mantuvo constante en presencia de nitrógeno disponible e inmovilizado, en tanto que las otras

cepas fijaron menos nitrógeno en el suelo que contenía nitrógeno inmovilizado. Asimismo se observó que la concentración de nitrógeno en el suelo afecta la competitividad de las cepas, observándose que la cepa USDA 110 fue la más competitiva ocupando el 47 y 55% de nódulos en suelo con nitrógeno disponible y nitrógeno inmovilizado respectivamente, en cambio la cepa USDA138 ocupó el 48% en suelo con nitrógeno disponible y 22% con nitrógeno inmovilizado, y la cepa CB1809 el 4% con nitrógeno disponible y 20% con nitrógeno inmovilizado.

Abaidoo *et al.* (1990) también empleó un inoculante multicapa con las cepas USDA110, USDA138 y CB1809 para inocular soya en dos tipos de suelos, fertilizados con sulfato de amonio en concentraciones de 0, 40 y 300 KgN/ha. La aplicación de nitrógeno disminuyó el número y masa nodular, pero en este trabajo la proporción de nódulos ocupados por cada una de las cepas permaneció estable, sin importar el tipo de suelo y nivel de nitrógeno; encontrando que la cepa USDA110 es la más competitiva con 78% de nódulos ocupados, y las cepas USDA138 y CB1809 con igual porcentaje de ocupación de nódulos (25%).

Martensson *et al.* (1989) también con el objetivo de conocer la influencia de los niveles de nitrógeno en la competitividad de las cepas de *B. japonicum*, realizaron un trabajo utilizando inoculantes unicepa de las cepas E104, E109 y E110, y mezcla de inoculantes E104+E109, E109+E110, E104+E110 y E104+E109+E110; inoculados en la soya variedad Carearana, y sembrada en un suelo fertilizado en concentraciones de 0, 5 y 10 g. N/m<sup>2</sup> en forma de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. El peso seco de las plantas inoculadas con las cepas E104 y E109 aumento cuando recibieron fertilizante nitrogenado, en cambio con la cepa E110 o mezcla con E110 y el tratamiento de 5 g. N/m<sup>2</sup> el peso seco de las plantas aumentó, pero con 10 g. N/m<sup>2</sup> disminuyo. En lo que se refiere al porcentaje de nódulos ocupados por cada una de las cepas en la mezcla de

inoculantes, en la mezcla E104+E110 el número de nódulos ocupados por las dos cepas (E104 y E110) es alta sin importar los niveles de nitrógeno (55% en 0 g. N/m<sup>2</sup> y 85% en 10 g. N/m<sup>2</sup>); en cambio en la mezcla E104+E109 hubo bajo porcentaje de nódulos ocupados con las dos cepas (doble infección) en altos niveles de nitrógeno (10 g. N/m<sup>2</sup>) 9%, porque la frecuencia de la cepa E104 es alta; y la mezcla E104+E110 en 10 g. N/m<sup>2</sup> la frecuencia de la cepa E104 es baja (15%).

La habilidad competitiva de las cepas de *R. japonicum* en presencia de nitratos es principalmente determinada por las características genéticas de las cepas y su compatibilidad con la planta huésped. (Abaidoo *et al.*, 1990)

En los trabajos realizados por Semu *et al.* (1979) y Abaidoo *et al.* (1990), se reporta que el incremento de nitrógeno no afecta la población rhizobiana; la población rhizobial aumentó durante los estados de desarrollo de la planta y este incremento puede ser atribuido a la multiplicación de la rhizobia en la rizosfera de la planta huésped. La población rhizobial en el suelo también se incrementa al final del desarrollo de la soya por la liberación de rhizobia de los nódulos viejos.

#### 2.4.5 Posibles Causas de la Inhibición por Nitratos.

Se ha tratado de conocer cuales son las causas del efecto inhibitorio de los nitratos en el desarrollo y actividad de los nódulos de las leguminosas, pero son verdaderamente muy complejas y aunque se han postulado varias hipótesis ninguna de ellas ha logrado explicar totalmente el proceso.

Altas concentraciones de nitratos pueden intervenir de manera inhibitoria en tres fases de la asociación que corresponden a: la infección del pelo radicular, el desarrollo de los nódulos y el funcionamiento de los mismos que se manifiesta a

través de la actividad de la nitrogenasa, asimismo ocasiona la prematura senescencia de los nódulos. (Harper y Gibson, 1984)

Para explicar la inhibición en la infección del pelo radicular Tanner y Anderson (1964) proponen el siguiente mecanismo, destrucción del ácido indol acético, reacción que es acelerada por nitritos. En tanto que Dazzo et al. (1981) indican que los nitratos ocasionan la disminución en el nivel de producción de lectina, así como del número de sitios receptores en los pelos radiculares, (citados por Harper y Gibson, 1984).

La inhibición del crecimiento y desarrollo de los nódulos se atribuye a que la asimilación de altas concentraciones de nitratos por la planta, requiere de grandes cantidades de energía, lo que priva a los nódulos de un suplemento adecuado de fotosintatos. (Harper y Gibson, 1984; Streeter, 1985b)

Trichant y Rigaud (1980) (citados por Harper y Gibson, 1984) sugieren que la inhibición de la nitrogenasa es causada por la acumulación de nitritos, los que son producidos tanto por la bacteria como por el hospedero vía nitrato reductasa. En adición a lo anterior Streeter (1985a) indica que la acumulación de nitritos puede también causar la oxidación de la leghemoglobina a leghemoglobina férrica.

Se cree que las cepas de Bradyrhizobium japonicum NR<sup>+</sup> (Nitrato Reductasa Inducible) son más sensibles a los efectos tóxicos de los nitratos que las NR<sup>-</sup> (carente de Nitrato Reductasa Inducible), debido a que las primeras acumulan altas concentraciones de nitritos en los nódulos e inhiben la actividad de la nitrogenasa. (Alcantar y Champigny, 1988; Streeter, 1985a; Streeter, 1985b)

Esta hipótesis no ha sido totalmente aceptada porque hay cepas  $NR^-$ , las que en concentraciones elevadas de nitratos y a pesar de no acumular nitritos en sus nódulos la actividad de la nitrogenasa es disminuida. (Streeter, 1985a; Streeter, 1985b)

#### 2.4.6 Como Aliviar los Efectos Inhibitorios del Nitrato.

Herridge *et al.* (1984) y Lawson *et al.* (1988) han propuesto que para aliviar parcialmente los efectos inhibitorios de los nitratos hay que emplear inoculantes con altas concentraciones de rhizobia, recomendación que fue derivada de los siguientes estudios.

Herridge *et al.* (1984), cultivaron soya variedad Bragg en un suelo con alto contenido de nitratos. Las semillas fueron tratadas con dos tipos de inoculantes que contenían diferentes concentraciones de bacterias: un inoculante en aspersión, en concentraciones de: 0, n(normal), 10n y 100n, y un inoculante en turba con concentración n. Ellos indican que con 100n, la distribución de los rhizobia en el suelo, aumentó numéricamente y alcanzó mayores profundidades, y que en este tratamiento se cosecharon las plantas mejor noduladas y en las que se registró la mayor fijación de nitrógeno.

Lawson *et al.* (1988) en hidropónia cultivaron la misma variedad de soya que en el trabajo anterior, en una solución nutritiva con 4mM de  $KNO_3$ . Las semillas se inocularon con una cepa silvestre  $NR^+$  y dos mutantes  $NR^-$ , las que se inocularon de manera individual y en dos concentraciones de microorganismos, un nivel bajo ( $5 \times 10^4$  bact.) y un nivel alto ( $1 \times 10^{11}$  bact.). Sus resultados indican que independientemente de que las cepas fueran nitrato reductasa positiva o negativa, estas en los niveles bajos de células respondieron en forma similar, registrándose una disminución en el número de nódulos de alrededor del 85%; en tanto que en

concentraciones altas la disminución fue del 42% para la cepa silvestre y de 16 y 71% para las cepas mutantes.

### 3.0 OBJETIVOS

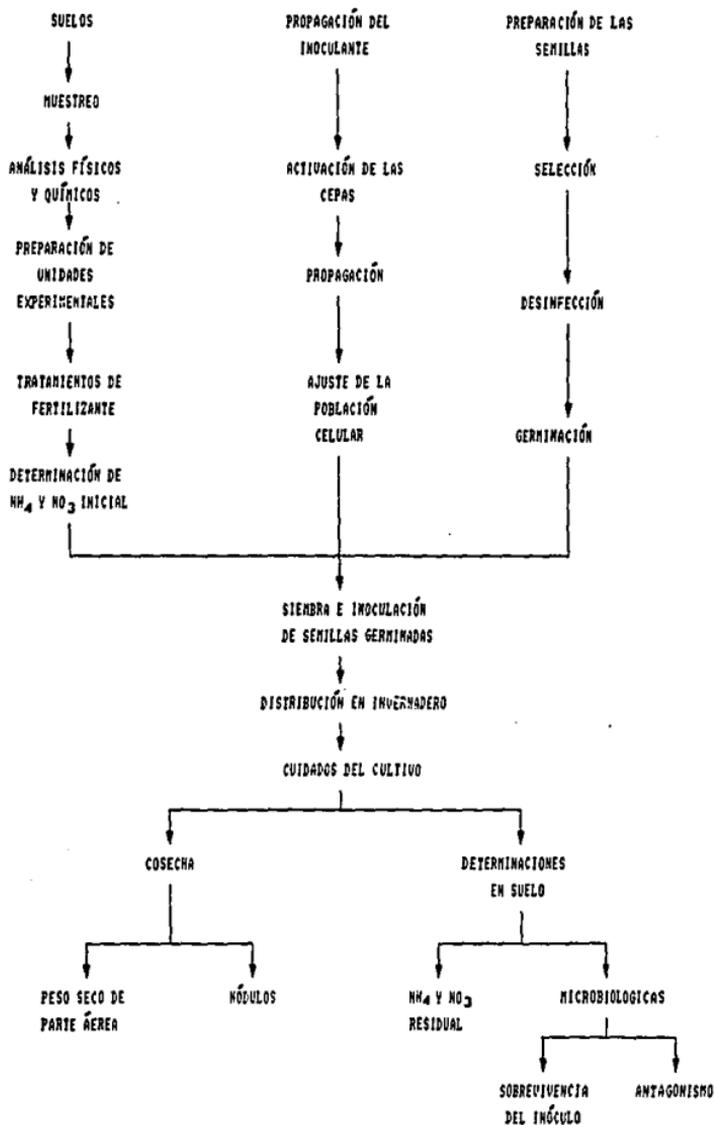
#### Objetivo General

Establecer el efecto de la fertilización nitrogenada en la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merril-Suelo.

#### Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la inoculación de 2 cepas de Bradyrhizobium japonicum sobre el crecimiento de Glycine max desarrollada en presencia de suelo.
- Comparar el efecto de la inoculación con el producido por la adición de fertilizante nitrogenado en el crecimiento de Glycine max.
- Comparar el efecto de la fertilización nitrogenada con el producido por la inoculación, así como la inoculación y fertilización simultánea en el desarrollo de Glycine max.

## DIAGRAMA DE TRABAJO



## 4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Suelos

En este estudio se emplearon muestras de suelo procedentes del Municipio de Miacatlán, Morelos; este se ubica geográficamente entre los paralelos  $18^{\circ}45'$  de latitud norte y  $99^{\circ}21'$  de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura de 1054 metros sobre el nivel del mar.

El material parental predominante en esta zona son rocas calcáreas sedimentarias. Las muestras se tomaron de la capa arable de dos tipos de suelo Feozem y Fluvisol.

Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, se pasaron a través de un tamiz de 2 mm de maya y se procedió a efectuar las siguientes determinaciones:

Color seco y húmedo, se determinó por comparación con las Tablas de Munsell (Munsell Soil Color Charts 1975 Edition).

Textura, por el método del hidrómetro de Bouyoucos. (Echegaray y Ramírez, 1986; Kaurichev *et al.*, 1984)

Conductividad Eléctrica, en una mezcla de suelo-agua, relación 1:5 se midió la conductividad en un conductímetro E527 Methm, C de la celda  $0.8 \text{ cm}^{-1}$ . (Dominguez y Aguilera, 1984)

Reacción del Suelo (pH), se midió con un potenciómetro Cole Parmer Dige-Sense modelo 5985-40, empleándose una relación suelo-agua de 1:2.5. (Dominguez y Aguilera, 1984)

Capacidad de Intercambio Cationico Total, por el método de centrifugación y titulación con Versenato.(Dominguez y Aguilera, 1984)

Materia Orgánica, por el método de Walkey y Black.(Echegaray y Ramirez, 1986)

Amonio, por el método de Nessler.(Echegaray y Ramirez, 1986)

Nitratos, por el método del Acido Fenoldisulfonico.(Echegaray y Ramirez, 1986)

Nitrógeno Total, por el método Kjeidahl.(Jackson, 1982)

Relación Carbono-Nitrógeno, se calculó a partir de los resultados obtenidos en las determinaciones de materia orgánica y nitrógeno total.

Fósforo Soluble, por el método de Olsen.(Dominguez y Aguilera, 1984)

#### 4.2 Inoculantes

Para la preparación de los inoculantes se emplearon dos cepas de Bradyrhizobium japonicum.

##### 4.2.1 Cepas

Las cepas de Bradyrhizobium japonicum empleadas para el presente trabajo corresponden a la FQ.-9 y FQ.-12 pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

Para activar las cepas liofilizadas, las ampollitas se desinfectaron con fenol al 5%, se dejaron secar, se

abrieron, el liofilizado se suspendió en Caldo Extracto de Levadura Manitol (CELM) y se incubó a 28°C en agitación a 200 rpm durante 7 días. Apartir de este cultivo se resebró en tubos inclinados que contenían Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMARC) y se incubó a 28°C durante 7 días.

A los tubos con crecimiento se les verificó su pureza por medio de observaciones microscópicas, en las que se verificó morfología y su reacción a la tinción de Gram. Una vez comprobada la pureza se procedió a conservarlas mediante refrigeración, resebrándose cada seis meses en el mismo medio. Estos constituyen el cultivo madre.

#### 4.2.2 Curva de Crecimiento

En la producción industrial de inoculantes se emplean cultivos que contengan  $1 \times 10^{-9}$  células/ml y que se encuentren en la fase logarítmica terminal. Considerando estos antecedentes se procedió a desarrollar las curvas de crecimiento de cada una de las cepas y de este modo establecer el tiempo al que se obtiene la densidad poblacional y fase de desarrollo requeridos. Para ello se procedió a la obtención de un cultivo activo, para lo que se tomo una asada del cultivo madre, se inoculó en el medio CELM y se incubó durante 7 días.

Matraces nefelométricos de 250 ml que contenían 50 ml de CELM fueron inoculados con 2.5 ml del cultivo activo e incubados en agitación a 200 rpm y 28°C. Para establecer el desarrollo, en estos matraces se determinó la turbiedad al tiempo 0 y después cada 24 horas por un período de 15 días, tiempo al que se obtuvieron lecturas estables, las que indicaron, que el cultivo había alcanzado su fase estacionaria. Estas curvas se realizaron por triplicado para cada una de las cepas. La turbiedad (desarrollo del cultivo) se determinó en un

fotolorímetro Klett-Sumerson con filtro verde (500-570 nm). Para calcular la población celular, las lecturas se interpolaron en la curva de McFarland.

#### 4.2.3 Producción de Inoculantes

Se prepararon tres tipos de inoculantes, uno con la cepa FQ-9, otro que contenía la cepa FQ-12 y el tercero constituido por una mezcla de las cepas anteriores. En todos los casos se realizó el siguiente procedimiento:

**Activación de las cepas.** Del cultivo madre se tomó una asada y se inoculó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de CELM, incubándose a 28°C y 200 rpm de agitación durante 6 días.

**Propagación de las Cepas.** Matraces nefelométricos de 250 ml que contenían 50 ml de CELM fueron inoculados con 2.5 ml del cultivo activo, con la cepa correspondiente para cada matraz, incubándose a 28°C y 200 rpm de agitación durante 6 días (tiempo establecido a través de los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento). Al finalizar el periodo de incubación se verificó la pureza de los cultivos mediante la observación de características morfológicas y reacción a la tinción de Gram. Posteriormente se ajustó la densidad de población, para lo que a cada matraz se le adicionó CELM estéril hasta obtener una lectura de 127 U.K. que corresponden a una población de  $1.3 \times 10^9$  células/ml en la Curva de McFarland. El contenido de cada matraz fue utilizado como inoculante unicepa. Para la preparación del inoculante multicepa, en condiciones de asepsia se mezclaron los dos cultivos (con la población previamente ajustada) de las cepas FQ-9 y FQ-12 empleándose volúmenes iguales de cada una.

La comprobación del número de bradyrhizobias viables por mililitro de inoculante se hizo por el Método de Dilución y

Cuenta en Placa. De cada uno de los inoculantes se hicieron dos series de diluciones crecientes de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ . De las tres diluciones más altas de cada serie, se tomó 1 ml y se sembró por el método de vertido en ELMARC, incubándose las placas a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 7 días, procediéndose después a la cuantificación de las colonias típicas (UFC unidades formadoras de colonias) de *B. japonicum* y detección de contaminantes.

#### 4.3 Preparación de Semillas

Se utilizaron semillas de Soya (*Glycine max* (L.) Merrill) variedad Júpiter, con 80% de germinación, las que fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

##### 4.3.1 Selección, Desinfección y Germinación de Semillas

Se seleccionaron semillas que no presentaban daño y eran de tamaño uniforme. Se desinfectaron por el tratamiento con etanol al 95% e hipoclorito de sodio al 5%, haciéndose varios lavados con agua destilada estéril para eliminar el desinfectante.

En condiciones de asepsia, las semillas se colocaron en cajas de Petri que contenían algodón y papel filtro humedecido (todo previamente esterilizado) y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 3 días, después de los cuales la mayoría de las semillas germinó.

#### 4.4 Experimento en Invernadero

##### 4.4.1 Preparación de Unidades Experimentales

Se utilizaron macetas de 20 cm de diámetro con 2.5 Kg de suelo.

Dos días antes de la siembra a cada una de las macetas se le agregó la dosis correspondiente de fertilizante, este se mezcló perfectamente con el suelo para que su distribución fuera homogénea, y se humedeció al 50% de su capacidad de campo.

Para la fertilización del suelo (Feozem) se emplearon: Nitrato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y Superfosfato de Calcio Triple ( $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$ ) las dosis que se aplicarán se describen en la Tabla 9.

El diseño del experimento fue completamente al azar con 13 tratamientos y 3 repeticiones por cada tratamiento.

#### 4.4.2 Siembra e Inoculación

En el suelo se hicieron agujeros de 2 a 3 cm de profundidad. Con pinzas estériles y teniendo cuidado para no dañarlas se tomaron las semillas germinadas, colocando 4 semillas por maceta; después se inocularon mediante la adición de 1 ml de inóculo por semilla y se procedió a cubirlas inmediatamente con suelo.

En las unidades control se adicionó 1 ml de CELM por semilla.

#### 4.4.3 Cuidados en Invernadero

Las unidades experimentales se mantuvieron en el invernadero por 45 días.

Los parámetros controlados en el invernadero corresponden a:

Humedad Relativa	70 a 80%
Temperatura	28 a 30°C durante el día y 12 a 15°C durante la noche
Iluminación	13 horas diarias

TABLA 9

TRATAMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN EL SUELO FEOZEM

TRATAMIENTO	CEPA	DOSIS DE FERTILIZANTE		
		Kg/ha		
		N	P	K
0	-	0	0	0
1	-	0	80	0
2	-	50	80	0
3	-	100	80	0
4	FQ-9	0	80	0
5	FQ-12	0	80	0
6	FQ-9 + FQ-12	0	80	0
7	FQ-9	50	80	0
8	FQ-12	50	80	0
9	FQ-9 + FQ-12	50	80	0
10	FQ-9	100	80	0
11	FQ-12	100	80	0
12	FQ-9 + FQ-12	100	80	0

A los 20 días de la siembra se realizó un raleo para dejar sólo 2 plantas por maceta.

Durante su desarrollo las plantas fueron regadas con agua de la llave cada vez que fue necesario.

Fertilizante Correctivo. Debido a que a las tres semanas de desarrollo las plantas de la mayoría de los tratamientos presentaban hojas amarillentas con nervaduras rojizas se procedió a aplicar al suelo otra dosis de Superfosfato de Calcio Triple ( $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$ ) 40 Kg  $\text{P}_2\text{O}_5$ /ha, y a los 27 y 32 días se asperjaron las hojas con Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) en una proporción de 0.25 g /100ml de  $\text{H}_2\text{O}$  (dosis recomendada por la SARH). En virtud de que después de una semana persistieron los síntomas de deficiencias nutricionales se procedió a aplicar otro fertilizante foliar llamado Aminol Fosnutrén que contiene: 6% de fósforo, 42.9% de materia orgánica, 39.2% de aminoácidos, 0.13% de hierro, 0.09% de zinc, 0.08% de cobre y 0.06% de manganeso, que se diluyó en una proporción de 2 ml de Aminol Fosnutrén/ Lt. de  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### 4.4.4 Cosecha

La cosecha se realizó al inicio de la floración, que se alcanzó a los 45 días de desarrollo. La parte área se separó de la raíz, se guardó en bolsas de papel que se colocaron en estufa a 70°C durante 72 horas.

