

00361

32  
zeje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS  
SELECCIONADAS DE *Bradyrhizobium japonicum*  
SOBRE EL RENDIMIENTO DE SOYA EN ZONAS  
DE TEMPORAL DEL TRÓPICO HÚMEDO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

MÉXICO, D.F.

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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS  
SELECCIONADAS DE *Bradyrhizobium japonicum*  
SOBRE EL RENDIMIENTO DE SOYA EN ZONAS  
DE TEMPORAL DEL TRÓPICO HÚMEDO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES**

**DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA**

DEDICATORIA

A MIS PADRES  
con infinito respeto, amor y gratitud

A mis hermanas, hermanos y sobrino  
con cariño

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la M. en C. Rosa María Ramírez Gama por el gran apoyo e interés brindado a mi formación profesional, por la confianza depositada en mí y por su amistad.

Al M. en C. Alfredo Echegaray Alemán por su contribución en mi formación profesional.

Al Jurado:

Dr. Teófilo Herrera Suárez

Dr. David Flores Román

Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras

M. en C. Rosa María Ramírez Gama

M. en C. Lucía Yolanda Varela Fregoso

M. en C. Nicolás Aguilera Herrera

M. en C. Alfredo Francisco Echegaray Alemán

Gracias por sus sugerencias en la presentación escrita de este trabajo.

A la M. en C. María Eugenia Ceballos Silva por su valiosa asesoría en el análisis estadístico.

A todos, gracias por su aportación y ejemplo de profesionalismo.

Al Instituto de Investigaciones Alimentarias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, e Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Unidad Querétaro) por hacer posible el estudio de las cepas en experimentos de campo.

Al Dr. Jorge Nieto Hatem, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por proporcionar las semillas de las variedades de soya utilizadas en este trabajo.

Al Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, así como a su personal académico y técnico por el apoyo brindado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación Profesional.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para alcanzar esta meta.

Gracias

## ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	3
2.2 Importancia de las leguminosas	4
2.3 Factores limitantes en la asociación <u>Rhizobium</u> -leguminosas	7
2.3.1 Principales factores limitantes del suelo	
2.3.1.1 Minerales.	7
2.3.1.2 Microbiota.	8
2.3.2 Factores limitantes de la planta hospedera	8
2.3.3 Características de la bacteria que afectan a la asociación <u>Rhizobium</u> -leguminosa	12
2.4 Criterios de selección de cepas	13
2.5 Competitividad	17
2.6 El cultivo de la soya en México y el uso de la tecnología de inoculación.	20
3. O B J E T I V O S	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
4.1 Descripción general del trabajo realizado y origen de las cepas de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .	28
4.2 Ensayos de laboratorio.	28
4.2.1 Serología	28
4.2.1.1 Preparación de antígenos celulares.	28
4.2.1.2 Preparación de sueros inmunes.	31
4.2.1.3 Determinación del título de anticuerpos en sueros inmunes.	31
4.2.1.4 Reacciones cruzadas entre cepas y sueros inmunes	31
4.2.1.5 Identificación serológica de las cepas ocupantes de los nódulos.	32

4.2.2 Producción de inoculantes.	32
4.2.2.1 Inoculantes líquidos.	32
4.2.2.2 Inoculantes sólidos.	33
4.2.2.3 Control de calidad.	33
4.3 Ensayos de invernadero (EI).	33
4.3.1 Unidad experimental.	33
4.3.2 Solución nutritiva.	34
4.3.3 Muestras de suelo.	34
4.3.4 Preparación de hospederos.	34
4.3.5 Inoculación.	34
4.3.6 Condiciones de desarrollo del cultivo.	34
4.3.7 Tratamientos.	35
4.3.8 Diseño experimental.	37
4.3.9 Determinaciones.	38
4.4 Ensayos en campo (EC).	38
4.4.1 Ensayo en el municipio de González, Tamaulipas (EC-1).	39
4.4.2 Ensayo en el municipio de Apaseo El Alto, Guanajuato (EC-2).	39
4.4.3 Ensayo en el municipio de Mante, Tamaulipas (EC-3).	39
4.5 Análisis estadístico.	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1 Serología.	43
5.1.1 Título de anticuerpos de los sueros inmunes.	43
5.1.2 Reacciones de aglutinación cruzada que presentaron las ocho cepas de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> .	44
5.2 Control de calidad de los inoculantes.	46

5.3 Comprobación de la infectividad y efectividad en la fijación de nitrógeno de las cepas en estudio y determinación de su habilidad competitiva.	49
5.3.1 Infectividad.	49
5.3.2 Efectividad en la fijación de nitrógeno.	54
5.3.3 Eficiencia de la asociación.	55
5.3.4 Determinación de la habilidad competitiva de las cepas en estudio.	58
5.4 Expresión de la efectividad de la fijación de nitrógeno y habilidad competitiva de las cepas al interactuar con suelo (EI-3).	62
5.4.1 Habilidad competitiva de las cepas en muestras de suelo de los municipios de Mante, González, y Llera, Tamaulipas.	65
5.5 Validación de las cepas bajo condiciones específicas de campo.	71
5.5.1 Ensayo en el municipio de González, Tamaulipas (EC-1).	71
5.5.2 Ensayo en el municipio de Mante, Tamaulipas (EC-3).	74
5.5.3 Ensayo en el municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato (EC-2).	76
6. CONCLUSIONES	82
6.1 Ensayos en invernadero.	82
6.1.1 Sistemas hidropónicos.	82
6.1.2 Sistema de macetas con muestras de suelo	
6.2 Experimentos de campo.	
6.3 Respecto a la metodología	
7. LITERATURA CITADA	84
8. APÉNDICE	93
Análisis estadístico.	93
I. Efectividad e infectividad.	93
II. Competitividad.	96

## RESUMEN

En México el cultivo experimental de la soya (Glycine max L. Merrill) se inició en 1911, y se estableció en forma comercial en 1959. A partir de entonces su producción se ha incrementado, sin embargo no se ha logrado satisfacer la demanda nacional por lo que se siguen realizando importaciones de esta leguminosa.

Una de las alternativas para incrementar la producción de leguminosas es la utilización de inoculantes a base de microorganismos fijadores de nitrógeno como Rhizobium y Bradyrhizobium. El éxito de esta tecnología implica el uso de inoculantes de buena calidad los que deben contener un número elevado de bacterias, y éstas deben ser: infectivas, efectivas en la fijación de nitrógeno, competitivas y tolerantes a condiciones adversas.

Es necesario efectuar experimentos a nivel invernadero con el fin de seleccionar aquellas cepas que reúnan las características antes mencionadas, y comprobar este comportamiento en condiciones de campo.

En México se han utilizado diferentes inoculantes comerciales, sin embargo existen reportes de que éstos no siempre conducen al resultado deseado; aspectos que han sido comprobados en el estado de Tamaulipas. Por lo anterior se han iniciado programas de selección de cepas con base en su capacidad fijadora de nitrógeno y capacidad para establecer asociaciones eficientes con diferentes variedades de soya que se cultivan comercialmente en México.

Para dar continuidad a estos estudios, en el presente trabajo se estableció como objetivo primordial, determinar la capacidad competitiva de 7 cepas previamente seleccionadas por su efectividad en la fijación de nitrógeno, y capacidad para establecer asociaciones eficientes con diferentes variedades de soya. Con tal fin se procedió: a validar la infectividad y efectividad de cepas de Bradyrhizobium japonicum previamente seleccionadas, y a determinar competitividad mediante ensayos serológicos en nódulos procedentes de tratamientos inoculados con mezclas de cepas. Estos ensayos se hicieron tanto en cultivos hidropónicos como en presencia de suelo, en este último caso se efectuó en condiciones de invernadero y en diferentes ensayos de campo, lo que permitió evaluar el comportamiento de las cepas bajo diferentes condiciones ambientales.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar que las cepas conservan las características por las que fueron previamente seleccionadas.

De los ensayos de invernadero, bajo condiciones microbiológicas controladas se determinó el siguiente esquema de la habilidad competitiva de las cepas:

FQ17 > (FQ18-FQ9) > (FQ12-FQ7) > (FQ4-FQ16)

Sin embargo, cuando se determinó la habilidad competitiva de las mismas en presencia de suelo, el anterior esquema cambió y la respuesta indicó que las características del suelo son determinantes en la expresión de la competitividad.

En los experimentos de campo, las cepas en general mostraron buena habilidad competitiva frente a la biota nativa, superando a los inoculantes comerciales con los que se compararon; sin embargo, debido a que la cepa FQ17 expresa sus características de efectividad y competitividad en las diferentes localidades que se estudiaron, se presenta como la cepa más promisoría.

## 1. INTRODUCCIÓN

Para alimentar adecuadamente a la creciente población mundial es esencial que la producción de alimentos sea incrementada, especialmente en los países en vías de desarrollo. Por ello, un número cada vez mayor de científicos se ha involucrado en la solución de problemas directamente relacionados con la agricultura tropical (Eaglesham y Ayanaba, 1984).

De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO), de los 3200 millones de hectáreas potencialmente cultivables sólo se utiliza la mitad, la otra mitad no puede dar lugar a aumentos significativos, ya que para hacerla productiva se requiere de fuertes inversiones.

Las leguminosas representan un gran potencial en el mantenimiento de la fertilidad del suelo, además, las leguminosas de grano proporcionan semilla de gran valor nutritivo y, cuando están efectivamente noduladas producen buen rendimiento en suelos deficientes en nitrógeno, donde con los cereales y otros cultivos no se obtienen tales rendimientos (Eaglesham y Ayanaba, 1984).

Una de las leguminosas ampliamente explotada a nivel mundial corresponde a Glycine max L. Merrill (soya). En México, la producción de esta leguminosa se ha mantenido mas o menos constante (SARH, 1992a); sin embargo las importaciones de este grano se han incrementado. Así, de enero a diciembre de 1990 la importación de soya representó un gasto de \$ 217,476,000 (US) y en 1991 se incrementó a \$ 348,513,000 (US) (SARH. 1992b).

Una posible solución que permita disminuir las importaciones y en general para cubrir las necesidades de esta leguminosa, es la implantación de cultivos en zonas donde nunca se ha sembrado.

Con el objeto de incrementar la producción, además de introducir el cultivo en nuevas áreas, se ha aplicado la tecnología de inoculación, sin obtener gran éxito, por lo que se han abordado estudios tendientes a seleccionar cepas que logren una asociación eficiente con las variedades recomendadas en las condiciones específicas de las regiones de cultivo (Programa de Fertilidad Estatal, 1977; 1979; Tsuzuki et al., 1985; Márquez-Berber et al., 1985; Orihuela et al., 1985; Mercado y Márquez-Berber, 1985; Cota et al., 1985; Armenta, 1985; Muñoa et al., 1989.)

El presente trabajo constituye una aportación a estos programas de mejoramiento de la producción de soya en México, y consistió en determinar la habilidad de las cepas de Bradyrhizobium japonicum, para competir por los sitios de infección nodular (competitividad) con las demás cepas de colección utilizadas y con la biota nativa de los suelos probados. A las cepas usadas se les confirmó en primer lugar las características siguientes: a) habilidad para infectar y formar nódulos (infectividad), b) habilidad para fijar

el nitrógeno atmosférico (efectividad) y c) habilidad para nodular y fijar nitrógeno con un intervalo amplio de variedades de soya (interespecificidad), características por las cuales fueron seleccionadas en estudios previos.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

Las plantas requieren nitrógeno en grandes porcentajes debido a que este elemento constituye el 40-50% de la materia seca del protoplasma de sus células, y por lo mismo, es la clave de la fertilidad del suelo.

La utilización de fertilizantes nitrogenados químicos mantiene o mejora los niveles de nitrógeno del suelo y son aplicados en sistemas agrícolas intensivos, ya que permite buenos rendimientos en cultivos continuos. A finales de la década de los 70's aproximadamente 20 millones de toneladas de fertilizante nitrogenado (1/3 del consumo mundial) estaba utilizándose en los países en vías de desarrollo (Stangel, 1979 citado por App y Eaglesham, 1982). Subba Rao, 1980 (citado por Cárdenas y Espinoza, 1991) presentó valores estimados para el período 1980-2000 del incremento que habrá en la demanda mundial por nitrógeno, el cual será en estas regiones, del 39% del consumo mundial. Sin embargo se han observado ciertas limitaciones que corresponden a: la elevación de costos, rendimientos bajos debidos a desnitrificación y lixiviación, especialmente en condiciones tropicales, y contaminación de aguas subterráneas con nitratos (Dreyfus *et al.*, 1987). Por otra parte se debe considerar que los fertilizantes químicos nitrogenados son producidos a través del proceso Haber-Bosch mediante la combinación del nitrógeno molecular presente en el aire y el hidrógeno proveniente de gas natural, en presencia de temperatura alta y un catalizador. A partir de una tonelada de hidrocarburo se producen aproximadamente dos toneladas de amoniaco; lo cual indica que el costo de los fertilizantes nitrogenados depende del costo de los hidrocarburos. Como ejemplo de lo anterior se tiene la producción de sulfato de amonio en México para diciembre de 1991, cuyo volumen de 83,536 Ton. corresponde a un valor de N\$ 21,024,000 (Banco de datos INEGI).

En los países de escasos recursos económicos, deben adaptarse regímenes agrícolas de bajo consumo energético. De este modo, para incrementar la aportación de nitrógeno disponible para la producción agrícola en los trópicos, además del uso de fertilizantes químicos nitrogenados, se tienen otras dos opciones: una es el uso de desechos orgánicos y abonos verdes, la cual ha sido utilizada en la agricultura tradicional durante siglos y ha proporcionado buenos resultados, especialmente en la República Popular de China, sin embargo en otras regiones no se emplean estas fuentes debido a aspectos culturales, sociales y económicos.

La otra alternativa corresponde a la explotación de la fijación biológica del nitrógeno. Este proceso es efectuado por numerosos organismos procariontes, entre los cuales las bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium en asociación con leguminosas, tienen la capacidad de transformar el nitrógeno atmosférico

(inerte) en la forma útil para la síntesis de sus proteínas. La energía para este proceso proviene de los fotosintatos proporcionados por la planta hospedera y se lleva a cabo en los nódulos de las raíces de ésta. En reciprocidad, la bacteria pone a disponibilidad de la planta el excedente del nitrógeno fijado. De esta manera, las bacterias fijan nitrógeno atmosférico en cantidades que varían de acuerdo con las asociaciones que establecen con los diferentes hospederos (tabla 1), y al reducir e incluso, en algunos casos prescindir del uso de fertilizante nitrogenado químico este régimen agrícola se hace menos dependiente de los hidrocarburos. Lo anterior indica que del manejo adecuado de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, puede obtenerse proteína de calidad a menor costo, no obstante, existen problemas para dar prioridad a la investigación en este aspecto, especialmente en países en vías de desarrollo del trópico, ya que este tipo de estudios es a largo plazo y resulta caro; debido a que no siempre es posible evaluar sus beneficios sobre la producción en una sola estación, por otra parte se tiene que la estimación de la productividad de leguminosas forrajeras, requiere además que se incluya la determinación de la eficiencia del forraje en el ganado. En adición a lo anterior se debe considerar que este tipo de estudios requiere del esfuerzo coordinado entre fisiólogos vegetales, agrónomos, economistas, especialistas en ganado, microbiólogos y fitomejoradores.

En resumen, la fijación biológica del nitrógeno no es más que un componente de un gran paquete de investigación para el mejoramiento de los cultivos (App y Eaglesham, 1982).

A pesar de las limitantes, se hacen intentos para mejorar la efectividad de tales sistemas a través del uso de cepas infectivas y efectivas en la fijación de nitrógeno y que sean capaces de sobrevivir y adaptarse en los suelos en que son introducidas; reduciendo el impacto de los factores limitantes del suelo que pueden ser controlados y usando variedades mejoradas, especialmente seleccionadas para mejorar la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno. (Dreyfus et al., 1987).

## 2.2 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas se encuentran ampliamente distribuidas en los trópicos y proporcionan al ser humano y al ganado una dieta rica en proteína. Así mismo aportan beneficios al suelo como abono verde o introducidas en sistemas de cultivos mezclados (Chee, 1982; Sprent, 1983; Simon, 1986: citados por Dreyfus et al., 1987).

Entre 1969-1971 y 1977-1979 el área total de cultivo de leguminosas en América Latina tuvo una tasa de incremento 10 veces mayor que la de cereales, y el cultivo principal fue soya, especialmente en Brasil, Argentina y Paraguay.

Debido al incremento en rendimiento, la producción total de esta leguminosa aumentó en más del 150%, lo cual colocó a América Latina

TABLA 1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN DIFERENTES LEGUMINOSAS

Leguminosa	Nitrógeno fijado (Kg/ha/año) <sup>a</sup> (/cultivo) <sup>b</sup>	Referencia <sup>c</sup>
<u>De grano</u>		
<i>Glycine max</i>	100-200 <sup>b</sup>	Gibson <i>et al.</i> , 1982
<i>Phaseolus aureus</i> pelo,	224 <sup>b</sup>	Dobereiner y Cam 1977
<i>Arachis hypogaea</i>	140 <sup>b</sup>	Ganry <i>et al.</i> , 1985
<i>Cajanus cajan</i>	90-150 <sup>a</sup>	Dobereiner y Campelo, 1977
<i>Vigna unguiculata</i>	49-101 <sup>a</sup>	Eaglesham, 1982
<u>Forrajera</u>		
<i>Desmodium intortum</i>	>360 <sup>a</sup>	Dobereiner y Campelo, 1977
<i>Stylosanthes humilis</i>	90 <sup>a</sup>	Dobereiner y Campelo, 1977
<u>De uso como abono verde o en cultivo mezclado</u>		
<i>Canavalia ensiformis</i>	60 <sup>a</sup>	Dobereiner y Campelo, 1977
<i>Crotalaria juncea</i>	300 <sup>a</sup>	National Research Council, 1979
<u>Arbórea</u>		
<i>Leucaena leucocephala</i>	110 <sup>a</sup>	Högberg y Kvarnström, 1982
<i>Parasponia spp</i>	850 <sup>a</sup>	Trinick, 1981
<i>Prosopis spp</i>	23-36 <sup>a</sup>	Rundel <i>et al.</i> , 1982
<i>Erythrina poeppigiana</i>	12-40 <sup>a</sup>	Anónimo, 1986

c: citados por Dreyfus *et al.*, 1987.

en una posición importante como exportador de soya y/o sus derivados.

A nivel mundial para cubrir las necesidades de proteínas, se reporta que las plantas contribuyen con el 70% y los animales con

el 30% , pero en países tropicales en vías de desarrollo, el porcentaje promedio de consumo de proteína animal es de 10%.

En general, en los trópicos, los cereales contribuyen con el 68% de proteína vegetal total, las leguminosas de grano con el 18.5% y las raíces, tubérculos, semillas y frutos de otros vegetales con el 13.5%.

El contenido protéico de las leguminosas de grano es de 17 a 40%, sin embargo la mayor limitante nutricional que presentan, es su deficiencia en aminoácidos azufrados, lo cuál se compensa de alguna manera con un contenido relativamente alto de lisina (aminoácido del cuál tienen deficiencia los cereales). Tales características hacen complementarios a leguminosas y cereales, ya que al combinarlos se balancea el contenido de metionina y lisina en la alimentación humana y en la del ganado.

En lo que se refiere a leguminosas forrajeras, se reporta, en términos generales que las leguminosas tropicales proporcionan al ganado más de tres veces la cantidad de proteína cruda digerible que la proporcionada por los pastos tropicales.

En Australia tropical y subtropical reportan un estimado promedio del rendimiento de nitrógeno en leguminosas forrajeras, entre 40 y 210 Kg/Ha/año con un máximo de 340 Kg/Ha/año. De esto, se calcula que del 80 al 90% es derivado de la fijación biológica en pastizales mixtos formados por pastos-leguminosas en suelos con bajo contenido de nitrógeno (Norman, 1982).

De las leguminosas de grano, la de mayor cultivo a nivel mundial es la soya [*Glycine max* (L.) Merr.] debido a sus propiedades alimenticias e industriales ya que representa una fuente de proteína vegetal barata y de la cual se obtienen otros productos como aceite y harina, los que son industrializados para elaborar productos alimenticios, medicamentos, productos de limpieza, etc. (SARH/INIA, 1982).

Considerando la importancia de las leguminosas como fuente de proteínas, la particularidad que éstas tienen para asociarse con bacterias que fijan nitrógeno, y que la eficiencia de este proceso es controlada por la bacteria, el hospedero y los factores ambientales, a continuación se describen diversos aspectos que limitan y/o favorecen la eficiencia de esta asociación y consecuentemente el rendimiento de la planta.

## 2.3 FACTORES LIMITANTES EN LA ASOCIACIÓN Rhizobium-LEGUMINOSAS

### 2.3.1 PRINCIPALES FACTORES LIMITANTES DEL SUELO:

pH: En la mayoría de las leguminosas la nodulación es afectada por un pH menor de 5, pero algunas leguminosas tropicales son más tolerantes y nodulan a pH 4.5-4.7. En Glycine max la acidez per se no es factor limitante, pero cuando la acidez induce toxicidad por aluminio y/o manganeso, se ve afectada la nodulación, la fijación de nitrógeno y en consecuencia el rendimiento (Freire, 1984). El efecto de aluminio parece ser indirecto sobre el desarrollo radicular, iniciación del nódulo y sobre la fisiología del hospedero, afectando la asimilación y transporte de calcio, así como de manganeso, ya que existe una relación estrecha entre calcio, aluminio y manganeso. La asimilación de manganeso es mayor en suelos con elevado contenido de aluminio intercambiable que en suelos con menor contenido de este elemento. La tolerancia a aluminio está relacionada con la asimilación y utilización de fósforo.

Como ocurre con las leguminosas, las cepas de Rhizobium también muestran amplia variación en la tolerancia a la acidez. Esta diversidad genética de Rhizobium y sus hospederos debe explotarse para mejorar el desarrollo de las plantas y la fijación de nitrógeno.

El pH elevado también afecta el desarrollo de la planta, nodulación y fijación de nitrógeno al inducir deficiencias en manganeso, hierro y boro; salinidad y desequilibrio aniónico del suelo.

#### 2.3.1.1 Minerales.

Después del nitrógeno, el fósforo es el principal nutrimento limitante en los suelos.

El calcio y el magnesio son esenciales tanto para el hospedero como para la bacteria simbiótica. Un cambio en la relación Ca/Mg puede reducir la disponibilidad de cualquier nutrimento. El desequilibrio puede producirse por la práctica de encalado ó el uso de fertilizante potásico.

El efecto del potasio sobre la fijación de nitrógeno es indirecto a través de la fisiología del hospedero. En suelos no encalados, la aplicación de KCl eleva el contenido de manganeso disponible en el suelo y en tejido vegetal y disminuye la nodulación.

En suelos ácidos del trópico y subtropical, el azufre y algunos otros micronutrientes son limitantes comunes de la fijación de nitrógeno y productividad de leguminosas; entre ellos el molibdeno tiene una función esencial en la fijación de nitrógeno, debido a que forma parte del sistema enzimático que fija el N<sub>2</sub> atmosférico.

El efecto de los fertilizantes nitrogenados sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno es complejo y varía con la forma de aplicación y cantidad utilizada; con la especie o variedad de la planta, la cepa de Rhizobium, las condiciones ambientales y la concentración de nitrógeno presente en el suelo. Generalmente, adiciones elevadas casi siempre inhiben la nodulación y fijación de nitrógeno (Dreyfus et al., 1987).

### 2.3.1.2 Microbiota.

Las cepas fijadoras de nitrógeno, al ser introducidas al suelo como inoculante tienen que enfrentar, además de factores de tipo físico y químico, a la microflora del suelo en relativo equilibrio, en donde pueden existir microorganismos antagónicos ó microorganismos que directa ó indirectamente pueden beneficiar su establecimiento o acción.

Subba Rao (1984), al hacer una revisión de los trabajos publicados sobre este tema, encontró que varios autores reportan efectos antagónicos hacia Bradyrhizobium japonicum por parte de bacterias de la rizosfera, especialmente actinomicetos, los que inhiben el desarrollo de Bradyrhizobium japonicum in vitro, pero no siempre inhiben la nodulación. Por otra parte, también se reporta que hongos como Rhizoctonia solani, Trichoderma viride, Rhizopus nigricans y Mucor vesiculosus son antagónicos a Bradyrhizobium japonicum in vitro, pero en cultivos hidropónicos y en suelo únicamente T. viride redujo la nodulación y la capacidad para reducir el acetileno. Otros reportes indican predación por protozoarios y parasitismo por Bdellovibrio sp. También encontró reportes sobre el efecto benéfico de los microorganismos Beijerinckia, Azotobacter, Azospirillum y micorrizas (VA), los que al ser inoculados en combinación con Bradyrhizobium japonicum incrementaron la nodulación y el rendimiento de soya en experimentos realizados en macetas.

### 2.3.2 FACTORES LIMITANTES DE LA PLANTA HOSPEDERA

Para que ocurra la fijación del nitrógeno en la simbiosis Rhizobium-leguminosa, el microsimbionte debe encontrarse en la rizosfera del hospedero apropiado, multiplicarse e inducir el enroscamiento del pelo radicular, ser reconocido por la planta, introducirse en el sistema radicular, localizarse y multiplicarse dentro de las células radiculares, desarrollar cambios estructurales específicos y recibir energía de la planta. En esta serie de eventos participan ambos simbioses y algunos de ellos dependen directamente del hospedero.

Graham (1984), realizó una revisión de la literatura que incluye resultados del estudio de las etapas que ocurren durante el establecimiento de la simbiosis y la fijación de nitrógeno, y que son controlados por el hospedero:

Las plantas excretan en el suelo, a través de su sistema radicular, diversas sustancias tales como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, lo que ocasiona que el número de microorganismos se incremente en la zona radical en respuesta a la presencia de estos nutrimentos. Este fenómeno se conoce como efecto de rizosfera, y aún cuando se sabe que no es específico, en leguminosas se ha reportado un efecto estimulador selectivo, como lo demuestran los resultados de experimentos con alfalfa y trébol en donde se encontró que la primera estimuló la multiplicación tanto de Rhizobium meliloti como de Rhizobium trifolii, mientras que con el trébol se observó que la mayor estimulación fué para R. trifolii (Robinson, 1967, citado por Graham, 1984).

La anterior especificidad puede deberse a la presencia de sustancias particulares en las especies de leguminosas o al balance de los diferentes compuestos presentes en los exudados radicales (Rovira, 1969, Van Egerart, 1967, Hubbell y Elkan, 1967, citados por Graham, 1984). El segundo autor encontró que el contenido de homoserina del exudado radical de chícharo favoreció, de manera específica, el desarrollo de Rhizobium leguminosarum; en tanto que los otros dos autores trabajaron con líneas derivadas de la cruz de dos variedades de soya que difieren en su habilidad para nodular, y al analizar los exudados radicales encontraron que la línea nodulativa presentó mayores niveles de proteína y azúcares reductores y menos aminoácidos libres que la mutante no nodulativa.

En la etapa de deformación de los pelos radicales se involucran ambos simbioses: la raíz de la leguminosa produce triptofano, el que es transformado por la bacteria en ácido indolacético, y éste causa el enroscamiento del pelo radical.

La siguiente etapa, referida al reconocimiento superficial entre los simbioses, se atribuye a una glicoproteína, llamada lectina, presente en la leguminosa, la cual reconoce y se enlaza a los sitios receptores de la superficie bacteriana, actuando en forma similar a un anticuerpo bivalente en una reacción antígeno-anticuerpo. Estos receptores en Bradyrhizobium japonicum son principalmente exopolisacáridos que corresponden a la D-galactosa, y en Rhizobium trifolii a la 2-desoxiglucosa. Para B. japonicum se reporta que los lipopolisacáridos también actúan como receptores en el enlace con lectinas, y para este género y especie se encontró como lipopolisacárido de este tipo, a la 2-ceto-3 desoxioctanato que es un constituyente de la pared celular.

La explicación de la especificidad en el reconocimiento entre simbioses por medio de la presencia de lectinas es muy atractiva, pero no puede explicar ciertos casos de nodulación en ausencia de ellas. Tampoco explica la diferencia en la competencia entre cepas que tienen exopolisacáridos esencialmente iguales, ni las uniones heterólogas entre cepas de Rhizobium y ciertas especies de leguminosas (Casas, 1984).

Arsac y Cleyet-Marel, 1986, Kosslak y Bohlool, 1985, citados por Fernández-Flouret y Cleyet-Marel (1987) indican que aún cuando se

establezca la adsorción superficial entre hospederos, en el genoma de la planta existe la información que favorecerá o impedirá que el proceso de infección continúe. Si el proceso continúa, la bacteria debe penetrar en la raíz y para ello, Nutman (1956) propuso que el crecimiento activo de la pared celular es reorientado desde la punta del pelo radical hacia el punto de infección, de tal manera que el pelo radical sigue creciendo hacia dentro de sí mismo.

Por otra parte, Fahraeus y Shalman (1977) indicaron que en el proceso de infección se encuentra involucrado un polisacárido extracelular bacteriano, el que induce un incremento en la actividad de la enzima poligalactouronasa, producida por la planta, la que ocasiona un ablandamiento de la pared celular de la raíz, facilitando la penetración de la bacteria. Cuando ésta alcanza la membrana del pelo radical se inicia el hilo de infección. Este se desplaza hacia las células corticales internas, en donde las bacterias son liberadas y se inicia la formación del nódulo por la multiplicación de células diploides existentes en este sitio, y donde se localiza parte del sistema vascular de la planta (Alexander, 1980).

Las diferencias de tiempo en que aparecen los primeros nódulos, así como el número de ellos son regulados por el hospedero.