En la fracción radicular se procedió a la detección de nódulos.

#### 4.4.5 Parámetro Evaluados en las Plantas

- Peso seco en parte área.
- Presencia o ausencia de nódulos.

Considerando el problema de deficiencias nutricionales, los tratamientos de fertilización adicional y los resultados obtenidos en el suelo Feozem, se procedió a montar un segundo experimento, empleando otro tipo de suelo del mismo municipio de Miacatlán, Morelos; un Fluvisol.

Para este segundo experimento se emplearon las mismas cepas de Bradyrhizobium japonicum y variedad de soya; la preparación de inoculantes, la desinfección, germinación, siembra e inoculación también se hizo de la misma manera que en el experimento anterior.

Así mismo el tipo de unidades experimentales, fertilizante, diseño experimental y los cuidados en el invernadero también fueron iguales.

En este experimento se emplearon diferentes dosis de fertilizante, los tratamientos de este experimento se presentan en la Tabla 10, con 3 repeticiones para cada tratamiento.

A los 25 días de desarrollo de las plantas, se aplicó una segunda dosis de Superfosfato de Calcio Triple ( $(\text{PO}_4)_2\text{H}_4\text{Ca}$ ) 30 Kg  $\text{P}_2\text{O}_5$ /ha, a todos los tratamientos.

La cosecha se realizó a los 45 días y se evaluaron los mismos parámetros que en el experimento anterior.

#### 4.4.6 Determinaciones en Suelo

En cada unidad experimental de los dos experimentos, se determinó el contenido de Amonio ( $\text{NH}_4$ ) y Nitratos ( $\text{NO}_3$ ) en el suelo, al inicio y al término del experimento.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 10

TRATAMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN EL SUELO FLUVISOL

TRATAMIENTO	CEPA	DOSIS DE FERTILIZANTE Kg/ha		
		N	P	K
0	-	0	0	0
1	-	0	60	0
2	-	70	60	0
3	FQ-9	0	60	0
4	FQ-12	0	60	0
5	FQ-9 + FQ-12	0	60	0
6	FQ-9	70	60	0
7	FQ-12	70	60	0
8	FQ-9 + FQ-12	70	60	0

#### 4.5 Ensayos Microbiológicos Complementarios

En virtud de que los tratamientos inoculados de los dos experimentos se observó una nodulación muy pobre se procedió a efectuar tres tipos de Ensayos Microbiológicos a fin de determinar:

- Sobrevivencia de Bradyrhizobium japonicum en el suelo.
- La presencia en el suelo de microorganismos antagonistas a Bradyrhizobium japonicum.
- Presencia en el suelo de fagos de Bradyrhizobium japonicum.

##### 4.5.1 Determinación de la Sobrevivencia de Bradyrhizobium japonicum en el Suelo por el Método de Infección en Planta.

Este experimento se hizo bajo condiciones de cultivo hidropónico; empleando como unidades experimentales bolsas de plástico de 21 x 1.5 cm que contenían papel filtro grueso (soporte), adicionándole 20 ml de Solución Nutritiva de Jensen libre de nitrógeno (ver apéndice Fig. 1). (Vincent, 1970)

En este caso se empleo como inóculo a las diluciones de suelo procedentes de los tratamientos inoculados, que son:

FEOZEM Tratamientos	FLUVISOL Tratamientos
4	3
5	4
6	5
7	6
8	7
10	
11	

Las semillas se seleccionaron, desinfectaron y pusieron a germinar en la forma antes indicada.

Diluciones de los suelos. Los suelos de las tres repeticiones de cada tratamiento inoculado fueron mezclados. De cada muestra mixta (por tratamiento) se tomarón 10 g de suelo y se prepararon dos series de diluciones crecientes de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ .

En condiciones de asepsia y con pinzas estériles se colocó una semilla germinada por unidad experimental. Cada semilla fue inoculada con 1 ml de dilución de suelo correspondiente; esta determinación se realizó por duplicado (ver apéndice Fig. 2).

Las unidades experimentales se mantuvieron en el invernadero por 28 días. Las condiciones de temperatura, humedad e iluminación del invernadero fueron las indicadas en los experimentos anteriores.

El volumen de la solución nutritiva se mantuvo constante mediante la adición periódica de solución nutritiva de Jensen libre de Nitrógeno, alternada con agua destilada estéril.

Determinación del Número Más Probable de Rhizobia por Gramo de Suelo. En las raíces de las plantas con 28 días de desarrollo se determinó la presencia (+) o ausencia (-) de nódulos; se cuantificó el número de bolsas positivas y se consultó el cuadro 3.5 A de la tabla estadística de Fisher y Yates (Vincet, 1970), en donde el número de repeticiones está dado por "n", y el número de muestras utilizado (diluciones de suelo efectuadas) por "s".

En nuestro caso  $n = 2$  y  $s = 8$

El número de rhizobia por gramo de suelo, se calculó apartir de la siguiente ecuación:

$$\text{Rhizobia/g de suelo} = \frac{m \times d}{v \times g}$$

donde m = número probable a la mínima dilución de las series

d = dilución de la primera bolsa

v = volumen de la muestra adicionada

g = peso de la muestra con la que se preparó la primera dilución.

#### 4.5.2 Antagonismo por Microflora General del Suelo.

Se utilizaron las mezclas de suelo de las tres repeticiones de los tratamientos: del tratamiento 6 para el Feozem y del tratamiento 5 para el Fluvisol, que corresponden a los tratamientos inoculados con la mezcla de las dos cepas en estudio. Con cada una de las muestras mixta de suelo se preparó una serie de diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , de la última dilución se tomó una alícuota de 0.5 ml y se pasó a un matraz que contenía 50 ml de Gelosa Nutritiva (G.N.) fundida (a una temperatura no mayor de  $45^{\circ}\text{C}$ ) con la que se obtuvo un inóculo con concentración de  $10^{-5}$ . El contenido del matraz se homogenizó y se vertió a cajas de Petri (+ 10 ml), las que se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas; después de las cuales se observó desarrollo microbiano. A estas cajas se les añadieron 20 ml de ELMARC los que contenían cultivo activo de *B. japonicum* FQ-9 o FQ-12 (la concentración final del inóculo fue de 0.2%) con lo que se formó una capa adicional sobre la placa previamente incubada, procediéndose a incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  durante otros 7 días. (ver apéndice Fig. 3)

#### 4.5.3 Antagonismo por Fagos del Suelo

En este ensayo se emplearon también muestras mixtas de las tres repeticiones de suelo de los tratamientos 6 para el Feozem y el tratamiento 5 para el Fluvisol.

Se preparó una dilución de  $10^{-1}$  de cada suelo, éstas se filtraron en papel filtro por separado, las suspensiones obtenidas se filtraron en equipo Millipore estéril a través de una membrana de 0.45 micras; de cada filtrado se tomó un alícuota de 0.2 ml que se paso a un tubo estéril añadiéndole 0.1 ml de cultivo activo de *B. japonicum* FQ-9 o FQ-12 según correspondiera, se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos y se paso a un matraz que contenía 50 ml de ELMARC fundido (a una temperatura no mayor de  $45^{\circ}\text{C}$ ), el contenido se homogenizó y se vertió a cajas de Petri incubándose a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 7 días; después de los cuales se procedió a identificar la posible aparición de placas líticas sobre el desarrollo de las cepas en estudio (ver apéndice Fig. 4).

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Determinaciones Físicas y Químicas del Suelo.

En la tabla 11 se muestran los resultados de las determinaciones físicas y químicas de los dos tipos de suelos.

El Feozem es un suelo según las tablas de Munsell de color: en seco Gris claro (10YR 7/1) y en húmedo Pardo grisáceo (10YR 5/2); de textura Migajón acillo arenoso; de acuerdo a Moreno (1978) es un suelo no salino, pH medianamente alcalino, por ciento de materia orgánica medianamente pobre, por ciento de nitrógeno total extremadamente pobre, fósforo soluble medianamente rico y relación C/N muy alta; y según Metson (1956) la capacidad de intercambio catiónico total es mediana.

El Fluvisol es un suelo según las tablas de Munsell de color: en seco Pardo (10YR 4/3) y en húmedo Negro pardusco (10YR 2/3; de textura Arena migajosa; de acuerdo a Moreno (1978) es un suelo no salino, pH ligeramente alcalino, rico en materia orgánica, por ciento de nitrógeno total medianamente rico, rico en fósforo soluble y relación C/N mediana; y según Metson (1956) la capacidad de intercambio catiónico total es mediana.

### 5.2 Cepas

En los cultivos activados se observó la presencia de bacilos cortos Gram negativos, sin observar otras formas morfológicas lo que permitió corroborar la pureza del cultivo madre.

T A B L A 11

## RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS SUELOS

DETERMINACIONES	SUELOS	
	FEOZEM	FLUVISOL
COLOR:		
SECO	GRIS CLARO	PARDO
HUMEDO	PARDO GRISACEO	NEGRO PARDUSCO
% DE ARENA	61.35	82.74
% DE ARCILLA	28.65	7.93
% DE LIMO	10.00	9.33
TEXTURA	MIGAJON ARCILLO ARENOSO	ARENA MIGAJOSA
C. E. (mmhos/cm)	0.35	0.40
pH	7.80	7.7
C.I.C.T. (meq/100g)	44.60	28.52
MATERIA ORGÁNICA %	1.36	3.26
NITRÓGENO TOTAL %	0.004	0.15
FÓSFORO SOLUBLE ppm	19.33	28.47
RELACIÓN C/N	197.00	12.63

C.E. Conductividad Eléctrica

C.I.C.T. Capacidad de Intercambio Cationico Total

## Curva de Crecimiento

En la gráfica 1 se muestran los resultados de las curvas de crecimiento de las dos cepas (FQ-9 y FQ-12), en ellas se observó que la cepa Fq-9 es un poco más rápida para desarrollarse que la cepa FQ-12; la primera alcanzó la fase logarítmica terminal entre las 120 y 144 horas (5° y 6° día), en cambio la cepa FQ-12 entre las 168 y 192 horas (7° y 8° día), así mismo se observa que con las dos cepas se obtuvieron poblaciones aproximadas de  $1 \times 10^9$  entre las 48 y 72 horas (2° y 3° día).

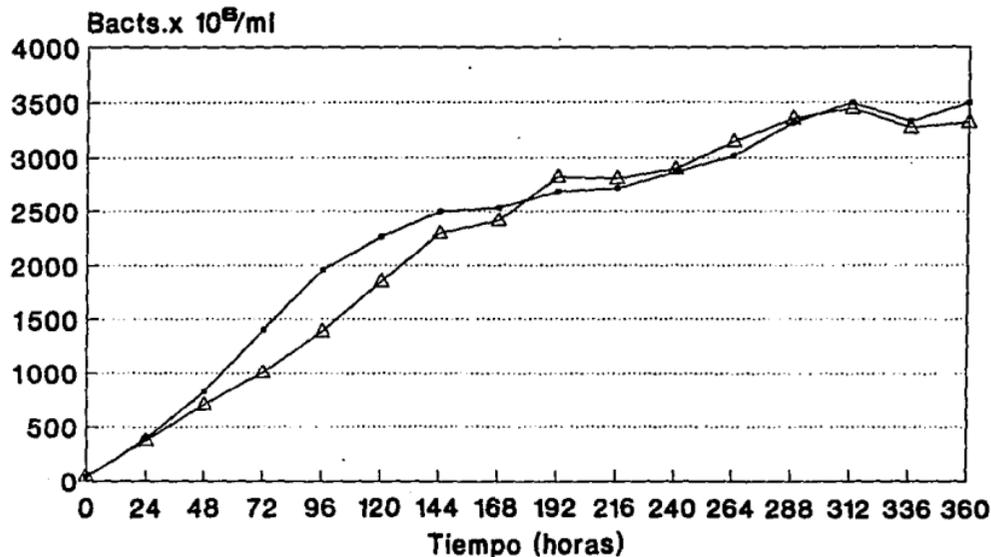
Los inoculantes empleados en el ensayo de invernadero fueron preparados con base en los resultados anteriores, para ello se seleccionó como tiempo de incubación 6 días, período que corresponde a la fase logarítmica terminal. A los cultivos obtenidos se les agregó medio de cultivo estéril, ajustando de esta manera la población microbiana a  $1.3 \times 10^9$  cel/ml, procediéndose a efectuar un ensayo de control de calidad.

En la tabla 12 se observan los resultados de la cuenta de microorganismos viables/ml de los inoculantes; estos indican que las cantidades fluctuaron entre  $1.7 \times 10^{13}$  y  $3 \times 10^{13}$ , concentraciones que son superiores a las recomendadas para un inoculante de alta calidad los que corresponden a  $1 \times 10^9$  microorganismos/ml de inoculante.

### 5.3 Experimentos en Invernadero

En la tabla 13 se exponen los resultados del efecto de fertilizantes nitrogenados y fosfatados sobre la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merril-Suelo, en el suelo Feozem. La ausencia de nódulos en los tratamientos no inoculados indica que en el suelo en estudio no existen rizobia nativos. De los nueve tratamientos inoculados, sólo en cinco se registraron nódulos, estos fueron escasos y

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de las dos cepas de Bradyrhizobium japonicum



—●— FQ-9    —△— FQ-12

Los resultados expresan el promedio de tres repeticiones

TABLA 12

RESULTADOS DEL NÚMERO DE RHIZOBIA VIABLES POR MILILITRO DE INOCULANTE  
POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN Y CUENTA EN PLACA

CEPAS	DILUCIONES			Nº DE BACTERIAS VIABLES/ml
	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup> U.F.C./placa	10 <sup>-12</sup>	
FQ-9	incontable	305	- de 30	3 x 10 <sup>-13</sup>
FQ-12	1595	183	- de 30	1.7 x 10 <sup>-13</sup>

U.F.C./placa Unidades Formadoras de Colonias/placa

TABLA 13

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN Y SU INTERACCIÓN CON NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL DESARROLLO DE *Glycine max* (L.) MERRILL VAR. JÚPITER CULTIVADA EN UN FEZEM (EXPERIMENTO EN INVERNADERO)

CEPA	TRATAMIENTO			NODULACIÓN	PESO SECO PARTE AEREA g/planta	PESO SECO % DE INCREMENTO RESPECTO A TEST. ABS.
	Kg/ha					
	N	P	K			
	0	0	0	-	0.59	
	0	80	0	-	0.61	3.4
	50	80	0	-	0.57	- 3.4
	100	80	0	-	0.59	0
FQ-9	0	80	0	+	0.60	1.7
FQ-12	0	80	0	+	0.63	6.8
MEZCLA	0	80	0	+	0.69	16.9
FQ-9	50	80	0	-	0.52	-11.9
FQ-12	50	80	0	-	0.66	11.9
MEZCLA	50	80	0	+/-	0.57	- 3.4
FQ-9	100	80	0	-	0.54	- 8.5
FQ-12	100	80	0	-	0.67	13.6
MEZCLA	100	80	0	+/-	0.62	5.1

- Ausencia de nódulos

+ Presencia de nódulos

TEST. ABS. Testigo Absoluto

El análisis de varianza Indico que no hay diferencia significativa

pequeños, mientras que en los otros cuatro , la adición de nitrógeno impidió la infección por la bacteria o el desarrollo de los nódulos.

Respecto al peso seco de parte aérea, el análisis estadístico, indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 14); no obstante, algunos tratamientos se registraron variaciones con respecto al testigo absoluto que fluctuaron entre -12 y +17%; observándose que en los tratamientos en que se adicionó nitrógeno (sin o con inoculante) se obtuvo menor peso seco respecto al testigo absoluto.

La fertilización fosforada aumentó ligeramente el rendimiento de peso seco, cuando se aplicó solo o combinado con los diferentes inoculantes; pero cuando se aplicó en combinación con nitrógeno mineral (50 o 100 KgN/ha.) únicamente hubo incremento en los tratamientos inoculados con la cepa FQ-12.

En relación al efecto de las cepas se observó que el mayor incremento en el peso seco se obtuvo en la mezcla de las cepas, en segundo lugar la cepa FQ-12 y por último el tratamiento inoculado con la cepa FQ-9 que fue casi igual al testigo absoluto con soló el 1.7% de incremento.

Al comparar el efecto de la cepa FQ-12 en ausencia y presencia de nitrógeno mineral se observa que el rendimiento de peso seco resultó mayor en presencia de nitrógeno mineral, no obstante el incremento de peso seco no puede atribuirse a la fijación de nitrógeno, debido a que en estos casos no se registró nodulación. No se logró dar una explicación a la mayor incorporación de nitrógeno mineral en presencia de esta cepa.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados por otros investigadores surgen numerosos cuestionamientos; por

TABLA 14

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS PESO SECO DE PARTE ÁREA g/planta (FEOZEM)

TRATAMIENTO	REPETICIONES			TRATAMIENTO	
				TOTAL (Ti)	MEDIA (Xi)
0	0.60	0.50	0.68	1.78	0.59
1	0.55	0.72	0.57	1.84	0.61
2	0.59	0.60	0.53	1.72	0.57
3	0.56	0.55	0.66	1.77	0.59
4	0.63	0.71	0.47	1.81	0.60
5	0.67	0.70	0.54	1.91	0.64
6	0.74	0.72	0.62	2.08	0.69
7	0.64	0.55	0.37	1.56	0.52
8	0.66	0.69	0.62	1.97	0.66
9	0.68	0.68	0.36	1.72	0.57
10	0.45	0.65	0.51	1.61	0.54
11	0.71	0.65	0.64	2.00	0.67
12	0.61	0.52	0.73	1.86	0.62

TOTAL PRINCIPAL 23.63

MEDIA PRINCIPAL

0.60

### ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	SUMA DE CUADRADOS (sc)	CUADRADO MEDIO (cm)	F OBSERVADO	F REQUERIDO	
					5%	1%
TOTAL	38	0.340				
TRATAMIENTOS	12	0.047	0.0039	0.35	2.15	2.96
ERROR	26	0.293	0.0110			

ejemplo: la cepa FQ-9 (sinónima de CB1809 y USDA 136) mostró ser muy sensible a la adición de nitrógeno, lo que no coincide con la información de otros investigadores que la reportan como tolerante a nitratos, la que no sólo es capaz de infectar y formar nódulos, sino también de fijar nitrógeno (Sistachis, 1976; Mc.Neil, 1982; Herridge *et al.*, 1984; Herridge y Betts, 1988). No obstante, se debe recordar una de las conclusiones generadas por Senaratne *et al.* (1987), quienes indican que el efecto que ejercen los nitratos en la fijación de nitrógeno atmosférico, depende de la interacción, genotipo de hospedero y cepa rhizobiana, y no de las características que posee cada uno de los simbioses de manera individual.

Considerando lo anterior podría pensarse que la asociación soya variedad Júpiter-cepa FQ-9, es sensible a los nitratos, pero esto tendría que ser comprobado mediante métodos más sensibles. Por otra parte, es de hacer notar que los rendimientos de peso seco obtenidos en este experimento fueron bajos (0.52 a 0.69 g/planta), en tanto que, en estudios previos realizados en el mismo laboratorio, en los que se empleó la misma variedad, las mismas cepas y suelos procedentes de Chiapas, Tamaulipas y San Luis Potosí, el rendimiento obtenido corresponde a 2.36, 1.38 y 2.07 g/planta respectivamente (Tsuzuki *et al.*, 1985).

Con base en lo anterior, y considerando los síntomas de deficiencias nutricionales que presentaron las plantas durante el desarrollo del experimento, el crecimiento raquítico de las plantas y la carencia de respuesta a los diferentes tratamientos; el rendimiento bajo de materia seca se atribuye al suelo, que posiblemente posee concentraciones reducidas de otros nutrimentos. En este sentido la literatura indica, que en suelos calcáreos, como el que se uso en este estudio, el aprovechamiento de fósforo puede disminuir, debido a la formación de complejos de calcio insolubles. Así

mismo se reporta que en este tipo de suelos, las plantas cultivadas pueden presentar deficiencias de fierro, manganeso, cobre, boro y zinc; y que la absorción de potasio también se reduce (Buckman y Braddy, 1991; Foth, 1987; Tamhane et al., 1986).