Otro aspecto controlado por el hospedero es la función del nódulo, y éste es afectado principalmente por la aportación de fotosintatos. Una de las características del hospedero que afectan la aportación de carbohidratos al nódulo es el tiempo que las variedades toman para florecer y madurar. Las líneas de frijol soya de floración temprana tienden a fijar menos nitrógeno que las de grupos de madurez tardía; lo cual se debe a la competencia por los carbohidratos entre nódulos y desarrollo de vainas (Hardy et al. 1973, citado por Graham, 1984).

La iniciación y formación del nódulo es el resultado final de la interacción de alelos de la planta y genes rizobiales específicos. De acuerdo con esto, sustancias derivadas de las plantas e identificadas como flavanoles, flavonas y flavanonas inducen los genes nod en el género Rhizobium, mientras que en Bradyrhizobium japonicum los genes nod son inducidos por isoflavonas (Sadovsky et al., 1990).

Con respecto a los estudios a nivel genético, Materon y Vincent (1980), Devine y Breithaupt (1980), Pueppke y Payne (1987) reportan la presencia de los genes rj<sub>1</sub>, Rj<sub>2</sub>, Rj<sub>3</sub> y Rj<sub>4</sub> en Glycine max. El gen rj<sub>1</sub> es un gen recesivo que produce el genotipo de no nodulación con amplio espectro de cepas de Rhizobium. Los genes Rj<sub>2</sub>, Rj<sub>3</sub> y Rj<sub>4</sub> son todos dominantes y producen respuestas de nodulación inefectiva con algún grupo serológico de cepas o con una cepa específica de Rhizobium (Tabla 2).

Sadovsky et al., (1990) reportan la presencia del gen GSN en Bradyrhizobium japonicum. Este gen bacteriano permite la nodulación de genotipos específicos de plantas leguminosas de una especie

dada. Se ha localizado en Rhizobium leguminosarum biovar viceae, cepa *Tom*, la cual junto con su hospedero ilustra la interacción gen-gen en la asociación Rhizobium-leguminosa.

La cepa *Tom* nodula a la variedad de chícharo *Afghanistan* mientras las cepas convencionales de R. leguminosarum bv. viceae no lo hacen. El gen *nodX*, presente en la cepa *Tom*, parece ser el responsable de esta especificidad. Así, una acción positiva del determinante de hospedero en la bacteria controla la nodulación de un único genotipo de chícharo, y lo que lo hace un buen ejemplo de interacción gen-gen en simbiosis es que la restricción de la nodulación controlada por el hospedero en la variedad *Afghanistan* está condicionada por un único alelo recesivo en la planta.

Al parecer la misma interacción gen-gen controla la nodulación en soya por cepas de B. japonicum del serocluster 123. En Estados Unidos se han examinado varios genotipos de soya de nueva introducción que específicamente excluyen la nodulación por cepas de B. japonicum relativamente competitivas, miembros del serocluster 123. Este serocluster está compuesto por cepas de los serogrupos 123, 127 y 129. Algunos genotipos de las plantas de nueva introducción (PI) aparentemente restringen la nodulación de cepas de algún serogrupo específico. Por ejemplo, PI 377578 restringe la nodulación de todas las cepas del serogrupo 123 y PI 417566 restringe la nodulación de todas las cepas probadas del serogrupo 129. Sin embargo algunas cepas, como la DE3-1a, tiene un amplio intervalo de hospederos y su nodulación no está restringida por ninguno de los genotipos de las PI.

Lo anterior sugiere que los componentes genéticos de ambos simbioses interactúan para influir en la nodulación de la simbiosis soya-B. japonicum, y que las interacciones gen-gen entre una leguminosa hospedera y su microsimbionte pueden ser el mecanismo para controlar la especificidad de la nodulación a nivel del genotipo de la leguminosa.

Los resultados de Devine y Breithaupt (1980) sugieren que al introducir el germoplasma de soya y Rhizobium desde Oriente a

TABLA 2 FACTORES GENÉTICOS QUE CONTROLAN LA SIMBIOSIS EN SOYA  
(Devine, 1984).

Factor genético	Variedad de soya	Fenotipo
rj <sub>1</sub>	T181, T201	No nodula con la mayoría de las cepas
Rj <sub>2</sub>	Hardee, CNS	Inefectivo con las cepas de los serogrupos C1 y 122
Rj <sub>3</sub>	Hardee	Inefectivo con la cepa 33
Rj <sub>4</sub>	Hill, Dunfield	Inefectivo con la cepa 61
?	Peking	Inefectivo con cepas del serogrupo 123

Estados Unidos de América ocurrió una mezcla entre simbioses (por ejemplo germoplasma de soya del sur de Asia y cepas de *Rhizobium* del norte de esa región) que dio como resultado el acoplamiento de simbioses extraños entre sí, y esto sería la causa de las reacciones de incompatibilidad que actualmente se presentan entre cepas de *Rhizobium* y genotipos de soya. Sus resultados también apoyan el concepto de que la coevolución afecta la compatibilidad de las interacciones hospedero-cepa.

Devine (1984), sugiere el uso de variedades de soya que portan el gen rj<sub>1</sub> para solucionar el problema de las cepas ineficientes de *B. japonicum* que se encuentran establecidas en suelos donde se cultiva continuamente soya, ya que estas variedades no nodularían con la mayoría de las cepas ahí presentes, lo cual daría oportunidad de funcionar con éxito a una cepa seleccionada que se introdujera como biofertilizante. Otro mecanismo que sugiere es la obtención de líneas de soya derivadas por hibridización del genotipo rj<sub>1</sub> con otro genotipo, que exhiban una modificación de la expresión del alelo rj<sub>1</sub> y permitan la nodulación con los genotipos de cepas que actualmente se usan con la tecnología de inoculación.

### 2.3.3 CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA QUE AFECTAN A LA ASOCIACIÓN *Rhizobium*-LEGUMINOSA

El factor más importante, es el relacionado con los genes bacterianos, ya que la interacción de estos con alelos específicos

de la planta es la que determina la iniciación y formación del nódulo.

En Rhizobium meliloti y Rhizobium leguminosarum biovar viceae y trifolii los genes para nodulación y fijación de nitrógeno se localizan en plásmidos grandes conocidos como plásmidos Sym. En Rhizobium meliloti los genes esenciales de nodulación nod D<sub>1</sub>ABC están estrechamente relacionados. Estos se localizan como un grupo de genes sobre el plásmido Sym y se les conoce como región nod. Cercano a esta región se localiza otro grupo de genes involucrados en la nodulación específica de hospederos (hsn) y se les conoce como hsnABCD. Análogos a estos, los genes nodEFG se localizan en Rhizobium leguminosarum biovar trifolii.

En Bradyrhizobium japonicum los genes de nodulación no se localizan en plásmidos, sino distribuidos en el cromosoma. Los genes estructurales de fijación de nitrógeno, nifDK y H están físicamente separados de los genes nod por una distancia relativamente grande. También se ha informado que los genes involucrados con la superficie celular rizobial y con el polisacárido extracelular influyen en la especificidad de la simbiosis.

Estudios de transcripción o traducción con Rhizobium y Bradyrhizobium indican que la inducción de varios genes requiere la presencia de moléculas derivadas de la planta, que actúan como señales.

También se ha informado que el gen nodD puede ser un determinante de nodulación para un intervalo de hospederos. Los determinantes de intervalo de hospedero rizobiales parecen funcionar de acuerdo con los genes que controlan la nodulación en sí.

Existe cierta jerarquía en los determinantes de nodulación, mientras algunos afectan la nodulación a nivel de género de leguminosa, como los loci hsn de Rhizobium meliloti, otros afectan la nodulación de un genotipo específico dentro de una especie de leguminosa, tal es el caso de los genes GSN (Sadovsky et al., 1990).

#### 2.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEPAS

El objetivo de la inoculación es mejorar el rendimiento de las leguminosas, sin embargo, los inoculantes comerciales muchas veces no son capaces de formar nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno en las especies y/o variedades de leguminosas que se recomiendan para una región y para las condiciones de suelo y clima en las que se desarrollan. En estos casos se efectúan programas de selección de cepas, cuyo principal criterio se basa en la habilidad de las cepas para formar simbiosis efectivas con el hospedero. Desde el punto de vista práctico, este criterio resulta adecuado en suelos libres de poblaciones rizobiales, pero cuando ya existe una población establecida, la cepa introducida tiene que competir con la existente y muchas veces no logra una nodulación exitosa (Amarger, 1981).

En ocasiones, los programas de selección incluyen características específicas que deben poseer las cepas para tener éxito en determinados ambientes, como es el caso del programa de selección de cepas de Rhizobium para leguminosas ácido-tolerantes para suelos infértiles de Latinoamérica (Halliday, 1984); o en casos de suelos con problemas de salinidad, para los cuales Velagaleti y Marsh (1989) sugieren seleccionar hospederos y microsimbiontes tolerantes a la sal.

En general, considerando los factores limitantes de la asociación y los objetivos específicos de algunos programas, se han utilizado los siguientes criterios de selección:

- Infectividad (habilidad para nodular) y efectividad (potencial para fijar nitrógeno) en un amplio intervalo de hospederos.
- Competitividad por los sitios de infección nodular.
- Competencia saprobia (capacidad para sobrevivir y persistir en el suelo).
- Tolerancia a factores ambientales.
- Habilidad para formar nódulos con prontitud.
- Respuesta satisfactoria durante los procesos de producción de inoculantes a escala comercial.
- Supervivencia en el inoculante durante la distribución, almacenamiento y manipulación por los agricultores.
- Mínima variabilidad genética.

(Amarger, 1981; Dreyfus et al., 1987; Gibson et al., 1990; Halliday, 1984; Parker et al., 1977; Peres y Vidor, 1980; Somasegaran y Bohlool, 1990).

De los anteriores criterios, uno de los que ha recibido mayor atención es el de competencia por los sitios de infección nodular. Los factores involucrados en este proceso no están claramente definidos, pero se relacionan con características de ambos simbiontes e incluyen:

- 1) Influencia del hospedero en el proceso de infección.
- 2) El número relativo de las cepas en el inóculo y sobre la superficie radical.
- 3) Velocidad de desarrollo relativo de las cepas.
- 4) Estado fisiológico de las cepas al momento de la inoculación.
- 5) Niveles nutricionales, de temperatura, humedad y oxígeno.

6) Compatibilidad (efectividad) entre las cepas y su hospedero.

(Trinick, 1982).

Sin embargo, Amarger (1981) indica que existe limitación metodológica para la selección de cepas con base en su habilidad competitiva, ya que es necesario distinguir una cepa de otra y analizar un gran número de nódulos para reconocer a la cepa que los originó.

Los métodos actuales, usados en el reconocimiento de cepas, generalmente se basan en propiedades de superficies, como el enlace con lectinas vegetales, tipificación por fagos y serología. Estas pruebas no son específicas y todas son vulnerables a eventos mutacionales que alteran la superficie celular y por lo tanto las propiedades para identificación.

Otro método utilizado para el reconocimiento de cepas es el de marcadores de resistencia a antibióticos, pero tiene tres principales objeciones: i) la presencia de la característica de resistencia puede afectar al experimento que se realiza a través de la alteración de otras características como la velocidad de desarrollo ó la permeabilidad celular, ii) Existe una alta incidencia de resistencia intrínseca a los antibióticos en muchas cepas, iii) La resistencia a antibióticos puede ser transferida entre cepas tanto en el suelo como en el nódulo. Por otro lado, la técnica que usa niveles intrínsecos de resistencia a antibióticos únicamente vence la primera de las anteriores objeciones (Roberts et al., 1980).

La metodología más popular para el reconocimiento de cepas es la serología. Las reacciones serológicas de rhizobia generalmente involucran dos principales reactantes: antígeno (molécula grande como una proteína o polisacárido complejo) y anticuerpo (molécula producida por un animal en respuesta a un antígeno extraño). Los anticuerpos ocurren en varias formas moleculares que comparten la misma especificidad por el antígeno, pero difieren en la facilidad para demostrarse. Las formas más utilizadas in vitro son las inmunoglobulinas IgM e IgG. La concordancia específica entre el anticuerpo y el determinante antigénico permite el reconocimiento de identidad o relación.

En estudios de rhizobia, las reacciones serológicas que han sido más usadas corresponden a la aglutinación, a la combinación de ésta con anticuerpos conjugados con fluoresceína que reaccionan con antígenos disponibles en la superficie celular, y la tercera reacción es demostrada como precipitación del complejo antígeno-anticuerpo en un sistema de difusión en gel.

Los antígenos que son detectados por aglutinación son aquellos unidos a la célula y suficientemente cercanos a la superficie para ser accesibles al anticuerpo, son parte del flagelo o del cuerpo bacteriano (antígeno somático). Si estos son difusibles o

susceptibles a ser transformados a su forma difusible, también pueden ser demostrados por reacciones de precipitación.

Los antígenos somáticos son los más específicos de las cepas, de tal manera que una colección de una misma especie proporcionará muchos patrones de aglutinación. Los antígenos flagelares se encuentran más ampliamente compartidos entre cepas de una misma especie o entre especies muy relacionadas, pero ocurren algunas especificidades.

Los antígenos internos, no aglutinantes, son compartidos ampliamente por cepas de Rhizobium de crecimiento lento, pero no con cepas fuera de este grupo. Estos proporcionan conocimientos sobre la diferenciación taxonómica entre especies rhizobianas de rápido y lento crecimiento, y dentro del grupo de los primeros, apoyan la fusión de las especies Rhizobium leguminosarum, Rhizobium trifolii y Rhizobium phaseoli; y apoyan también la retención de Rhizobium meliloti como una especie distinta e indica algún grado de relación entre rhizobia de rápido crecimiento y agrobacteria (Vincent, 1982).

Los avances en los métodos serológicos, especialmente la inmunolectroforesis, ha proporcionado técnicas de muy alta resolución para el reconocimiento de antígenos y para el estudio de la naturaleza química de los inmunógenos. Las técnicas de purificación de anticuerpos y su conjugación con fluorocromos, enzimas y ferritinas han mejorado considerablemente. En años recientes se han logrado avances significativos en el campo de la microscopía de fluorescencia, siendo su aplicación muy accesible a investigadores no entrenados en este campo (Tchan, 1982).

De los métodos existentes para reconocimiento de cepas, generalmente se utilizan aquellos que involucran los antígenos somáticos superficiales; y la selección de una técnica específica es determinada por las facilidades, el costo, el número de muestras por analizar, la familiaridad con determinada técnica, la especificidad del sistema y lo apropiada que sea para un propósito particular.

Ningún método está enteramente libre de riesgos de proporcionar falsos negativos o positivos, por lo que siempre deben ser usados los testigos adecuados y ser interpretados correctamente (Vincent, 1982).

Aún cuando la naturaleza antigénica de rhizobia es relativamente estable, puede ocurrir modificación genotípica, como reporta Diatloff, 1977, citado por Vincent (1982), sobre la evidencia de la estabilidad de la marca antigénica de una cepa de Lotononis, por un período de 12 años; y Gibson, et al. (1990) quienes en Australia, detectaron cambios serológicos en la cepa de Bradyrhizobium japonicum CB1809 introducida en campo, sin que se viera alterada la efectividad de la misma. Por otro lado, estos últimos autores, al

rastrear a la cepa USDA123 en Estados Unidos, analizaron por inmunolectroforesis a 21 cepas aisladas, que serológicamente fueron similares a USDA123, pero presentaron 21 patrones protéicos distintos. Lo anterior ocasiona duda sobre la confiabilidad de este marcador para estudios de campo a largo plazo.