En el caso concreto de la soya, Amparano (1973), al trabajar con tres suelos calcáreos procedentes de Pachuca, Hidalgo y 14 variedades de soya, estableció tres grupos definidos de este cultivo, con base en su respuesta a la deficiencia de fierro (clorosis férrica), calificando como sensibles a las variedades: Benville > Cajeme > Bragg > LeePAR61; entre las variedades tolerantes o adaptables a esta condición particular a Hemon 107 > II-S<sub>1</sub>-M-28-1970 > II-S<sub>1</sub>-M-16 > Davis 1971; quedando las demás variedades en un grupo intermedio. Asimismo observó, que en las variedades del grupo sensible y del grupo medianamente sensible, el grado de clorosis férrica se relacionó con la concentración de calcio presente en el suelo. En lo que se refiere a la nodulación, en algunas variedades no fue afectada, en tanto que en otras fue totalmente inhibida.

En el presente estudio se observaron los siguientes síntomas de deficiencias nutricionales: amarillamiento generalizado (clorosis) y nervaduras de color rojizo, las que se asocian con deficiencias de fierro y fósforo, y aun cuando durante el desarrollo del cultivo se aplicó una segunda dosis de fósforo, sulfato ferroso (foliar) y un fertilizante foliar llamado Aminol Fosnutren (mezcla de fósforo, fierro, zinc, cobre y manganeso), las plantas al ser cosechadas presentaron poco desarrollo y una coloración verde pálido, lo que indica que las medidas correctivas no fueron suficientes.

Debido a que en este experimento no se logró observar el efecto de la fertilización nitrogenada sobre la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merril, se procedió

a montar otro experimento, en el que se empleó un suelo Fluvisol (procedente del mismo municipio de Miacatlán). Los resultados se muestran en las Tablas 15 y 16, estos indican: la ausencia de rhizobia nativos en el suelo en estudio y que las cepas inoculadas lograron inducir la nodulación en ausencia y presencia de nitratos, aún cuando en todos los casos, el número y tamaño de los nódulos fue pequeño.

El análisis estadístico de los resultados de peso seco de la parte aérea (Tabla 16), indica que hay diferencias significativas; la prueba de Duncan permitió ubicar a los tratamientos dentro de cinco grupos: dos significativamente diferentes y tres intermedios. El mayor rendimiento, que corresponde al tratamiento en el que se aplicó fósforo, nitrógeno mineral y la cepa FQ-9 (a); el rendimiento más bajo al testigo absoluto (c); el tercer grupo (ab) incluye tres tratamientos: el fertilizado con nitrógeno y fósforo, el fertilizado con fósforo e inoculado con la cepa FQ-12 y el tratamiento fertilizado con nitrógeno, fósforo e inoculado con la mezcla de cepas; el cuarto grupo (abc) que permite demostrar la respuesta al fósforo y que ésta, aumentó ligeramente en presencia de la cepa FQ-9 o de la mezcla de cepas; finalmente en el quinto grupo (bc) se ubica al tratamiento fertilizado con nitrógeno y fósforo e inoculado con la cepa FQ-12.

Considerando lo anterior se puede afirmar que en este estudio, la variedad de soya en estudio (Júpiter) respondió a la adición de nitrógeno y de fósforo, así como a los inoculantes empleados, que fijaron nitrógeno en ausencia y presencia de nitrógeno mineral, lo que se tradujo en un incremento del peso seco con respecto al testigo absoluto.

La comparación del peso seco obtenido en el testigo absoluto con el registrado en los tratamientos inoculados (sin nitrógeno), indica que las cepas fijaron nitrógeno y

**TABLA 15**

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN Y SU INTERACCIÓN CON NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL DESARROLLO DE *Glycine max* (L.) MERRILL VAR. JÚPITER CULTIVADA EN UN FLUVISOL (EXPERIMENTO EN INVERNADERO)**

CEPA	TRATAMIENTO			NODULACIÓN	PESO SECO PARTE ÁEREA g/planta	PESO SECO % DE INCREMENTO RESPECTO A TEST. ABS.
	Kg/ha					
	N	P	K			
	0	0	0	-	1.32 c	
	0	60	0	-	1.57 abc	18.9
	70	60	0	-	1.83 ab	38.6
FQ-9	0	60	0	+	1.66 abc	25.8
FQ-12	0	60	0	+	1.80 ab	36.4
MEZCLA	0	60	0	+	1.71 abc	29.5
FQ-9	70	60	0	+	1.95 a	47.7
FQ-12	70	60	0	+	1.51 bc	14.4
MEZCLA	70	60	0	+	1.84 ab	39.4

- Ausencia de nódulos

+ Presencia de nódulos

TEST. ABS. Testigo Absoluto

El análisis de varianza indico que si hay diferencia significativa

TABLA 16

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS PESO SECO DE PARTE ÁEREA g/planta (FLUVISOL)

TRATAMIENTO	REPETICIONES			TRATAMIENTO	
				TOTAL (T <sub>i</sub> )	MEDIA (X <sub>i</sub> )
0	1.27	1.54	1.15	3.96	1.32
1	1.80	1.43	1.47	4.70	1.57
2	1.94	2.00	1.56	5.50	1.83
3	1.74	1.85	1.38	4.97	1.66
4	1.72	1.69	2.00	5.41	1.80
5	1.77	1.99	1.38	5.14	1.71
6	1.98	1.90	1.96	5.84	1.95
7	1.69	1.27	1.58	4.54	1.51
8	2.07	1.60	1.84	5.51	1.84

TOTAL PRINCIPAL 45.57  
 MEDIA PRINCIPAL 1.69

## ANÁLISIS DE VARIANZA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	SUMA DE CUADRADOS (sc)	CUADRADO MEDIO (cm)	F OBSERVADO	F REQUERIDO	
					5%	1%
TOTAL	26	1.77				
TRATAMIENTOS	8	0.92	0.120	2.55	2.51	3.71
ERROR	18	0.85	0.047			

Si hay diferencia significativa.

## SEPARACIÓN DE DUNCAN

Separación Significativa Mínima

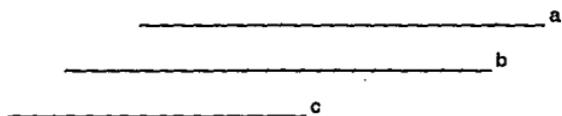
$$DSM = 0.37$$

DSMn:

Posición Relativa	2	3	4	5	6	7	8
Valores de R. 5%	1.00	1.05	1.08	1.10	1.12	1.13	1.13
DSMn = R(DSM)	0.37	0.39	0.40	0.41	0.41	0.42	0.42

Grupos Estadísticamente Diferentes:

Tratamiento	0	7	1	3	5	4	2	8	6
	1.32	1.51	1.57	1.66	1.71	1.80	1.83	1.84	1.95



originaron un incremento de materia seca de 25 a 36% con respecto al testigo absoluto; estos resultados coinciden con los reportes de otros estudios realizados en el mismo laboratorio, que indican que las cepas FQ-9 y FQ-12 son efectivas en la fijación de nitrógeno (Hernández y Meza, 1987; Monterrubio, 1987; Paredes y Flores, 1988) y que son específicas para la variedad de soya Júpiter (Ramírez-Gama *et al.*, 1992).

Al comparar el rendimiento de peso seco obtenido en los tratamientos inoculados (sin nitrógeno), con los de los tratamientos inoculados (con nitrógeno), se observa que la fijación de nitrógeno en la cepa FQ-12 fue inhibida, lo que se tradujo en la disminución del peso seco de 36 a 14%; en tanto que cuando se inoculó con la cepa FQ-9 o la mezcla de cepas (que también contenía a esta cepa), el rendimiento aumentó de 25 a 47% y de 29 a 39% respectivamente; comprobándose que las cepas rhizobianas varían en su respuesta a la presencia de nitratos (Danso *et al.*, 1987) y que la cepa FQ-9 (CB1809) es tolerante a nitratos (Sistachis, 1976; Mc.Neil, 1982; Herrigge *et al.*, 1984; Herrigge y Betts, 1988).

Considerando los resultados anteriores y el reporte de Senaratne *et al.* (1987), respecto a que la fijación de nitrógeno en presencia de nitratos depende de la interacción cepa rhizobiana-leguminosa, se puede afirmar que la asociación soya variedad Júpiter-cepa FQ-12 de Bradyrhizobium japonicum es sensible a la presencia de nitrógeno; en cambio la interacción soya variedad Júpiter-cepa FQ-9 de Bradyrhizobium japonicum es tolerante a la aplicación de nitrógeno, como se demuestra con el rendimiento obtenido en el tratamiento inoculado y fertilizado en el que se registró un rendimiento superior (47%), con respecto a los obtenidos en los tratamientos: en el que se agregó únicamente el inoculante (25%) o en el tratamiento con fertilizante mineral

(38%); lo que indica que esta asociación puede ser recomendada para aquellos suelos en los que hay necesidad de agregar fertilizante mineral o que tienen abundantes nitratos. Y que se puede optimizar el rendimiento de la soya variedad Júpiter mediante la aplicación simultánea de esta cepa y fertilizante nitrogenado.

En la tabla 17 se muestran los resultados del contenido de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  iniciales y residuales en el suelo Feozem, estos indican que el amonio fue transformado a nitratos y que el contenido de estos en vez de disminuir aumentó, lo que se atribuye a las deficiencias nutricionales que limitaron la absorción del nitrógeno disponible, afectando el desarrollo inicial de las plantas, así como el establecimiento de la simbiosis, lo que se tradujo en el crecimiento raquítrico de las plantas.

En la tabla 18 se observan los resultados del contenido de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  inicial y residual del suelo Fluvisol, y en la gráfica 2 se relacionan los resultados de peso seco de parte aérea con el porcentaje de  $\text{NO}_3$  residual; estos indican que aún cuando el contenido de nitrógeno disminuyó, este no fue agotado a través del experimento, y como era de esperarse la cantidad residual de nitratos fue mayor en los tratamientos fertilizados. Aún cuando el rendimiento de peso seco mostró diferencias estadísticamente significativas que indican la respuesta a la fertilización, a la inoculación de la cepa FQ-12 en ausencia de nitrógeno y a la inoculación de la cepa FQ-9 y de la mezcla de cepas en presencia de nitrógeno, con respecto al testigo absoluto, habría sido interesante efectuar esta evaluación en una etapa más avanzada de desarrollo del cultivo a fin de confirmar que los resultados obtenidos se manifiestan en el rendimiento final.