## 2.5 COMPETITIVIDAD.

Los estudios actuales sobre competitividad, tratan de elucidar los mecanismos que operan en el proceso de competencia y los factores que lo afectan.

En cuanto a la influencia del hospedero en la competencia, Peres y Vidor (1980) al estudiar la eficiencia y capacidad competitiva relativa de las cepas 527, 532<sub>C</sub>, 586, 587, 5019 y 5020 en las variedades de soya Bragg Santa Rosa, UFV-1 e IAC-2 encontraron que las cepas 587 y 5019 fueron altamente competitivas y eficientes en todas las variedades, en tanto que 527, 532<sub>C</sub>, 566 y 5020 formaron bajo porcentaje de nódulos en las 4 variedades.

Materon y Vincent (1980) trabajaron con las variedades de soya Lee, SRF300 y siete líneas estables obtenidas de las cruza Lee X Hardee y SRF300 X Hardee y con las cepas de Bradyrhizobium japonicum CB1809, CC709, NU148 y NU150. Con pruebas en invernadero demostraron que la especificidad de hospedero está claramente relacionada con la competitividad: la cepa CC709 fué efectiva con todos los hospederos, pero la CB1809 fué incompatible con los derivados de la variedad Hardee que poseen el gen Rj<sub>2</sub>. La cepa NU150 fué compatible con Rj<sub>2</sub>, en tanto que NU148 fué incompatible. Cuando se inocularon las 4 cepas sobre hospederos compatibles con CB1809 el éxito de la nodulación fué (CB1809, NU150) > (CC709, NU148). El índice competitivo por pares de cepas mostró que en hospederos compatibles con CB1809, los índices de las 4 cepas fueron similares; pero cuando los hospederos fueron incompatibles con CB1809, las cepas CC709 y NU150 dominaron, lo que confirma las diferencias en compatibilidad entre el microsimbionte y el hospedero.

Keyser y Cregan (1987), encontraron que 5 de 6 cepas del serogrupo 123 fueron desplazados por la cepa 110 en 2 variedades de soya de reciente introducción, pero en la variedad Williams las 6 cepas dominaron a la 110, demostrando el efecto del hospedero sobre la habilidad competitiva del microsimbionte.

Moawad et al. (1984) estudiaron la respuesta al efecto de la rizosfera como un factor involucrado en la competencia de Bradyrhizobium japonicum serogrupos 110, 123, y 138 que predominan en suelo de Waukegan. Mediante el uso de anticuerpos fluorescentes detectaron, en las primeras semanas después de la siembra, que la población de cada serogrupo se incrementó gradualmente en la rizosfera del hospedero, no excediendo a 10<sup>6</sup> bacterias/g de suelo

de rizosfera; en tanto que, en suelo sin cultivar, las poblaciones se mantuvieron al nivel inicial de  $10^4$ - $10^5$  bacterias/g. Los efectos de rizosfera fueron mínimos durante el período de iniciación del nódulo y fué casi igual para los tres serogrupos, sin embargo, el 123 ocupó 60-100% de los nódulos. Lo anterior indica que el éxito de este serotipo no se debió a una colonización superior de la rizosfera, conclusión que es apoyada por Mc Dermott et al. (1991).

Kamicker y Brill (1987) determinaron la competitividad de 3 cepas de Bradyrhizobium japonicum (117, 110 y 6A76) en suelos que contienen una población rizobial altamente competitiva. La cepa predominante en esta población corresponde a la 0336 que pertenece a los serogrupos 123 ó 138 y ha persistido en el suelo alrededor de 30 años en ausencia de cultivos de soya. Intentando incrementar la formación de nódulos por las cepas introducidas se utilizó una concentración celular del inoculante mayor que la estándar y se utilizaron 2 formas de inoculante: una con turba finamente molida para cubrir semillas y otra en forma granular, la que se aplicó en los surcos. Sus resultados indican que cuando en el suelo existe  $10^3$  células/g, se requieren casi  $10^9$  células/semilla para lograr que la cepa introducida forme al menos 50% de los nódulos, pero para lograr lo anterior es importante la competitividad de la cepa. De las cepas introducidas la más competitiva fue la 117. En cuanto al método de inoculación observaron que éste afecta la distribución vertical de los nódulos. La inoculación en surcos favoreció la formación de nódulos en la parte superior de la raíz, y cuando el inoculante se agregó al suelo en la labranza, los nódulos se formaron en la parte inferior de la raíz.

En otra investigación, Peres y Vidor (1980), trabajaron con suelos que contenían una población nativa de rizobia escasa y probaron inoculantes mixtos que contenían a las distintas cepas en concentraciones variables y encontraron que la concentración de cada una de éstas en el inoculante está íntimamente relacionada con su ocurrencia en los nódulos y cuando dos cepas altamente competitivas se encuentran en la misma proporción no existe predominancia de alguna de éstas en los nódulos. Además determinaron que cuando la concentración de una cepa es 10 veces mayor que la otra, el porcentaje de nódulos formados por cada una es de 80 a 20.

El estudio de la habilidad competitiva de Bradyrhizobium japonicum USDA 110 y USDA 123 bajo una variedad de condiciones ambientales, indicó, que la interacción entre simbioses durante el período inicial de nodulación, es crítico para determinar la competencia de las cepas, ya que este patrón de competencia cambia, si las semillas (con radícula de 1-2 cm) son pre-expuestas a alguna de las cepas antes de la siembra, lo cual hace a esa cepa dominante, sin importar si es efectiva o inefectiva (Kosslak et al., 1983). A la vez se detectó que la concentración de nitrógeno mineral o la presencia de microorganismos antagonistas no afectan la competitividad, pero sí tiene efecto la variedad del hospedero, la edad de la planta y el tipo de suelo (Kosslak y Bohlool, 1985).

Los resultados de Mc Dermott y Graham (1990), apoyan la teoría de que las cepas que responden eficiente y prontamente a las señales del hospedero e inician la infección, pueden dominar la nodulación y aparecer como más competitivas.

Los estudios de Bhuvaneswari *et al.*, 1980, 1981, citados por Mc Dermott y Graham (1990), quienes utilizaron la técnica conocida como "root-tip marking", que consiste en marcar la posición de la punta radicular de la plántula al momento de la inoculación, y observar la aparición de los nódulos a través del tiempo, mostró que la región radicular de la soja que es susceptible a la infección, está restringida a la zona de pelos radiculares inmediatamente arriba de la punta de la raíz emergente, región en la cual las células están abiertas a la infección por un período de 4 a 6 hs. Los reportes de Mc Dermott y Graham, 1989, Wadisirisuk *et al.*, 1989 citados por Mc Dermott y Graham, 1990) sugieren que la aparente falta de competitividad de las cepas de los inoculantes bajo condiciones de campo, es debida al menos en parte, a su falta de habilidad para moverse junto con el sistema radicular en expansión.

Abaidoo *et al.* (1990), trabajaron en suelos de sitios ubicados a diferentes altitudes y evaluaron el efecto del tipo de suelo, temperatura y aplicación de nitrógeno mineral, sobre la competencia entre cepas por la colonización de la rizosfera y ocupación de los nódulos, en soja y frijol. Sus resultados indicaron que ni el tipo de suelo ni la temperatura originada por la altitud afectaron la competitividad. Lo mismo ocurrió con el nitrógeno mineral aplicado, a pesar de que este factor redujo la nodulación en general. Bajo las condiciones experimentales desarrolladas, el éxito de la competencia intercepa fue determinada principalmente por las características genéticas de las cepas y su compatibilidad con el hospedero.

Sreekumar y Sen (1989) encontraron que existe influencia del hospedero pero no de la velocidad de desarrollo de las cepas, sobre la habilidad competitiva de las mismas.

Vargas y Graham (1989) demostraron que en frijol, tanto la cepa de Rhizobium como la variedad del hospedero influyen en la ocupación de los nódulos a pH bajo, y que en esto se funda la competitividad de la cepa en ambientes ácidos. El éxito de la eficiencia simbiótica se basa en la tolerancia de la cepa a la acidez y/o en la característica del hospedero para disminuir el efecto dañino del pH sobre Rhizobium mediante la producción de exudados radicales que alteran el pH de la rizosfera.

Por otra parte, Fernández-Flouret y Cleyet-Marel (1987) indican que el medio de cultivo utilizado en la producción de inoculantes, puede tener influencia sobre la habilidad competitiva de la cepa, a través de la alteración del estado fisiológico de la misma, lo que se traduce en cambios de la estructura externa, principalmente en la secreción de exopolisacáridos.

Debido al problema que, en muchas regiones, presentan las cepas naturalizadas, se ha sugerido la selección de variedades de hospedero capaces de discriminar a las cepas presentes en el suelo, y que establezcan simbiosis efectivas con cepas mejoradas (Kvien et al., 1981) o introducir variedades con alto potencial para fijar nitrógeno en simbiosis con las cepas rizobiales nativas (Okereke y Unaegbu, 1992).

## 2.6 EL CULTIVO DE LA SOYA EN MÉXICO Y EL USO DE LA TECNOLOGÍA DE INOCULACIÓN.

El inicio del cultivo de la soya en México data de 1911, cuando la Secretaría de Agricultura y Fomento la introdujo en forma experimental, y fue hasta 1959 cuando se estableció en forma comercial en Sonora con una superficie de siembra de 1600 ha (Barriga, 1978). A partir de entonces su cultivo se extendió a otras regiones del país; se inició en el Valle del Yaqui, continuó en la Costa de Hermosillo y en el Valle del Mayo, en el estado de Sonora; en el Valle del Fuerte en Sinaloa y posteriormente en los estados de Chihuahua, Tamaulipas, Chiapas, Michoacán y Jalisco (Crispín y Barriga, 1975).

La importancia que adquirió el cultivo determinó la canalización de esfuerzos y recursos económicos al estudio del mismo. Las acciones emprendidas para lograr lo anterior incluyen: introducción del cultivo en diversas áreas del trópico húmedo y seco, bajo condiciones de riego y temporal; utilización de variedades de elevado rendimiento y adaptables a las regiones específicas, así como la utilización de tecnologías de fertilización e inoculación (Crispín y Barriga, 1975).

En las áreas del noreste el cultivo de la soya generalmente se efectúa bajo condiciones de riego; el cultivo bajo condiciones de temporal se inició en el sur de Tamaulipas en 600 ha con la variedad tropicana. Posteriormente se extendió a otras regiones tropicales del centro, sur y sureste del país (Ecotecnia Agrícola, 1983).

La tabla 3 muestra las variedades de soya de diferentes grupos de madurez que se han adaptado en México. No obstante estas alternativas, ha sido necesario que se desarrollen nuevas variedades adaptadas a zonas muy específicas en donde las variedades comunes no se adaptan; como lo indica el trabajo de Nieto et al. (1983), quienes estudiaron variedades de soya en 32 localidades del trópico húmedo del país. La forma en que cada ambiente afectó a determinadas características fisiológicas de las variedades, sugirió a los autores que existe dificultad para obtener genotipos con un intervalo amplio de adaptación. También determinaron la necesidad de incorporar ciertas características fenológicas a los genotipos probados para hacerlos adaptables a tales ambientes.

TABLA 3 VARIEDADES DE SOYA DE DIFERENTES GRUPOS DE MADUREZ QUE SE HAN ADAPTADO EN MÉXICO.

Variedad	Grupo*	Estados donde se adapta
Tetabiate	V	Jalisco, Chihuahua, Sinaloa y Sonora
Forrest	V	Jalisco, Chiapas y Campeche
Bacatete	V	Sonora
Cajeme	VI	Chihuahua, Coahuila, Sinaloa, Sonora
Davis	VI	Chihuahua, Coahuila, Sinaloa, Sonora
Hood	VI	Chihuahua y Sinaloa
Huites 77	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

\* Grupos clasificados desde 00, 0, I a XII de acuerdo al tiempo en que la planta alcanza la madurez fisiológica. Los primeros grupos corresponden a variedades precoces adaptadas a latitudes altas y días largos. Los últimos corresponden a variedades tardías adaptadas a latitudes bajas y días cortos. (Barriga y Nieto, 1983).

La tabla 4 muestra la producción de la soya en México y los estados contribuyentes a la producción en el año agrícola 1991; en ésta puede observarse que el 84% de la soya se siembra bajo condiciones de riego y únicamente el 16% es cultivado bajo condiciones de temporal.

Con relación a la tecnología de la inoculación, se tiene que ésta ha sido evaluada en diferentes regiones de México, en donde se han empleado distintas variedades de soya y diversos tipos de inoculantes, y en general, la respuesta a la inoculación ha sido variable. En los estudios realizados en Tamaulipas y Guerrero no se registró respuesta (García et al., 1981; Nieto, citado por Ramírez Gama et al., 1992; Mercado y Márquez-Berber, 1985), en tanto que en Puebla, Chihuahua, Sonora y Chiapas se reporta incremento en el rendimiento de grano/ha (Ferrera-Cerrato y Jalpa, 1980; García y Moncada, 1969, Trujillo, 1981; Muñoa et al., 1989).

Con relación a ensayos para introducir la soya en áreas nuevas de cultivo, utilizando además la inoculación, se reportan respuestas positivas en trabajos realizados en la Mixteca Poblana, así como en el estado de Morelos. En este último caso la variedad empleada corresponde a la BM-2 (López y Ferrera-Cerrato, 1983; Márquez-Berber y Banafunzi, 1985; Orihuela et al., 1985; Flores et al., 1987).

Los resultados de otros estudios tendientes a conocer los factores que limitan el establecimiento de la asociación indican que el efecto de la inoculación sobre el rendimiento varía con el tipo de suelo. Uvalle (1983) obtuvo mayor respuesta en un suelo arcillo-arenoso que en uno areno-arcilloso. La textura y otras características específicas de cada suelo influyen en la respuesta a la inoculación, como lo indican los resultados de Tsuzuki et al. (1985) en estudios realizados con muestras de suelo de Chiapas, Tamaulipas, San Luis Potosí y Campeche.

Con relación a la especificidad de hospedero, Armenta (1985) y Ramírez-Gama et al. (1992) han abordado estudios tendientes a seleccionar cepas que establezcan asociaciones óptimas con las variedades de soya utilizadas en diferentes regiones del país.

En la Facultad de Química UNAM, se han realizado numerosos estudios sobre esta tecnología; lo que comprende la selección de cepas y de hospederos que establezcan las asociaciones más eficientes, así como a su validación en campo. Otro aspecto abordado corresponde a ensayos sobre métodos de producción de inoculantes y control de calidad.

Este tipo de investigaciones se inició a instancias del Programa de Fertilidad Estatal del estado de Tamaulipas, que en el período 1975-1976 detectó un elevado índice de ineffectividad de los

TABLA 4 ESTADOS CONTRIBUYENTES EN LA PRODUCCIÓN DE SOYA EN MÉXICO  
(AÑO AGRÍCOLA 1991)

Estado	Superficie (ha)				Producción (ton)	
	sembrada		cosechada		R	T
	R	T	R	T		
Campeche	215	0	190	0	418	0
Chiapas	84	9,700	54	9,486	112	21,286
Chihuahua	8,634	0	8,631	0	15,063	0
Guanajuato	3	0	3	0	8	0
Guerrero	3	0	3	0	3	0
México	0	10	0	10	0	20
Nayarit	1	0	1	0	2	0
Nuevo león	810	0	790	0	1,756	0
SLP	350	1,215	350	1,140	392	1,504
Sinaloa	185,934	0	182,755	0	415,567	0
Sonora	90,135	0	90,135	0	211,142	0
Tamaulipas	4,741	45,032	4,024	43,275	4,884	51,475
Veracruz	0	1,388	0	1,102	0	1,337
TOTAL	290,910	57,345	286,666	55,013	649,347	75,622

Nota: R= riego T= temporal

(SARH, 1992a)

inoculantes comerciales para soya, por lo cual se decidió a realizar diferentes ensayos tendientes a determinar el efecto de los inoculantes existentes en el mercado, así como, determinar la interacción entre inoculantes, fósforo y microelementos. Los resultados de este estudio permitieron observar que la adición de fósforo favorecía el desarrollo de la leguminosa, así como la infección por la cepa de Bradyrhizobium del inoculante, obteniéndose un mayor número de nódulos que resultaron no efectivos en la fijación de nitrógeno, ya que el rendimiento de grano fue similar a los testigos no inoculados, e inferior a los testigos fertilizados con nitrógeno mineral, resultados que permitieron comprobar la ineficiencia de las cepas contenidas en los inoculantes comerciales utilizados (Programa de fertilidad estatal, 1977).

Considerando estos antecedentes se inició un programa de selección de cepas de Bradyrhizobium japonicum a través de ensayos de invernadero con base en su eficiencia para fijar nitrógeno. Posteriormente en ensayos de campo ubicados en diferentes localidades de Tamaulipas se evaluó el efecto de la inoculación con cepas seleccionadas y la interacción de éstas con diferentes dosis de fósforo y densidad de siembra, empleando a la variedad Júpiter como hospedero, ya que es la variedad recomendada para esa región. Los resultados obtenidos permitieron observar que en los experimentos ubicados en los municipios de González y Mante, parcelas en las que se había cultivado previamente soya, no se registró respuesta a la inoculación, en tanto que en el municipio de Llera, en donde los experimentos se establecieron en parcelas recién abiertas al cultivo, la respuesta a la inoculación varió en las diferentes parcelas, así como en función de las cepas experimentales empleadas, obteniéndose en uno de los casos incrementos en el rendimiento de grano de 800 Kg/ha, comprobándose nuevamente la ineficiencia de las cepas de los inoculantes comerciales. Estos resultados, que indican la influencia del tipo de suelo y de la presencia de cepas preestablecidas sobre el rendimiento, permitieron ratificar los reportes de otros investigadores que indican que el éxito de la inoculación depende no sólo de la eficiencia de las cepas, sino también de su interacción con el hospedero y con otros factores ambientales. Este último aspecto fué evidenciado claramente en los experimentos ubicados en los municipios de González y Mante en donde se registró un número de nódulos elevado, tanto en las parcelas inoculadas como en los tratamientos testigo, por lo que la carencia de respuesta se atribuyó a la presencia de rhizobia preestablecidas procedentes de inoculaciones previas; las que probablemente compitieron con las cepas en estudio y dieron lugar a la formación de abundantes nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno (Programa de Fertilidad Estatal, 1979). En estudios posteriores se procedió a evaluar la eficiencia de las cepas en presencia de suelo procedentes de diferentes estados, este estudio se realizó en colaboración con el Instituto de Investigaciones Agrícolas (actualmente INIFAP) a través del Dr. Jorge Nieto Hatem y Dr. Jesús Moncada de la Fuente. Como era de esperarse, la respuesta a la inoculación varió en los diferentes suelos, observándose que las

cepas FQ17 y FQ18 dieron lugar al mayor aumento de masa seca (Tsuzuki et al., 1985).

El siguiente objetivo de esta serie de estudios fue el de seleccionar las asociaciones más eficientes de Bradyrhizobium japonicum-Glycine max, para ello se probaron cepas previamente seleccionadas por su eficiencia en la fijación de nitrógeno, las que se inocularon en diversas variedades de soya de interés comercial en México. Los resultados permitieron seleccionar cepas que establecen asociaciones eficientes con un amplio intervalo de hospederos, observándose que algunas variedades de soya se asocian indistintamente con todas las cepas probadas, en tanto que otras parecen ser mas selectivas, por lo que dieron lugar a asociaciones eficientes con una o dos de las 14 cepas probadas (Ramírez-Gama et al., 1992).

Respecto a la producción de soya en México, en la tabla 5, se puede observar que ésta se ha mantenido más o menos constante, que la producción por hectárea ha sido mejorada alcanzando un nivel similar al obtenido por los países productores de este grano (tabla 6); no obstante, las importaciones de este grano se han incrementado (tabla 7). Lo anterior indica que no se satisface la demanda nacional y que se requiere de mayores esfuerzos para aumentar la producción de este grano.

TABLA 5. PRODUCCIÓN DE SOYA EN MÉXICO

Año	miles de toneladas	Valor de producción (millones de pesos)
1985	929	79 920
1986	709	115 932
1987	828	384 289
1988	226	175 620
1989	992	952 945
1990	575	469 349
1991	725	918 946

TABLA 6. RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE SOYA EN LOS PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES (ton/ha)

Países	Años					
	1980	1982	1984	1986	1988	1990
Canadá	2.51	2.30	2.26	2.49	2.16	2.55
Estados Unidos	1.77	2.20	1.89	2.23	1.82	2.29
Argentina	1.72	2.00	2.40	2.14	2.26	2.24
México	2.09	1.69	1.76	1.86	1.63	2.01
Brasil	1.55	1.60	1.65	1.45	1.71	1.74
Paraguay	1.21	1.70	1.43	1.22	1.84	1.97
China	1.05	0.90	1.33	1.40	1.44	1.51
India	0.80	0.60	0.78	0.58	0.91	0.89
Media mundial	1.60	1.80	1.70	1.80	1.72	1.92

(SARH, 1992b).

TABLA 7. IMPORTACIONES DE SOYA EN MÉXICO (toneladas)

1990	1991	1992
Enero - Diciembre	Enero - Diciembre	Enero - Abril
896,995	1,489,310	791,512

( SARH, 1992c).

Considerando lo anterior, el presente trabajo intenta contribuir a estos programas de mejoramiento del cultivo de la soya en México a través de los siguientes:

### 3. OBJETIVOS

- Validar la infectividad y efectividad de cepas de Bradyrhizobium japonicum previamente seleccionadas.
- Determinar la habilidad competitiva de las cepas seleccionadas de Bradyrhizobium japonicum entre sí y frente a la biota nativa.
- Validar las cepas seleccionadas, bajo diferentes condiciones de campo.

Para alcanzar estos objetivos, y considerando la importancia de estudios interdisciplinarios e interinstitucionales, la Facultad de Química UNAM estableció colaboración con las siguientes instituciones: Universidad Autónoma de Tamaulipas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, e Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Unidad Querétaro), procediéndose a desarrollar los experimentos que a continuación se describen.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

##### 4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL TRABAJO REALIZADO Y ORIGEN DE LAS CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum.

El estudio se dividió en tres etapas que comprenden ensayos de laboratorio, de invernadero y de campo.

Se utilizaron ocho cepas de procedencia diversa, proporcionadas por la colección de la Facultad de Química UNAM, las que han sido conservadas por liofilización (tabla 8).

##### 4.2 ENSAYOS DE LABORATORIO.

Esta etapa incluye actividades previas y/o complementarias para los ensayos de invernadero y de campo, para los que se realizaron:

- 1) Producción de material biológico para serología.
- 2) Producción de inoculantes.
- 3) Preparación de unidades experimentales para los ensayos en invernadero.
- 4) Determinación del rendimiento de peso seco en material vegetal.
- 5) Identificación serológica de cepas en los nódulos.

##### 4.2.1 SEROLOGÍA

##### 4.2.1.1 PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS CELULARES.

- Activación de las cepas.

A partir de cultivos liofilizados se realizó la inoculación en caldo-extracto de levadura-manitol (CELM) (Vincent, 1970), incubándose a 28 °C y 200 rpm durante 7 días en una agitadora-incubadora New Brunswick Scientific Co. Mod. G-24. Al final del período de incubación se determinó la pureza de los cultivos mediante observación al microscopio de preparaciones teñidas por la técnica de Gram.

Los cultivos puros fueron inoculados en tubos con extracto de levadura-manitol-agar+rojo congo (ELMARC) (Vincent, 1970) inclinados y se incubaron a 28 °C durante 7 días, después de los cuales se comprobó nuevamente su pureza y se almacenaron a 5 °C como cultivos de reserva.

- Propagación masiva de las cepas.

A partir de cultivos activos y de pureza comprobada se inoculó sobre la superficie del medio ELMA en frascos con lados planos (tipo Rouge), y se incubó a 28 °C durante 5 días. Al final de este período nuevamente se comprobó la pureza de los cultivos (Somasegaram et al., 1981).

TABLA 8 PROCEDENCIA DE LAS CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum.

Clave en la Fac. de Química	.Institución donante .Recibida con clave .Fecha de recepción	Otras claves conocidas *	Aislada en *
FQ 3	.ENCB, IPN México .ENCB 511 .1983		
FQ 4	.ENCB, IPN México .ENCB 515 .1977		
FQ 7	.CP, Montecillo, Méx. .CP 21 .1978	TAL 103	
FQ 8	.Univ. Hawaii EUA .TAL 102 .1978	IITA 18 3I1b110 CP 20	Florida, EUA
FQ 9	.Univ. Hawaii EUA .TAL 379 .1978	USDA 136b NT001/CB1809 INTEC 149	Maryland, EUA
FQ 12	.IPAGRO, Brasil .SEMIA 532 .1979	UFGRS 532c TAL 431	Rio Grande do Sul, Brasil
FQ 16	.IPAGRO, Brasil .SEMIA 587 .1979	TAL 435	Rio Grande do Sul, Brasil
FQ 17	.UAT, México .3I1b110 .1979	TAL 102 IITA 18 CP 20	Florida, EUA
FQ 18	.UAT, México .3I1b136 .1979	TAL 379 INTEC 149 RRC 3407	Maryland, EUA
FQ 34	.CP, Montecillo, México. .VMR30 .1984		
FQ45	.Fac. Química UNAM .1984		Chiapas, México.
FQ 46	.Fac. Química UNAM .1984		Chiapas, México.
FQ 47	.Fac. Química UNAM .1984		Inoculante comercial

\* Fuente: MIRCEN/UNEP/UNESCO/ICRO/IPAGRO, 1984.

- Cosecha de las células.

A cada frasco con desarrollo bacteriano se le adicionaron 5 ml de solución salina isotónica (SSI) y perlas de vidrio de 6 mm de diámetro, estériles. Manualmente se aplicó movimiento suave a los frascos, provocando el desplazamiento de las perlas y la SSI sobre la superficie del medio para obtener las suspensiones celulares (Somasegaram et al., 1981).

- Obtención de antígenos.

Las suspensiones celulares se lavaron tres veces con SSI estéril (Vincent, 1970) mediante centrifugaciones de 20 minutos a 3500 rpm. en una centrífuga BHG Ultima II, Universal, S.A. Finalmente, mediante nefelometría de MacFarland (Bradshaw, L.J. 1976), se ajustó una porción con SSI estéril a una población aproximada de  $1 \times 10^9$  células/ml para usarlas como antígeno de inmunización. La otra porción de las suspensiones se ajustó a aproximadamente  $1.5 \times 10^{10}$  células por ml para usarlas como antígenos celulares en la determinación del título de anticuerpos en los sueros inmunes. Los antígenos se repartieron en volúmenes de 3 ml en frascos viales estériles y se conservaron a  $5^{\circ}\text{C}$  (Somasegaram et al., 1981).

#### 4.2.1.2 PREPARACIÓN DE SUEROS INMUNES.

Conejos hembra "Nueva Zelanda" de aproximadamente 3 Kg de peso y 60 días de edad fueron sometidos al siguiente esquema de inmunización

ESQUEMA DE INMUNIZACION (Somasegaran et al., 1981).

Día	Tratamiento
0	Sangría inicial de la vena marginal de la oreja y reacción serológica de control.
1	Inyección subcutánea de 1.0 ml de suspensión celular + adyuvante completo de Freund (1:1).
14	Inyección intravenosa de 1.0 ml de suspensión celular.
28	Sangría de prueba en la vena marginal de la oreja (De terminación del título de anticuerpos).
30	Sangría por punción cardíaca.
37	Inyección intravenosa de 1.2 ml de suspensión celular.
44	Sangría por punción cardíaca.

La sangre obtenida fue refrigerada toda la noche para separar con mayor facilidad el suero del coágulo. El suero se centrifugó a 3500 rpm para separar restos celulares; se repartieron volúmenes de 2 ml en frascos viales estériles y se mantuvieron en congelación (Vincent, 1970).

#### 4.2.1.3 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS EN SUEROS INMUNES.

El título de anticuerpos se determinó mediante la técnica de aglutinación en placa. Sobre placas de vidrio se colocó una serie de diluciones al doble (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, ...) del suero a probar, en volúmenes de 0.03 ml por dilución; a cada uno se adicionaron 0.03 ml del antígeno celular homólogo, se mezclaron cuidadosamente y se observó la reacción de aglutinación con ayuda de luz difusa (Somasegaran et al., 1981).

#### 4.2.1.4 REACCIONES CRUZADAS ENTRE CEPAS Y SUEROS INMUNES.

Mediante aglutinación en placa se hicieron reacciones cruzadas entre los antígenos celulares y los sueros inmunes obtenidos en este estudio. Para ello, sobre una placa de vidrio se colocaron tantos volúmenes de 0.03 ml de un antígeno celular determinado,

como número de sueros inmunes fueran a probarse; estos sueros se diluyeron en proporciones de 1:10, se adicionaron en volúmenes de 0.03 ml, se mezclaron perfectamente y las reacciones se observaron con ayuda de luz difusa. Esto se realizó con cada uno de los antígenos celulares.

#### 4.2.1.5 IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LAS CEPAS OCUPANTES DE LOS NÓDULOS.

Debido a la gran cantidad de nódulos muestreados, no era posible procesarlos inmediatamente, por ello se procedió a secarlos en estufa a 70°C durante 48 horas y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento, con el método de Somasegaran et al. (1983).

Para realizar la identificación serológica de las cepas, los nódulos secos se colocaron en tubos pequeños, un nódulo por tubo, se les adicionaron 5 a 8 gotas de SSI de acuerdo al tamaño del nódulo, y se dejaron hidratar en refrigeración toda la noche. Una vez hidratados, se trituraron con ayuda de agitadores de vidrio de extremos redondeados para obtener los extractos nodulares, los que se hicieron reaccionar con cada uno de los sueros inmunes diluidos, utilizando la técnica de aglutinación en placa descrita en 4.2.1.4.