T A B L A 17

RESULTADOS DE CONTENIDO DE NITRÓGENO ( $\text{NH}_4$  Y  $\text{NO}_3$ ) EN EL SUELO AL INICIO Y FINAL DEL EXPERIMENTO (FEOZEM)

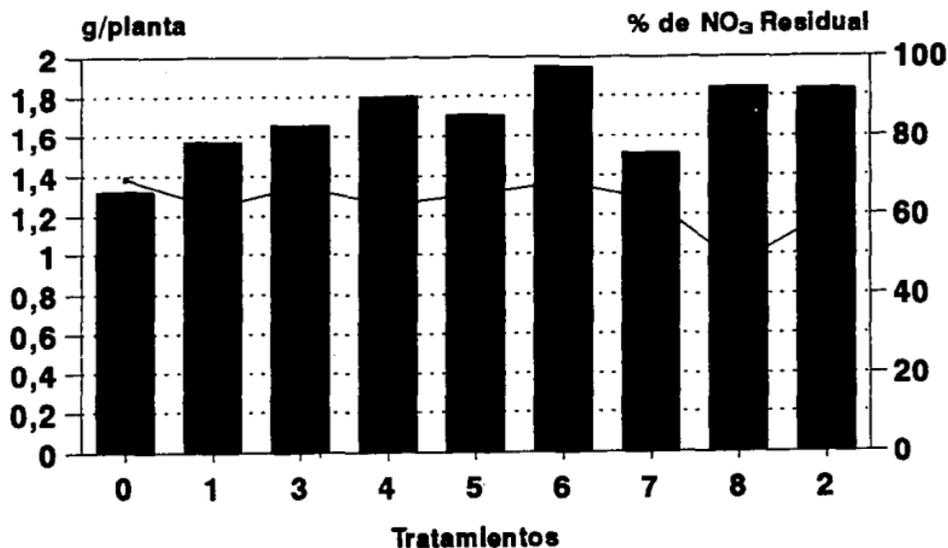
CEPA	TRATAMIENTO			$\text{NH}_4$ meq/100g		$\text{NO}_3$ ppm	
	Kg/ha			INICIAL	RESIDUAL	INICIAL	RESIDUAL
	N	P	K				
	0	0	0	0.04	0	41	47
	0	80	0	0.05	0.03	44	47
	50	80	0	0.32	0	81	97
	100	80	0	0.47	0	71	127
FQ-9	0	80	0	0.05	0	46	57
FQ-12	0	80	0	0.01	0	50	47
MEZCLA	0	80	0	0.02	0	52	47
FQ-9	50	80	0	0.34	0	85	129
FQ-12	50	80	0	0.31	0	65	112
MEZCLA	50	80	0	0.28	0	67	94
FQ-9	100	80	0	0.46	0	84	121
FQ-12	100	80	0	0.58	0	72	122
MEZCLA	100	80	0	0.41	0	63	108

**TABLA 18**

RESULTADOS DE CONTENIDO DE NITRÓGENO ( $\text{NH}_4$  Y  $\text{NO}_3$ ) EN EL SUELO AL INICIO Y FINAL DEL EXPERIMENTO (FLUVISOL)

CEPA	TRATAMIENTO Kg/ha			$\text{NH}_4$ meq/100g		$\text{NO}_3$ ppm	
	N	P	K	INICIAL	RESIDUAL	INICIAL	RESIDUAL
	0	0	0	0.13	0	110	76
	0	60	0	0.13	0.01	113	70
	70	60	0	0.65	0	205	123
FQ-9	0	60	0	0.16	0.01	107	72
FQ-12	0	60	0	0.19	0	108	68
MEZCLA	0	60	0	0.25	0	116	76
FQ-9	70	60	0	0.66	0	174	118
FQ-12	70	60	0	0.57	0.02	206	131
MEZCLA	70	60	0	0.70	0.02	201	96

**Gráfica 2. Peso seco de parte aérea  
y Nitrato Residual (Fluvisol)**



■ Peso seco — % NO<sub>3</sub> Residual

Tratamiento 0, 1, 3, 4 y 5 con 0KgN/ha.

Tratamiento 6, 7, 8 y 2 con 70KgN/ha.

#### 5.4 Ensayos Microbiológicos Adicionales

Considerando que el tamaño y número de los nódulos obtenidos fue reducido, no sólo en el suelo clasificado como Feozem sino también en el Fluvisol, se procedió a determinar la sobrevivencia de los rhizobia en el suelo y la presencia de posibles antagonistas que limitaran el desarrollo de las bacterias introducidas.

Los resultados expuestos en la tabla 19 indican que la sobrevivencia de la bacteria en los dos suelos en estudio fue baja, ya que después de la cosecha sólo se detectaron de 2 a 170 rhizobia/g de suelo en el caso del Feozem y de 6 a 580 rhizobia/g de suelo en el caso del Fluvisol. En la literatura se reportan de 295 a 1,250,000 rhizobia/g de suelo (Semu *et al.*, 1979; Abaidoo *et al.*, 1990).

Respecto a la presencia de antagonistas que limitaran el desarrollo de las bacterias en estudio, en ninguno de los suelos se registró la presencia de bacterias u hongos antagonistas a *Bradyrhizobium japonicum*, asimismo, en las placas bacterianas inoculadas con el filtrado de los extractos de suelo, no se observaron zonas líticas que indicaran la presencia de fagos.

TABLA 19

SOBREVIVENCIA DE *Bradyrhizobium japonicum* EN LOS DOS TIPOS DE SUELOS POR EL MÉTODO DE INFECCIÓN EN PLANTA

SUELO	kg N/ha	NMP DE RHIZOBIA/g DE SUELO		
		FQ-9	FQ-12	MEZCLA
FEOZEM	0	17.0	58.0	17.0
	50	17.0	1.7	ND
	100	5.8	170.0	ND
FLUVISOL	0	170.0	5.8	5.8
	70	5.8	580.0	ND

NMP Número Más Probable

ND No Determinado

## 6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El efecto del nitrógeno mineral sobre la interacción Bradyrhizobium japonicum-Glycine max (L.) Merrill-Suelo varía en función de la cepa, el hospedero y el tipo de suelo.

Los resultados del suelo Fluvisol permitieron:

- Confirmar la eficiencia de las cepas en estudio y su especificidad con la soya y concluir que:

- En presencia de suelo la cepa más eficiente corresponde a la FQ-12.

- El crecimiento de Glycine max (L.) Merrill variedad Júpiter es incrementado con la adición de fertilizante químico, así como con la inoculación de Bradyrhizobium japonicum..

- La respuesta a la inoculación fue similar o inferior a la obtenida con la aplicación de nitrógeno mineral.

- El rendimiento de la soya puede ser incrementado mediante la fertilización y utilización de interacciones cepa-variedad específicas y tolerantes a nitratos.

- De las interacciones en estudio, Bradyrhizobium japonicum FQ-9 -Glycine max (L.) Merrill variedad Júpiter se calificó como tolerante a nitratos, en tanto que la interacción Bradyrhizobium japonicum FQ-12 - Glycine max (L.) Merrill variedad Júpiter como sensible a nitratos.

- Los resultados obtenidos indican que aún cuando mediante estudios hidropónicos se haya logrado efectuar la selección de cepas y variedades capaces de establecer asociaciones eficientes, es indispensable evaluar el comportamiento de éstas en presencia de suelo, debido a que las características de éste influyen de manera decisiva en el establecimiento de la simbiosis y en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

- Asimismo se observó que en este tipo de estudios es conveniente establecer en el invernadero períodos de cultivo más prolongados que permitan el agotamiento en el suelo del nitrógeno mineral adicionado y de este modo establecer una comparación más real del efecto que ejerce el nitrógeno mineral absorbido, el nitrógeno atmosférico fijado o ambas fuentes de nitrógeno sobre el desarrollo de las plantas.

## 7.0 LITERATURA CITADA

Abaidoo, R. C.; T. George; B. B. Bohloul and P. W. Singleton 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grow soybean and common bean. Can. J. Microbiol. 36: 92-96.

ADIFAL. 1986. Fijación Biológica de Nitrógeno. . Volumen VIII Número 15 Mayo-Junio pp: 9-20.

Alcantar G., G. y M. L. Champigny. 1988. La acción del nitrato sobre algunas enzimas en los nódulos de soya inoculada con Rhizobium japonicum N<sup>+</sup> o N<sup>-</sup>. Terra 6: 19-25.

Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editores. México. 491 p.

Amparano C., F. 1973. Evaluación del comportamiento y la susceptibilidad a la clorosis férrica de 14 variedades de soya en suelos calcáreos bajo condiciones de invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 172 p.

Avilés G., M. 1986. Plagas de la Soya en el Valle de Culiacan. SARH-INIFAP. Folleto Técnico No. 7. Culiacan, Sinaloa, México. 24 p.

Barriga S., C. y J. Nieto H. 1983. Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola de la Soya. SARH-INIA México. 15 p.

Board, E. J. and A. G. Caldwell. 1991. Response of determinate soybean cultivars to low pH soils. Plant and Soil 132: 289-292.

Bowen, J. E. y B. Kratky. 1982. Nitrógeno, Fijación Biológica en Leguminosas Tropicales. Agricultura de las Americas.

Brill, W. J. 1977. Biological Nitrogen Fixation. Scientific American 236(3): 68-81.

Brill, J. E. 1981. Agricultural Microbiology. Scientific American 245(3): 146-156.

Buckman, H. O. y N. C. Brady. 1991. Naturaleza y Propiedades de los Suelos. UTEHA Grupo Noriega Editores. México. pp: 404-425.

Castillo T., N.; L. Montoya C.; J. X. Uvalle B.; O. Moreno R.; F. López L.; J. L. Martínez C.; E. Contreras C. y E. Ortiz E. 1986. Guía para Producir Soya en el Valle del Yaqui. SARH-INIFAP Folleto de Productores No. 13. Cd. Obregón, Sonora, México. 24 p.

- Cordoba U., R. 1985. Evaluación de la turba nacional como soporte para inoculantes de leguminosas con cepas de Rhizobium japonicum. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México. 81 p.
- Crispín M., A. y C. Barriga S. 1990. El cultivo de la soya (Glycine max L.) en México pp: 553-593. En: R. Robles S.(Ed.). Producción de Granos y Forrajes. Noriega Editores Limusa. México.
- Danso, S. K. A.; C. Hera and C. Douka. 1987. Nitrogen fixation soybean as influenced by cultivar and Rhizobium strain. Plant and Soil 99: 163-174.
- Dazzo, F. B. 1981. The mechanism of recognition between legume roots and rhizobia: some implication for Biological Nitrogen Fixation in the tropic. pp: 115-127. In: P. H. Graham and S. C. Harris (Eds.). Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture CIAT Cali, Colombia.
- Domínguez R., V. y N. Aguilera H. 1984. Metodología del Análisis Físico-Químicos de Suelos. Lab. de Inv. de Edafología Fac. de Ciencias UNAM, México. 34 p.
- Eaglesham, A. R. J.; S. Hassouna and R. Seegers. 1983. Fertilizer-N effects on N fixation by cowpea and soybean. Agronomy Journal 75: 61-67.
- Eaglesham, A. R. J. and A. Ayanaba. 1984. Tropical Stress Ecology of Rhizobia, Root Modulation and Legume Fixation. pp: 1-35. In: N. S. Subba Rao (Ed.). Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Edward Arnold. New Delhi, India.
- Echegaray A., A. y R. M. Ramírez-Gama, 1986. Prácticas de Microbiología Agrícola. Fac. de Química UNAM, México. 66 p.
- Elkan, H. G. 1984. Taxonomy and Metabolism of Rhizobium. pp: 1-37. In: M. Alexander (Ed.). Biological Nitrogen Fixation. Plenum Press New York and London.
- FAO.1985. Inoculantes para Leguminosas y su Uso. Proyecto de Fijación de Nitrógeno por Leguminosas de Agricultura Tropical (NIFTAL), EE.UU. y Servicio de Fertilizantes y Nutrición de las Plantas de la FAO, Dirección de Fomento de Tierras y Aguas. Italia. 61 p.
- Foth, D. H. 1987. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. CECSA. México. pp: 223 y 224.
- Gibson, A. H. and J. E. Harper. 1985. Nitrate effect on nodulation of soybean by Bradyrhizobium japonicum. Crop Science 25: 497-501.

- Hardarson, G.; F. Zapata and S. K. A. Danso. 1984. Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. Plant and Soil 82: 397-405.
- Harper, J. E. 1974. Soil and Simbiotic Requirements for Optimum Soybean Produccion. Crop Science 14: 255-260.
- Harper, J. E. and A. H. Gibson. 1984. Diferential Nodulation Tolerance to Nitrate Among Legume Species. Crop Science 24: 797-801.
- Hernández R., F. F.; P. Paredes V.; J. Alvarado M.; J. R. Manjarrez S.; F. Mascareño C.; O. Bueno B. y M. A. Sánchez C. 1985 Gufa para Producir Soya de Verano en el Valle de Culiacan. SARH-INIA. Folleto para Productores No. 13. Culiacan, Sinaloa, México.
- Hernández S., G. y M. G. Meza F. 1987. Inoculación de Rhizobium japonicum en diferentes variedades de soya (nivel invernadero). Tesis de Licenciatura. Fac. de Química UNAM, México. 92 p.
- Herridge, D. F.; R. J. Roughley and J. Broakwell. 1984. Effect of Rhizobia and Soil Nitrate on the Establishment and Functioning of the Soybean Symbiosis in the Field. Aust. J. Agric. Res. 35: 149-161.
- Herridge, D. F. and J. H. Betts. 1988. Field evaluation of soybean genotypes selected for enhanced capacity to nodulate and fix nitrogen in the presence of nitrate. Plant and Soil 110: 129-135.
- Jackson, M. L. 1982. Análisis Químico de Suelos. Traducción al Español de J. Beltran M. Ediciones Omega. Barcelona, España. 662 p.
- Jordan, D. C. 1984. Fam. III Rhizobiaceae Conn 1938, 321. pp: 234-244. In: N. R. Krieg and C. Holt (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore Vol. 1.
- Kaurichev, I. S.; N. P. Panov; M. V. Stratonóvich; I. P. Grechin; V. I. Sávich; N. F. Ganzhara y A. P. Mershin. 1984. Prácticas de Edafología. Editorial Mir. Moscú. 86 p.
- Kucey, R. M. N.; P. Chawanakupt; N. Boonkerd; P. Snitwongse; C. Siripaibool; P. Wadisirisuk and T. Arayangkool. 1989. Nitrogen fixation (N-15 dilution) with soybean under Thai field conditions. IV Effects of N addition and Bradyrhizobium japonicum inoculation in soils with indigenous B japonicum populations. Journal of Applied Bacteriology 67: 137-144.

Lawson, Ch. G. R.; B. J. Carroll and P. M. Gresshoff. 1988. Allevation of nitrate inhibition of soybean nodulation by high inoculum does not involve bacterial nitrate metabolism. Plant and Soil 110: 123-127.

López G., H.; F. F. Hernández R. y A. Hernández F. 1985. Rosales S-80 y Tamazula S-80 Nuevas Variedades de Soya para Sinaloa. SARH-INIA. Folleto Técnico No. 5. Culiacan, Sinaloa, México. 8 p.

Maldonado M., N.; S. De la Paz G. y Ma. A. Peña R. 1982. Guía para Cultivar Soya en las Huastecas. SARH-INIA. Folleto para Productores No. 4. Tampico, Tamaulipas, México. 36 p.

Martensson, A. M.; L. Brutti and H. Ljunggren. 1989. Competition between strains of Bradyrhizobium japonicum for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. Plant and Soil 117: 219-225.

Mc.Neil, D. L. 1982. Variations in ability of Rhizobium japonicum strains to nodulate soybeans and maintain fixation in the presence of nitrate. Applied and Environmental Microbiology 44(3): 647-652.

Matson, A. J. 1956. Methods of chemical analysis for soil for survey samples. Boletín No.12 de la Ofna. de Suelos Depto. de Investigación Industrial y Científica de Nueva Zelanda. Aust.Wellington, Nueva Zelanda. 55 p.

Monterrubio S., Ma. P. 1987. Efecto de la inoculación en soya cultivada en dos Suelos de Temporal del Trópico Húmedo del Estado de Campeche. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química UNAM, México. 86 p.

Montoya C., L. y N. Castillo T. 1989. Harbar 88 Nueva Variedad de Soya. SARH-INIFAP. Folleto Técnico No. 13. Cd. Obregón, Sonora, México. 11 p.

Moreno D., R. 1978. Clasificación Tentativa para Suelos y Aguas Agrícolas. SARH-INIA México. 45 p.

Munérva, F. and A. G. Wollum. 1981. Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans. Soil Sci. Soc. Am. J. 45: 1113-1120.

Norris, D. O. and A. R. Date. 1976. Legume Bacteriology. pp: 134-174. In: H. N. Show and W. N. Bryan (Eds.). Tropical Pasture Research Principles and Methods. Hurley, England Common welth Bureau of Pastures and Fields Crops, Bulletin 51.

- Osorio R., L. y F. A. Pedraza M. 1985. Guía para Cultivar Soya de Riego en la Zona Central de Tamaulipas. SARH-INIA. Folleto para Productores No. 1. Abasolo, Tamaulipas, México. 18 p.
- Paredes M., R. E. y M. Flores B. 1988. Respuesta de cuatro variedades de Glycine max (L. Merr.) a la inoculación con Bradyrhizobium japonicum bajo condiciones controladas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química UNAM, México. 68 p.
- Paredes V., P. H.; O. Bueno B.; R. Leyva G.; J. Alvarado M.; F. F. Hernández R. y P. Manjarrez S. 1984. Guía para Producir Soya de Invierno para Producir Semilla en el Valle de Culiacan. SARH-INIA. Folleto para Productores No. 14. Culiacan, Sinaloa, México. 20 p.
- Peres R., J. R. y C. Vidor. 1980. Selección de estirpes de Rhizobium japonicum e competitividae por sitios de infección nodular en cultivares de soja (Glycine max (L.) Merrill). Agronomia Sulriograndense. Porto Alegre 16(2): 205-219.
- Ramírez-Gama., R. M.; G. Meza F.; G. Hernández S.; G. Tsuzuki R. y G. Valencia. 1992. Inoculación de Bradyrhizobium japonicum en diferentes variedades de soya (Glycine max L.). Terra 10(2): 201-210.
- Reza A., R.; R. R. Archundia R. y G. Fraire V. 1983. Como Cultivar Soya en la Región del Soconusco. SARH-INIA. Folleto para Productores No. 1. Tapachula, Chiapas, México. 12 p.
- Reza A., R.; J. Nieto H. y R. O. Pacheco G. 1989. Tapachula 86 Nueva Variedad de Soya para la Costa de Chiapas. SARH-INIA. Folleto Técnico No. 1. Tapachula, Chiapas, México. 11 p.
- Sánchez P., A. 1988. Cultivo Oleginosas, Manuales para Educación Agropecuaria, Área Producción Vegetal. Editorial Trillas. México. pp: 11 - 22.
- SARH. 1976. Fitofilo. SARH-Dirección General de Sanidad Vegetal. Núm. 71. pp: 101 y 102.
- SARH. 1982. Ciclos de Cultivo, Diagrama de las Principales Especies Vegetales en las Cuales se Efectúan Investigaciones Agrícolas. Departamento de Difusión Técnica. SARH-INIA, México. pp: 76 y 77.
- SARH. 1987. Guía para Producir Soya en el Valle de Mexicali. SARH-INIFAP. Folleto para Productores No. 9. Mexicali, Baja California, México. 10 p.
- SARH. 1989. Guía para Cultivar Soya de Temporal en la Costa de Nayarit. SARH-INIFAP. Folleto para Productores No. 3. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 21 p.

SARH. 1990. El Cultivo de la Soya de Riego en la Zona Media de San Luis Potosí. SARH-INIFAP. Folleto para Productores No. 4. San Luis Potosí, S.L.P., México. 12 p.

SARH. 1991a. Varietades Recomendadas de los Principales Cultivos con Indicaciones para las Epocas de Siembra y Cosecha, Ciclo Otoño-Invierno 1990-1991. SARH-Dirección General de Política Agrícola, Comité Clasificador de Varietades de Plantas, y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México. 130 p.

SARH. 1991b. Varietades Autorizadas de los Principales Cultivos con las Indicaciones para las Epocas de Siembra y Cosecha, Ciclo Primavera-Verano 1991. SARH-Dirección General de Política Agrícola, Comité Clasificador de Varietades de Plantas, y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. México. 173 p.

SARH. 1992a. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1991. SARH-Subsecretaría de Planeación, México. Tomo I, pp: 218-219.

SARH. 1992b. Boletín Mensual de Información Básica del Sector Agropecuario y Forestal, Avances a Julio de 1992. SARH-Subsecretaría de Planeación, México. pp: 4-9.

SARH. 1992c. Granos, México en el Contexto Agrícola Mundial 1980-1990. SARH-Subsecretaría de Planeación, México. pp: 51-63.