Como testigos para detectar posibles autoaglutinaciones se usaron las mezclas suero-SSI y extracto nodular-SSI en cada sistema de reacción (Somasegaran et al., 1981).

#### 4.2.2 PRODUCCIÓN DE INOCULANTES.

En este estudio se utilizaron dos tipos de inoculantes: inoculantes líquidos para los ensayos de invernadero en los que las plantas se cultivaron sobre soporte inerte estéril, e inoculantes sólidos para ensayos de invernadero en los que se usaron muestras de suelo, así como, para los ensayos de campo.

##### 4.2.2.1 Inoculantes líquidos.

A partir de cultivos de reserva, las cepas se activaron mediante la inoculación de cada una en el medio CELM (Vincent, 1970) y se incubaron a 28 °C y 200 rpm durante 7 días. Después de verificar pureza, cada cultivo fue transferido a medio CELM fresco en una proporción de 5% (v/v), se incubó a 28 °C y 200 rpm durante 5 a 7 días, de acuerdo al tiempo requerido por cada cepa para alcanzar el final de la fase logarítmica (Balatti, 1982). Nuevamente se verificó la pureza de los cultivos y se procedió a ajustar la población celular dentro de un intervalo de 1 a 4 X10<sup>9</sup> células/ml (140 UK). Cada cultivo representó un inoculante unicepa. En el caso de inoculantes multicepa, éstos se obtuvieron mezclando volúmenes iguales de cada cultivo al momento de aplicar el tratamiento.

#### 4.2.2.2 Inoculantes sólidos.

La activación y propagación de las cepas se realizó de la misma manera que los inoculantes líquidos.

Como soporte del inoculante se utilizó turba con un tamaño de partícula de 200 mallas; se ajustó el pH a 6.8 con la adición de  $\text{CaCO}_3$  al 5% (p/p) y se esterilizó a 121 °C y 15 lb de presión durante 2 horas. Para reducir la humedad se mantuvo en una estufa a 45 °C hasta que solamente presentara un 5% de contenido de humedad.

La turba estéril fue inoculada por lotes, con los cultivos de cada cepa con población estandarizada a  $1.5 \times 10^9$  células/ml, con el volumen necesario para obtener un 50% de contenido de humedad en el producto final. Posteriormente dichos lotes fueron sometidos a un período de maduración de 15 días a 28 °C y empaquetados en bolsas de polietileno.

Los inoculantes multicepa se obtuvieron mezclando cantidades equivalentes de tres inoculantes unicepa después del período de maduración. Todos los inoculantes fueron mantenidos en refrigeración hasta su uso.

#### 4.2.2.3 Control de calidad.

Este se realizó en cultivos líquidos mediante la tinción de Gram y observación microscópica, lo que permitió verificar pureza durante la activación y propagación de las cepas.

En los inoculantes sólidos se hizo la cuantificación de la población celular en producto terminado por la técnica de dilución y siembra en placas de ELMA + RC, lo que permitió verificar la cantidad de microorganismos viables y la ausencia de contaminantes. (Vincent, 1970).

### 4.3 ENSAYOS DE INVERNADERO.

#### 4.3.1 Unidad experimental.

Para los ensayos bajo condiciones microbianas y nutricionales controladas, la unidad experimental estuvo representada por una maceta de plástico de 20 X 25 cm., la cuál fue desinfectada con etanol al 70%. Cada maceta se llenó hasta 3/4 de su volumen con tezontle (partículas con un tamaño promedio de 5 mm) esterilizado a vapor durante 1.5 horas y fue cubierta con papel resistente a la humedad.

En los ensayos con muestras de suelo la unidad experimental estuvo constituida por una maceta de plástico con 4 Kg. de suelo.

#### 4.3.2 Solución nutritiva.

En las macetas con tezontle se utilizó la solución nutritiva de Jensen (Vincent, 1970), la que se agregó a través de un tubo de vidrio estéril incorporado en cada unidad experimental para controlar contaminaciones cruzadas con unidades adyacentes.

#### 4.3.3 Muestras de suelo.

Se utilizaron muestras de suelo de los municipios de González, Mante y Llera, de la zona sur de Tamaulipas. De los sitios seleccionados se tomaron muestras de 0 a 40 cm. de profundidad y se mezclaron para obtener muestras compuestas en cada localidad. Los tres suelos fueron fertilizados con superfosfato de calcio triple en dosis de 60 Kg. de  $P_2O_5$ /ha. Las características de estos suelos son muy parecidas y corresponden a fertilidad media, pH 8.4, 8.1, 8.2; % de materia orgánica (M.O) 3.1, 3.2, 3.0; % de N 0.28, 0.24 y 0.18 respectivamente. Los tres suelos poseen textura franca.

#### 4.3.4 Preparación de hospederos.

Semillas certificadas de Glycine max (L.) Merrill, de las variedades Júpiter, UFV-1 y Santa Rosa (variedades recomendadas para el trópico húmedo) fueron desinfectadas mediante inmersión momentánea en etanol al 95%, tratamiento de 4 min con hipoclorito de sodio al 5% y lavados exhaustivos con agua estéril (Vincent, 1970). Se dejaron germinar bajo condiciones asépticas a 28 °C durante 3 días. Al término de este período se colocaron 4 semillas germinadas por unidad experimental.

#### 4.3.5 Inoculación.

En los ensayos con tezontle como soporte, cada semilla germinada fue inoculada con 1.0 ml. de inoculante líquido unicepa ó multicepa, de acuerdo con el tratamiento correspondiente. Los testigos sin inocular fueron tratados con 1.0 ml. de medio de cultivo CELM estéril por semilla. Para las macetas con muestras de suelo, las semillas sin germinar se colocaron en bolsas de polietileno, se les agregó goma arábiga al 40% como adherente (Vincent, 1970), se mezcló perfectamente y se agregó el inoculante sólido correspondiente en dosis de 1% respecto al peso de semilla. Se mezcló el contenido hasta que las semillas se observaron totalmente cubiertas con el inoculante y se sembraron en las macetas previamente humedecidas al 60% de su capacidad de campo.

#### 4.3.6 Condiciones de desarrollo del cultivo.

Las unidades experimentales permanecieron en invernadero con temperaturas de 18 °C y 32 °C (noche/día), humedad relativa de 70-

80% y 13 horas de luminosidad/día, hasta el inicio de la floración, período que fue diferente para cada variedad de soya.

En los ensayos con tezontle como soporte, que se realizaron en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química UNAM, se aplicaron riegos alternos de agua destilada y solución nutritiva de Jensen estériles durante el desarrollo del cultivo.

Las macetas con muestras de suelo fueron regadas con agua corriente y con la frecuencia necesaria. Este experimento fue realizado en el invernadero del Instituto de Investigaciones Alimentarias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, a donde se enviaron los inoculantes sólidos y la metodología para la inoculación.

#### 4.3.7 Tratamientos.

Los ensayos sobre tezontle como soporte se realizaron en dos experimentos de invernadero (EI). En el primero (EI-1) se utilizaron las variedades Júpiter y UFV-1 con 19 tratamientos (7 cepas, 10 mezclas constituidas por combinaciones de las cepas individuales de 3 en 3, y 2 testigos); en el segundo (EI-2) la variedad Santa Rosa y nuevamente la variedad Júpiter con los 19 tratamientos anteriores y cinco adicionales que corresponden a 5 cepas que no habían sido probadas. El tercer ensayo de invernadero se realizó en muestras de suelo (EI-3), únicamente se utilizó la variedad Júpiter y los 19 tratamientos del primer experimento (tabla 9). Los tratamientos testigo en los experimentos con tezontle como soporte correspondieron a: T(-) que no fue inoculado y fue mantenido con solución de Jensen libre de nitrógeno, y T(+), no inoculado y mantenido con solución de Jensen que contenía 70 ppm de N (proporcionado como  $\text{KNO}_3$ ). En el experimento con muestras de suelo, los tratamientos testigo fueron: sin inoculante ni fertilizante nitrogenado (T-); y sin inoculante pero adicionado de urea (40 Kg. N/ha), T(+).

TABLA 9 TRATAMIENTOS APLICADOS EN LOS ENSAYOS DE INVERNADERO

Tratamiento	Clave del ensayo donde fue aplicado		
	EI-1 <sup>a</sup>	EI-2 <sup>b</sup>	EI-3 <sup>c</sup>
T(-)	*	*	*
T(+)	*	*	*
Cepa FQ 4	*	*	*
Cepa FQ 7	*	*	*
Cepa FQ 9	*	*	*
Cepa FQ 12	*	*	*
Cepa FQ 16	*	*	*
Cepa FQ 17	*	*	*
Cepa FQ 18	*	*	*
Mezcla FQ 4-7-9	*	*	*
Mezcla FQ 4-12-16	*	*	*
Mezcla FQ 4-17-18	*	*	*
Mezcla FQ 4-16-18	*	*	*
Mezcla FQ 7-12-16	*	*	*
Mezcla FQ 7-17-18	*	*	*
Mezcla FQ 9-12-16	*	*	*
Mezcla FQ 9-17-18	*	*	*
Mezcla FQ 12-16-17	*	*	*
Mezcla FQ 12-17-18	*	*	*
FQ 3		*	
FQ 34		*	
FQ 45		*	
FQ 46		*	
FQ 47		*	

\* Tratamiento aplicado.

a Ensayo con soya de las variedades Júpiter y UFV-1.

b Ensayo con soya de las variedades Júpiter y Santa Rosa.

c Ensayo con soya variedad Júpiter.

#### 4.3.8 Diseño experimental.

Para validar la eficiencia de las cepas con diferentes variedades de soya se realizaron dos experimentos en invernadero con las variedades Júpiter, UFV-1, y Santa Rosa, Júpiter respectivamente. En dichos experimentos se usaron cultivos hidropónicos para medir la interacción cepa-hospedero sin la influencia de otros factores.

En el experimento EI-1 se utilizaron 7 cepas que fueron inoculadas individualmente, de manera que cada una constituyó un tratamiento independiente. Con el fin de determinar la capacidad competitiva de las mismas se eligió un arreglo combinatorio relacionando entre sí a cada una de las 7 cepas en combinaciones de 3 cada vez [ $n!/k!(n-k)!$ ], de lo que resultaron 35 combinaciones. Sin embargo, por limitaciones de espacio en el invernadero, tiempo y recursos materiales para procesar el gran volumen de muestras que se originaría únicamente se probaron 10 de las 35 combinaciones. Como referencia para determinar el efecto de las cepas se usaron 2 tratamientos sin inocular, a uno de ellos se le proporcionó nitrógeno mineral (T+) y al otro no (T-). La distribución de las unidades experimentales en el invernadero fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento.

Con el experimento EI-2 se usaron los mismos tratamientos del experimento EI-1 y 5 cepas adicionales, de las cuales no se hicieron mezclas, únicamente se inocularon de manera individual. En cuanto a la distribución de las unidades experimentales, debido al mayor número de unidades se ocupó el área total del invernadero, en cuyos extremos se detectaron variaciones de temperatura con respecto a la parte media del mismo, por lo que se optó por un diseño de bloques completos al azar con cinco repeticiones por tratamiento.

Con el fin de determinar el efecto del factor suelo sobre la asociación cepa-hospedero, en el experimento EI-3 se utilizaron los tratamientos del experimento EI-1 con muestras de suelo de 3 localidades del sur de Tamaulipas y la variedad de soya Júpiter. Para la distribución de las unidades en el invernadero se usó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento.

#### 4.3.9 Determinaciones.

Para determinar la eficiencia de las cepas en la fijación del nitrógeno atmosférico, se midieron las variables peso seco de la parte aérea y peso seco de nódulos. Para ello se separó la parte aérea de la planta a la altura de donde se encontraban los cotiledones, se secó en estufa a 70 °C durante 72 hs. y se determinó el peso.

La sección radical fue extraída de la maceta removiendo el tezontle ó el suelo de la misma, ésta se lavó con precaución sobre un tamiz para quitar restos del soporte ó de suelo sin perder nódulos. Los nódulos fueron desprendidos manualmente del sistema radical, se secaron a 70 °C durante 48 hs. y se les determinó el peso.

Relacionando las dos variables anteriores, se determinó la eficiencia de la simbiosis de acuerdo a Materon y Vincent (1980), que consiste en calcular el incremento en rendimiento por unidad de masa nodular: 
$$\frac{\text{(rendimiento del tratamiento inoculado)} - \text{(rendimiento del tratamiento no inoculado)}}{\text{(masa nodular)}}$$

La determinación de la competitividad se realizó mediante la tipificación serológica de los nódulos, como se describe en 4.3.5. Para ello la toma de muestras de nódulos secos se realizó sobre 3 repeticiones de cada experimento. Por tratamiento se tomaron 15 nódulos de cada repetición, originando un total de 45 nódulos por tratamiento.

#### 4.4 ENSAYOS EN CAMPO (EC).

Con el objeto de comprobar la eficiencia de las cepas y determinar la competitividad de las mismas bajo condiciones de campo, se realizaron tres experimentos en colaboración con dos instituciones: El Instituto de Investigaciones Alimentarias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas y el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro. Para estos experimentos, los inoculantes sólidos se prepararon en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química UNAM, en donde también se llevó a cabo el control de calidad. La inoculación y el muestreo efectuado en la etapa de floración se realizó conjuntamente con el personal de las instituciones indicadas, las que además tuvieron a su cargo el cuidado de los experimentos y la evaluación del rendimiento de grano.

Para la toma de muestras de nódulos se utilizaron las plantas de los surcos laterales de la parcela útil. Mediante una pala recta se realizó la excavación y extracción del sistema radical completo, seguido por lavados sobre un tamiz para evitar pérdida de nódulos (Norris y Date, 1976). El tratamiento de las muestras para determinar las variables peso seco de parte aérea, peso seco de

nódulos y porcentaje de nódulos formados por cada cepa fue el mismo que se aplicó para los ensayos de invernadero.

#### 4.4.1 Ensayo en el municipio de González, Tamaulipas (EC-1).

En este ensayo realizado en un suelo migajón-arcilloso de pH 7.95 y con soya variedad Júpiter, se emplearon cinco de las cepas seleccionadas en ensayos de invernadero (cepas FQ); un inoculante proporcionado por Fertimex (FM), uno proporcionado por FIRA (FIR) y un inoculante comercial (NIT). Los testigos empleados fueron T(-) sin fertilizante; T(+P) fertilizado con superfosfato de calcio triple (00-30-00); T(+N+P) fertilizado con urea y superfosfato de calcio triple (30-30-00). Ver tabla 10.

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se evaluaron las variables peso seco de nódulos, % de plantas noduladas y % de nodulación de cada cepa.

#### 4.4.2 Ensayo en el municipio de Apaseo El Alto, Guanajuato (EC-2).

El ensayo se realizó sobre un suelo arcilloso de fertilidad media y pH 7.0, con las variedades de soya Cajeme y BM-2. Dichas variedades son las recomendadas para esa región y aunque no eran las variedades con las que se estaba trabajando, se consideró conveniente probar el efecto de algunas de las cepas en estudio sobre tales variedades en esa localidad, además se incluyó una cepa - FQ8 - que en estudios previos ha sido reportada como eficiente para esas variedades. Los tratamientos aplicados se describen en la tabla 10, donde T(-) corresponde al testigo sin fertilizar, T(+N+P) es el testigo fertilizado con urea y superfosfato de calcio triple (40-50-00). Todos los tratamientos inoculados fueron fertilizados con fósforo. El diseño experimental usado fue de dos factores (variedad de soya e inoculantes) con 10 tratamientos, con arreglo combinatorio y distribución en bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento.

Las variables evaluadas fueron: % de plantas noduladas, peso seco de nódulos, % N en la parte aérea de las plantas, % de nodulación de cada cepa y rendimiento de grano.

#### 4.4.3 Ensayo en el municipio de Mante, Tamaulipas (EC-3).

En este experimento se usó soya variedad Júpiter, sobre un suelo migajón-limoso con pH de 8.12, y por intereses del agricultor cooperante únicamente se probaron dos cepas. Se utilizaron los tratamientos descritos en la tabla 10, donde T(-) fue el testigo sin fertilizar y T(+N+P) fue fertilizado con urea y superfosfato de calcio triple (40-40-00). La mitad de los tratamientos inoculados recibieron fertilización fosfatada (+P). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con cinco repeticiones por

tratamiento. Se evaluaron las variables peso seco de nódulos y % de nodulación de cada cepa.

Como puede observarse el diseño experimental y las variables evaluadas no son iguales en todos los experimentos. Esto se debe a que cada uno se adecuó a las condiciones de los sitios en que se realizaron y a los objetivos particulares de las instituciones colaboradoras.

TABLA 10. TRATAMIENTOS APLICADOS EN LOS ENSAYOS DE CAMPO

EC-1	EC-2	EC-3
T(-)	T(-)	T(-)
T(+P)	T(+N+P)	T(+N+P)
T(+N+P)	FQ 8(+P)	T(+P)
FQ 4	FQ 9(+P)	FQ 17(+P)
FQ 7	FQ 17(+P)	FQ 16(+P)
FQ 9	FQ 18(+P)	FQ 17
FQ 17	FM(+P)	FQ 16
FQ 18	FIR(+P)	
FM	NIT(+P)	
FIR	Mezcla(+P)	
NIT		

Mezcla: FQ 8-9-18 para la var. BM-2 y FQ 9-17-18 para la var. Cajeme.

#### 4.5 Análisis estadístico.

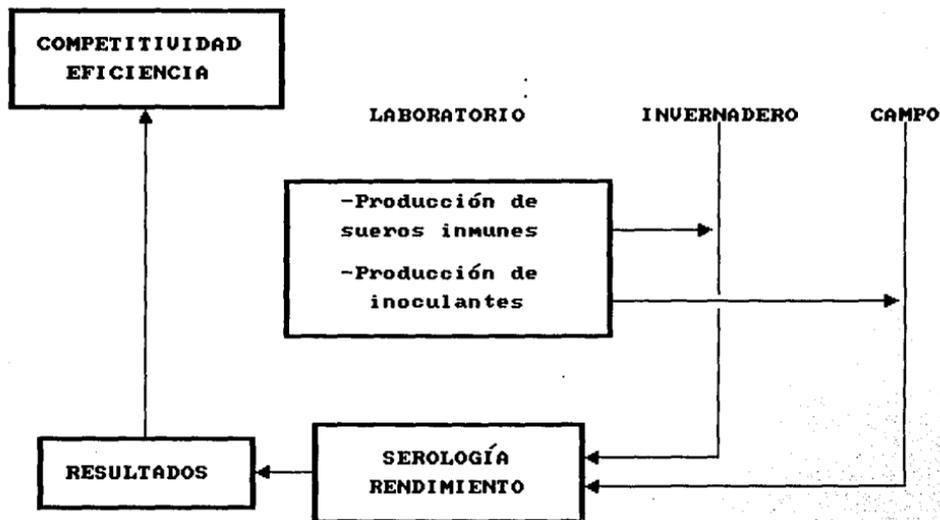
A las variables peso seco de parte aérea, peso seco de nódulos, porcentaje de nitrógeno en parte aérea y rendimiento de grano se les aplicó análisis de varianza, y cuando se detectó diferencia significativa entre tratamientos se realizaron pruebas de comparación múltiple de Duncan o la prueba de Tukey.

Para analizar la competitividad de las cepas, con los datos de número de nódulos formados por cada cepa en cada mezcla, se realizó en el experimento de macetas con tezontle (EI-1) un análisis de varianza para un factor, y para la separación de medias se aplicó

el método de Scheffé. En el caso de las mezclas en las que dos de las tres cepas no pudieron ser diferenciadas mediante serología por presentar reacción cruzada, el análisis se realizó mediante pruebas de hipótesis.

Para el experimento en macetas con tres muestras de suelo (EI-3) se realizó un análisis de factores con diseño en cuadro latino 3X3 o de bloques al azar 3X2 para el caso en el que dos de las cepas de la mezcla presentaron reacción cruzada y por lo tanto no fue posible diferenciarlas. La separación de medias se realizó por el método de Scheffé (Martínez, 1988).

## DIAGRAMA DE TRABAJO



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 SEROLOGÍA.

## 5.1.1 Título de anticuerpos de los sueros inmunes.

TABLA 11. TÍTULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CONTRA OCHO CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum

Cepa	Lote de suero <sup>1</sup>	Título
FQ 4	I	1:1 600
	II	1:3 200
FQ 7	I	1:3 200
	II	1:1 600
FQ 8	I	1:3 200
	II	1:8 000
FQ 9	I	1:320
	II	1:800
FQ 12	I	1:1 600
	II	1:3 200
FQ 16	I	1:4 800
	II	1:3 200
FQ 17	I	1:3 200
	II	1:8 000
FQ 18	I	1:1 600
	II	1:3 200

1 Cada lote corresponde al suero obtenido de un conejo.

Los títulos de anticuerpos de los sueros obtenidos en cada conejo fueron variables incluso para un mismo antígeno celular. En la tabla 11 se observa que los títulos obtenidos varían, en promedio, de 1:1600 a 1:3200 con excepción de 1:8000 de los sueros contra los antígenos celulares FQ8 y FQ17. Un caso muy especial fue la respuesta de los conejos a la inmunización con el antígeno FQ9, obteniéndose títulos de 1:320 y 1:800, los mas bajos de la serie de

sueros obtenidos. Lo anterior se debe a que la misma suspensión de antígeno puede inducir diferente respuesta inmunológica de conejo a conejo, y estas diferencias pueden reflejarse en el título, tipo de anticuerpos producidos y en el balance entre formas de inmunoglobulinas presentes en el suero (Vincent, 1982).

5.1.2 Reacciones de aglutinación cruzada que presentaron las ocho cepas de Bradyrhizobium japonicum.

En la tabla 12 se observa, que ninguna de las cepas presenta reacción específica con su suero homólogo, sino también presenta reacción heteróloga con al menos uno o mas de los sueros obtenidos. Lo anterior indica que las cepas poseen antígenos comunes.

Por otra parte, la información obtenida en el manual sobre colecciones de cepas de Rhizobium en América Latina (MIRCEN, 1984) indican que las cepas FQ9 y FQ18 (que se habían trabajado como cepas diferentes) tienen el mismo origen, es decir, es una sola cepa que fue proporcionada con claves diferentes, lo cual fue apoyado por los resultados de aglutinación cruzada y por los resultados de Castillo-Cano y Ronzón (1987), quienes al trabajar con estas cepas observaron bandas de identidad en inmunodifusión en gel y la ausencia de reacción cuando se aplicaron técnicas de adsorción de aglutininas.

Situaciones similares parecen presentarse entre los pares de cepas: FQ8-FQ17, FQ4-FQ16 y FQ7-FQ12, por lo que se recomienda realizar mas pruebas aplicando técnicas de inmunodifusión en gel y técnicas de adsorción de aglutininas para determinar la identidad serológica de dichas cepas.

TABLA 12. REACCIONES DE AGLUTINACIÓN CRUZADA ENTRE OCHO CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum

Suero inmune contra:	Cepas (antígenos)							
	FQ4	FQ7	FQ8	FQ9	FQ12	FQ16	FQ17	FQ18
FQ 4	3200	-	-	-	-	3200	-	-
FQ 7	-	3200	-	-	1600	-	-	-
FQ 8	-	-	3200	80	-	-	3200	160
FQ 9	-	-	160	800	-	-	-	800
FQ 12	-	1600	-	-	3200	-	-	-
FQ 16	3200	-	-	-	-	3200	-	-
FQ 17	-	-	3200	-	-	-	3200	-
FQ 18	-	-	80	3200	-	-	-	3200

Las cantidades corresponden al inverso de la dilución en la cual aún se detecta reacción.

- No presentó reacción.

## 5.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS INOCULANTES.

El proceso de producción de inoculantes fue eficiente y el producto obtenido de buena calidad, ya que las pruebas de control permitieron establecer ausencia de contaminantes y número elevado de bradyrhizobia,  $1.2 \times 10^9$  a  $4.2 \times 10^9$  células/ml en los inoculantes líquidos preparados para los experimentos EI-1 y EI-2 (tabla 13).

Aun cuando en la producción de inoculantes sólidos, el caldo inóculo en todos los casos se ajustó nefelométricamente a poblaciones dentro del intervalo  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^9$  células/ml antes de agregarlo a la turba, los resultados de la cuantificación de células viables en producto terminado muestran una gran variabilidad, lo que se atribuye a las características de desarrollo de cada cepa en particular, las que se multiplicaron a diferentes velocidades durante el período de maduración del inoculante.

Las cantidades de células viables fluctuaron de  $4.8 \times 10^{10}$  hasta más de  $300 \times 10^{13}$ /g de inoculante (ver datos para EI-3, EC-1, EC-2 y EC-3 en tablas 13 y 14). Considerando las normas establecidas que indican que un inoculante de buena calidad debe contener de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  células/g (Ramírez-Gama *et al.*, 1984), se tiene que en todos los casos, los inoculantes empleados fueron de buena calidad, y que ésta estuvo dada no solo por la cantidad de bradyrhizobia viables, sino también por las características de las cepas en cuanto a eficiencia en la fijación de nitrógeno y competitividad, como lo demuestran los resultados que se discuten a continuación.

TABLA 13. POBLACIÓN DE Bradyrhizobium japonicum EN LOS INOCULANTES UNICEPA UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE INVERNADERO.

Cepa	Ensayo: EI-1 ( $\times 10^9$ cel/ml)*	EI-2 ( $\times 10^9$ cel/ml)*	EI-3 ( $\times 10^{13}$ cel/g)**
FQ 3		3.6	
FQ 4	1.3	3.6	1.6
FQ 7	1.2	3.7	>300
FQ 9	2.1	3.8	>300
FQ 12	1.8	3.4	0.01
FQ 16	3.1	3.8	130
FQ 17	1.3	4.2	>300
FQ 18	1.4	3.4	>300
FQ 34		3.2	
FQ 45		3.3	
FQ 46		3.4	
FQ 47		3.8	

\* Determinado por nefelometría de McFarland.

\*\* Determinado por cuenta de células viables.

TABLA 14. POBLACIÓN DE CÉLULAS VIABLES DE Bradyrhizobium japonicum EN LOS INOCULANTES UTILIZADOS EN ENSAYOS DE CAMPO.

Cepa	Ensayo:	EC-1 $\times 10^{12}$ cel/g	EC-2 $\times 10^{12}$ cel/g	EC-3 $\times 10^{10}$ cel/g
FQ 4		5.3		
FQ 7		20.0		
FQ 8		3.6	3.6	
FQ 9		10.0	10.0	
FQ 16				18.0
FQ 17		6.0	6.0	4.8
FQ 18		18.0	18.0	

### 5.3 COMPROBACIÓN DE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD EN LA FIJACIÓN DE NITROGENO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO Y DETERMINACIÓN DE SU HABILIDAD COMPETITIVA.

Los resultados obtenidos en los experimentos en los que se usó tezontle como soporte (EI-1 y EI-2) indican que todas las cepas en estudio se comportaron como infectivas y fijadoras de nitrógeno con las tres variedades de soya probadas (tablas 15 a 18).

#### 5.3.1 Infectividad.

Los pesos de masa nodular obtenidos en el experimento EI-1 indican que todas las cepas se mostraron muy infectivas con la variedad Júpiter y la variedad UFV-1 (tablas 15 y 16). En tanto que en el experimento EI-2 en el que se incluyeron cinco cepas adicionales (FQ3, FQ34, FQ45, FQ46 y FQ47) y la variedad Santa Rosa, las que no habían sido evaluadas previamente, se observa que todas las cepas inoculadas individualmente o en mezclas infectaron e indujeron la formación de abundantes nódulos, comportándose como mas infectiva con la variedad Santa Rosa la FQ45 y con la variedad Júpiter la FQ46 (tablas 17 y 18 y apéndice I.2). Considerando los resultados de Chamber (1980) quien concluye que la capacidad infectiva de las cepas, así como la biomasa nodular producida depende de la variedad de soya, se puede afirmar que en este estudio las variedades de soya usadas presentan buena afinidad por las cepas inoculadas. En este sentido Keyser y Cregan (1987) también encontraron que la nodulación es controlada por el genotipo del hospedero, y sus resultados indicaron que el mecanismo responsable de la restricción de la nodulación está relacionado a determinantes antigénicos.

TABLA 15. EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD JÚPITER (EI-1).

Tratamiento cepas FQ:	Peso seco de parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>	Peso seco de nódulos de la planta (g) <sup>1</sup>
T(-)	0.70 f*	0 **
T(+)	1.29 cde	0
4	0.99 ef	207.9
7	1.44 bcd	173.1
9	0.96 ef	320.0
12	1.80 b	287.1
16	1.10 def	240.3
17	1.28 cde	161.9
18	1.59 bc	158.9
4-7-9	1.49 bcd	318.9
4-12-16	1.86 ab	233.7
4-17-18	1.47 bcd	199.6
4-16-18	1.61 bc	184.7
7-12-16	1.80 b	206.3
7-17-18	2.25 a	272.3
9-12-16	1.47 bcd	254.2
9-17-18	1.70 bc	269.2
12-16-171.57 bc264.6		
12-17-18	1.65 bc	190.2

<sup>1</sup> Promedio de cinco repeticiones.

\* Las cantidades que comparten las mismas letras no difieren significativamente entre sí (p= 0.05).

\*\* No existe diferencia significativa (p=0.05).

TABLA 16. EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD UFV-1 (EI-1).