SARH. 1992d. Varietades Recomendadas de los Principales Cultivos con las Indicaciones para las Epocas de Siembra y Cosecha, Ciclo Otoño-Invierno 1992-1993. SARH-Dirección General de Política Agrícola, Comité Clasificador de Varietades de Plantas, y Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, México. 150 p.

Saules G., R. 1986. Estudio de algunas características físicas y químicas del suelo, en relación al cultivo de soya inoculada con *Rhizobium*, Sta. Cruz Acapulxca, Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química UNAM, México. 88 p.

Scott, O. W. y R. Aldrich S. 1975. Producción Moderna de la Soja. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 192 p.

Semu, E.; D. J. Hume and C. T. Corke. 1979. Influence of soybean inoculation and nitrogen levels on populations and serogroups of *Rhizobium japonicum* in Ontario. Can. J. Microbiol. 25: 739-745.

- Senaratne, R.; C. Amornpimol and G. Hardarson. 1987. Effect of combined nitrogen on nitrogen fixation of soybean (Glycine max L. Merrill) as affected by cultivar and rhizobial strain. Plant and Soil 103: 45-50.
- Sistachis, E. 1976. Inoculation and nitrogen fertilizer experiments on soybean in Cuba. pp: 281-288. In: P. S. Nutman (Ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. International Biological Programme 7. Cambridge University Press. Great Britain.
- Somasegaran, P. and B. B. Boohool. 1990. Single-strain versus Multistrain Inoculation: Effect of Soil Mineral N Availability on Rhizobial Strain Effectiveness and Competition for Nodulation in Chick-pea, Soybean and Dry Bean. Applied and Environmental Microbiology 56(11): 3298-3303.
- Streter, J. G. 1985a. Nitrate Inhibition of Legume Nodule Growth and Activity, I Long Term Studies with a Continuous Supply of Nitrate. Plant Physiology 77: 321-324.
- Streter, J. G. 1985b. Nitrate Inhibition of Legume Nodule Growth and Activity, II Short Term Studies with High Nitrate Supply. Plant Physiology 77: 325-328.
- Tamhane, V. R.; P. D. Motiramani y P. Y. Bali. 1986. Suelos: su Química y Fertilidad en Zonas Tropicales. Diana Tecnico. México. pp: 206-213.
- Tsuzuki R., M. G.; M. P. Monterrubio S.; G. Valencia y R. M. Ramírez-Gama. 1985. Efecto de la Inoculación en Soya en Suelos de Temporal del Trópico Húmedo. pp: 26. En: Resúmenes de la Tercera Reunión Sobre la Fijación Biológica de Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- Venturi, G. y M. Amaduci. T. 1988. La Soja. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 254 p.
- Vigue, J. T.; J. E. Harper; R. H. Hageman and D. B. Peters. 1977. Nodulation of Soybean Grown Hidroponically on Urea. Crop Science 17: 169-171.
- Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Module Bactere. Internacional Biological Programme. No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. 200 p.
- Yepez G., A. 1988. La soya (Glycine max L.) su factibilidad de cultivo en el Sureste de México. Tesis de Licenciatura. UACH Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 59 p..

## 8.0 APÉNDICE

## MEDIOS DE CULTIVO

## Caldo Extracto de Levadura Manitol (CELM)\*

Manitol	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
Extracto de Levadura	0.4g
Agua Destilada	1000ml
pH	6.8-7.0

## Extracto de Levadura Manitol Agar - Rojo Congo (ELMARC)\*

Lo mismo que en CELM más:

Agar	15.0g
Solución Acuosa Rojo Congo (1/400)	10ml/Lt
CaCO <sub>3</sub> (unicamente para tubos incli- nados)	3.0g

## Gelosa Nutritiva (GN)\*

Extracto de Carne	3.0g
Peptona	5.0g
Agar	15.0g
Agua Destilada	1000ml
pH	6.5-7.0

\* Esterilizar a 121<sup>0</sup>C, 15lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos

**Solución Nutritiva de Jensen Libre de Nitrógeno.**

$\text{CaHPO}_4$	1.0g
$\text{K}_2\text{PO}_4$	0.2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
$\text{NaCl}$	0.2g
$\text{FeCl}_3$	0.1g
Micronutrientes	1ml/Lt de Solución Nutritiva
Agua Destilada	1000ml

**Micronutrientes:**

$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.05%
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05%
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005%
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005%
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.002%
Agua Destilada	100ml

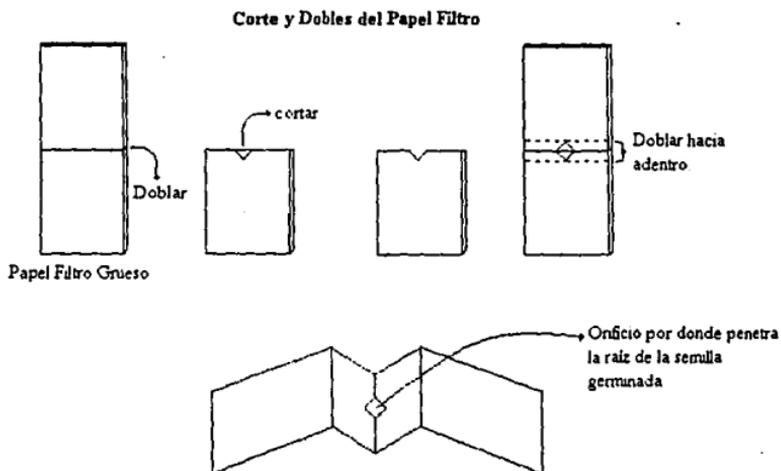
La Solución Nutritiva se ajusta a pH 6.5-7.0

Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$ , 15lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos

Antes de usarse la Solución Nutritiva se diluye 1:4 con agua destilada.

Figura 1

UNIDADES EXPERIMENTALES PARA ENSAYO DE INFECCIÓN EN PLANTA (NMP)



BASTIDOR DE MADERA PARA SOPORTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

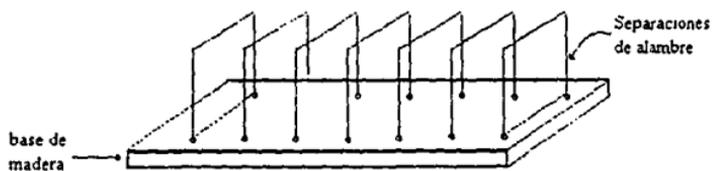


Figura 2

DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE  
*Bradyrhizobium japonicum* POR EL MÉTODO DE  
INFECCIÓN EN PLANTA (NMP)

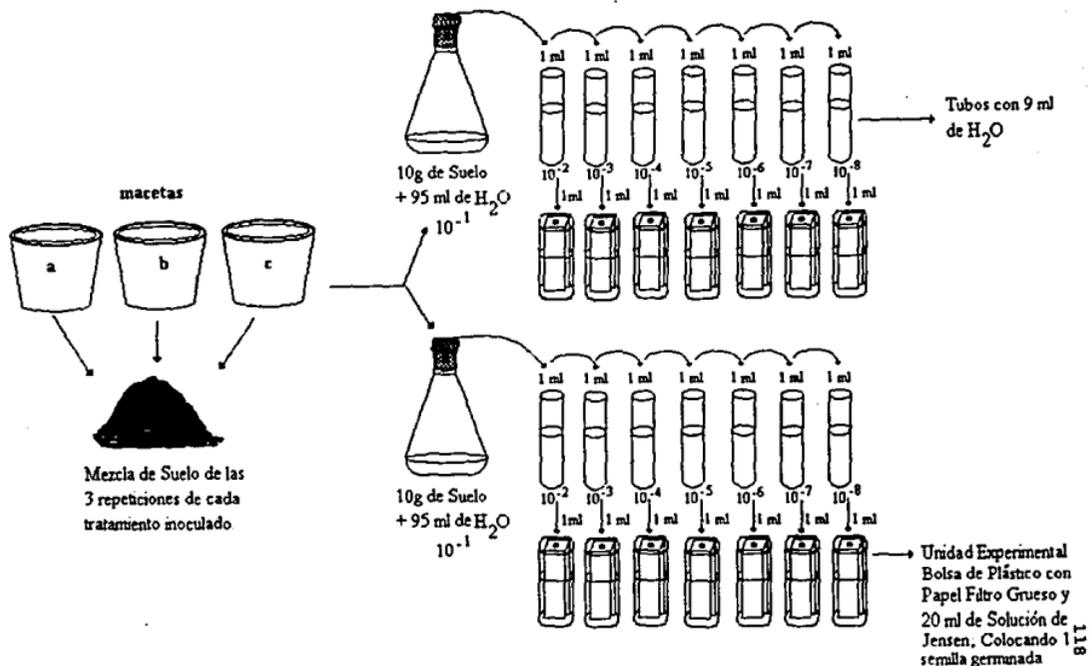
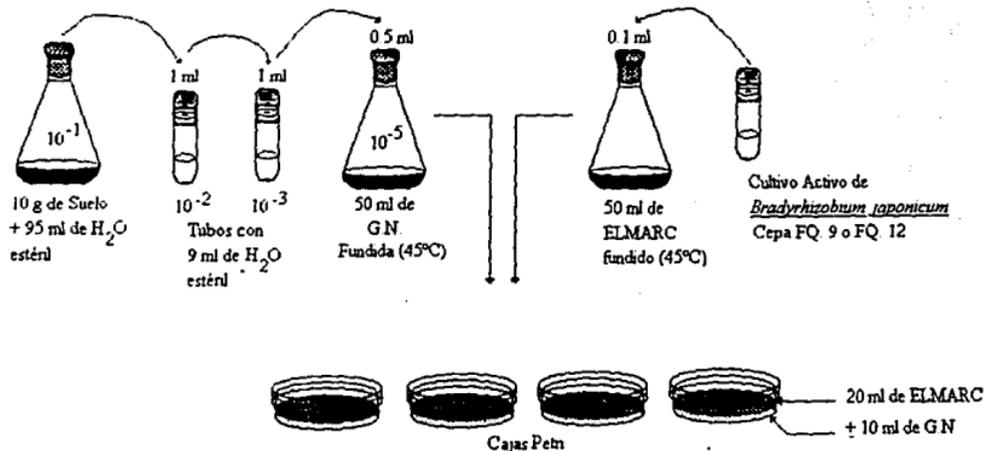


Figura 3

**ANTAGONISMO POR MICROFLORA GENERAL DEL SUELO**



La capa de GN. se incubo a 28°C durante 48 horas,  
y después se añadió la capa de ELMARC incubandose  
a 28°C durante 7 días.

Figura 4

ANTAGONISMO POR  
FAGOS DEL SUELO