Tratamiento cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>
T(-)	0.33 h *	0 **
T(+)	0.57 gh	0
4	1.15 de	265.3
7	1.90 a	130.0
9	0.78 fg	148.9
12	1.94 a	213.7
16	1.22 cde	323.5
17	1.52 bc	216.0
18	1.93 a	291.3
4-7-9	1.41 bcd	296.4
4-12-16	1.31 bcde	134.1
4-17-18	1.44 bcd	188.9
4-16-18	1.63 ab	289.2
7-12-16	1.22 cde	139.3
7-17-18	1.64 ab	166.5
9-12-16	0.98 ef	91.1
9-17-18	1.33 bcd	206.5
12-16-17	1.48 bcd	259.3
12-17-18	1.55 bc	282.5

<sup>1</sup> Promedio de tres repeticiones.

\* Las cantidades que comparten las mismas letras no difieren significativamente entre sí (p=0.05).

\*\* No existe diferencia significativa (p=0.05).

TABLA 17. EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD SANTA ROSA (EI-2).

Tratamientos cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea/2 plantas (g) <sup>1</sup>	Peso seco de nódulos/2 plantas (mg) <sup>1</sup>
T(-)	1.06 j *	0*
T(+)	1.63 ij	0
4	3.26 abcd	315.36 ab
7	3.34 ab	283.30 ab
9	1.76 hij	142.12 def
12	2.52 bcdefgh	206.66 bcdef
16	2.05 ghi	218.41 abcdef
17	2.50 cdefgh	246.70 abcd
18	2.45 defgh	195.72 bcdef
34	3.22 abcde	153.90 cdef
45	2.69 abcdefg	343.20 a
46	2.75 abcdefg	306.76 ab
47	3.32 abc	288.68 ab
4-7-9	3.35 a	318.64 ab
4-12-16	3.09 abcdef	272.32 abc
4-17-18	3.02 abcdef	277.44 abc
4-16-18	2.69 abcdefg	290.18 ab
7-12-16	2.41 efgh	133.50 ef
7-17-18	2.95 abcdef	202.82 bcdef
9-12-16	1.62 ij	129.80 f
9-17-18	2.81 abcdefg	232.60 abcde
12-16-17	2.31 fghi	133.22 f
12-17-18	2.26 fghi	238.02 abcde

1 Promedio de cinco repeticiones.

\* Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí (p=0.05).-

TABLA 18. EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD JÚPITER (EI-2).

Tratamientos cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea/2 plantas (g) <sup>1</sup>	Peso seco de los nódulos/2 plantas (mg) <sup>1</sup>
T(-)	1.66 f*	0*
T(+)	4.00 bcde	0
3	3.65 cde	70.48 d
4	3.77 cde	171.77 ab
7	5.46 ab	118.32 bcd
9	5.03 abc	135.60 bc
12	4.31 abcde	99.80 cd
16	3.46 de	144.24 bc
17	4.21 abcde	104.14 cd
18	5.53 a	111.34 cd
34	4.37 abcde	82.90 cd
45	3.14 e	112.79 cd
46	3.83 cde	204.22 a
47	4.42 abcde	101.20 cd
4-7-9	4.53 abcde	129.28 bcd
4-12-16	3.68 cde	119.88 bcd
4-17-18	4.12 abcde	108.30 cd
4-16-18	3.91 cde	100.54 cd
7-12-16	4.32 abcde	97.20 cd
7-17-18	3.74 cde	84.08 cd
9-12-16	4.11 abcde	95.13 cd
9-17-18	3.91 cde	94.20 cd
12-16-17	4.87 abcd	72.60 d
12-17-18	3.81 cde	92.04 cd

<sup>1</sup> Promedio de cinco repeticiones.

\* Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí (p=0.05).

### 5.3.2 Efectividad en la fijación de nitrógeno.

Al comparar los resultados de peso seco de la parte aérea, se observa que todas las cepas dieron lugar a pesos significativamente diferentes ( $p=0.05$ ) al testigo negativo, lo que permitió confirmar que todas las cepas probadas fijaron nitrógeno, observándose en algunos casos diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo fertilizado, lo que indica un mejor comportamiento de ciertas cepas. De este modo con la variedad Júpiter (experimentos EI-1 y EI-2) todas las cepas inoculadas individualmente o en mezclas dieron lugar a pesos secos de la parte aérea de la planta significativamente diferentes al testigo negativo (apéndice I.1 y I.2). En los tratamientos inoculados con cepas individuales los incrementos en peso seco fluctuaron de 39% a 157% con las cepas FQ9 y FQ12 en el experimento EI-1 (tabla 15) y de 89% a 233% con las cepas FQ45 y FQ18 en el experimento EI-2 (tabla 18), considerándose como las más efectivas para esta variedad a las cepas FQ12, FQ18, FQ7 y FQ17.

Con la variedad UFV-1 también se observa un incremento significativo del peso seco de la parte aérea debido a la inoculación con las diferentes cepas (apéndice I.1). Tales incrementos corresponden a 136% para la cepa FQ9 que expresa el menor incremento con respecto al testigo negativo, y el mayor corresponde a la cepa FQ 12 con 487% (tabla 16). Para esta variedad las mejores cepas resultaron ser las mismas que para la variedad Júpiter.

Las cepas individuales inoculadas sobre la variedad Santa Rosa indujeron incrementos de peso seco de la parte aérea que variaron de 66% a 215% con las cepas FQ9 y FQ7 respectivamente. Las cepas que expresaron mayor efectividad con esta variedad fueron FQ7, FQ4, FQ34 y FQ47 (tabla 17).

Como puede observarse, las cepas que siempre fueron efectivas en la fijación de nitrógeno en las tres variedades de soya son FQ7, FQ12, FQ17 y FQ18 ya que presentaron la mayor efectividad con las variedades Júpiter y UFV-1. Con la variedad Santa Rosa, aún cuando únicamente la cepa FQ7 conservó tal superioridad, las otras tres cepas presentan buena actividad fijadora de nitrógeno. Por lo anterior podemos considerar que en las tres variedades de soya usadas, las mejores cepas son las cuatro mencionadas.

La cepa FQ9 se comportó como una de las mejores únicamente en uno de los experimentos, en tanto que en los otros se comportó como la de menor efectividad con las tres variedades empleadas, por lo que

es recomendable realizar mas estudios con esta cepa para determinar con claridad su efectividad.

Así mismo se observó que las cepas FQ34, FQ45, FQ46 y FQ47, que no habían sido evaluadas resultaron ser efectivas en las dos variedades en que fueron probadas. La cepa FQ3 también resultó efectiva con la variedad Santa Rosa, única variedad con la que fue ensayada.

### 5.3.3 Eficiencia de la asociación.

Al tratar de correlacionar los pesos secos de masa nodular y de parte aérea, se observó que no hay relación entre ellos. Ejemplo de esto se observa en la tabla 18, donde la cepa FQ46 tiene el mayor peso seco de nódulos, sin embargo, el peso seco de la parte aérea corresponde a uno de los mas bajos. Lo contrario se observa en la cepa FQ 18, donde no obstante que su masa nodular se incluye en el grupo de los mas bajos, le corresponde el mayor peso seco de la parte aérea. La misma situación puede observarse en la tabla 15 con las cepas FQ9 y FQ18, en la tabla 16 con las cepas FQ7 y FQ16 y en la tabla 17 con las cepas FQ7 y FQ45. Estos resultados tambien fueron obtenidos por Vidor et al. (1979), quienes concluyeron que no debe utilizarse a la nodulación como único parámetro para la selección de cepas.

Considerando lo anterior y los reportes de Danso (1987), Kremer y Peterson (1982), Vilela et al. (1978) que indican la falta de correlación entre peso seco de nódulos y peso seco de parte aérea se procedió a calcular la eficiencia de la simbiosis de acuerdo a Materon y Vincent (1980).

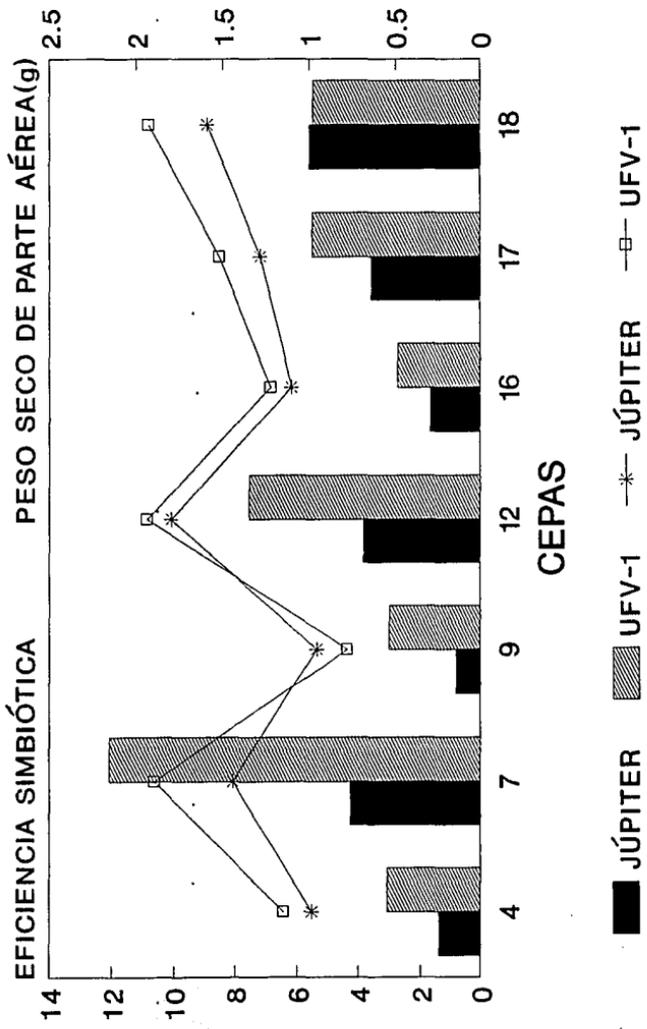
Los resultados indican que este parámetro se correlaciona muy bien con el peso seco de la parte aérea ( $r=0.84$ ), como puede verse en las gráficas 1 y 2.

Los resultados anteriores permitieron confirmar que las cepas FQ4, FQ7, FQ9, FQ12, FQ16, FQ17 y FQ18, seleccionadas en trabajos previos (Tsuzuki et al., 1981; Cota et al., 1985; Muñoa et al., 1989) conservan su infectividad y efectividad en la fijación de nitrógeno, características que se manifestaron al ser inoculadas en forma individual o en mezclas. Lo anterior indica además que el método de conservación al que han sido sometidas es adecuado, y así mismo se confirmó su interespecificidad, demostrándose que todas las cepas establecen asociaciones mas o menos eficientes con las tres variedades de soya en estudio (Ramírez Gama et al., 1992), resultados que coinciden con los reportes de Peres y Vidor (1980) quien indica que la cepa 587 (FQ16) establece asociación eficiente con las variedades Santa Rosa, UFV-1 e IAC-2.

Por otra parte, se determinó la efectividad e interespecificidad de cepas que no habían sido estudiadas (FQ34, FQ45, FQ46 y FQ47) lo que permitió incluirlas en el grupo de cepas seleccionadas, así

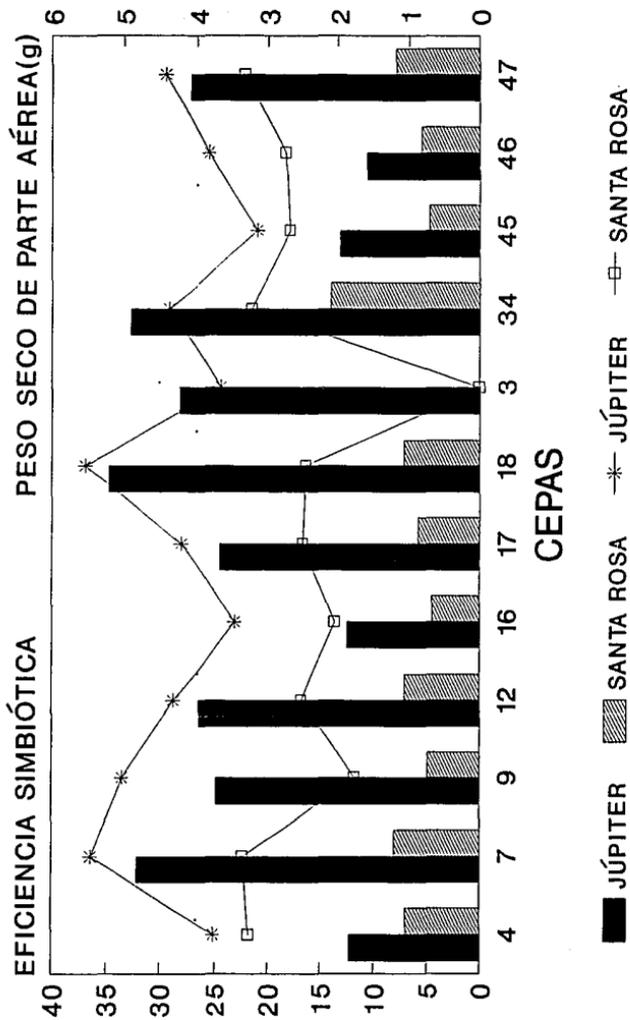
# RELACIÓN EFICIENCIA-RENDIMIENTO

## Gráfica 1 (EI-1)



# RELACIÓN EFICIENCIA-RENDIMIENTO

## Gráfica 2 (EI-2)



como también se determinó que la cepa FQ3 es efectiva con la variedad de soya Santa Rosa y es recomendable determinar su eficiencia con las otras variedades.

Considerando que la efectividad en la fijación de nitrógeno en las diferentes cepas de Bradyrhizobium varían en función de la variedad del hospedero, el uso de inoculantes multicepa tiene como objetivo principal, su aplicación a un amplio intervalo de hospederos. Sin embargo este tipo de inoculantes puede dar lugar a problemas, especialmente cuando una de las cepas del inoculante es altamente competitiva por los sitios de infección y establece asociación con un hospedero en particular con el cual no expresa una buena fijación de nitrógeno, lo que determina el desplazamiento de las otras cepas mas efectivas. Tal situación también suele presentarse cuando una de las cepas llega a dominar en el inoculante multicepa (Date, 1969). No obstante, este tipo de inoculantes continúa utilizándose. Los resultados de este trabajo corroboran que en la producción de inoculantes multicepa es necesario considerar la utilización de cepas que sean altamente eficientes y competitivas, lo que aparentemente se traduce en un efecto sinérgico benéfico, lo que coincide con los reportes de Bromfield, 1984 y Peterson, 1983 (citados por Furhmann y Wollum, 1989) sobre estudios efectuados en la asociación Rhizobium meliloti - alfalfa. Somasegaran y Bohlool (1990) también señalan que en la formulación de inoculantes multicepa es importante considerar la inclusión de cepas seleccionadas que posean ambas características (eficiencia y competitividad).

#### 5.3.4 DETERMINACIÓN DE LA HABILIDAD COMPETITIVA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO.

En la tabla 19 se presentan los resultados de las pruebas de aglutinación efectuadas a los nódulos procedentes de las raíces de plantas inoculadas con inoculantes multicepa y desarrolladas en macetas con tezontle.

Es pertinente aclarar que de los diez inoculantes multicepa empleados, seis estuvieron constituidos por cepas heterólogas (mezclas 4-7-9, 4-17-18, 7-17-18, 9-12-16, 12-16-17 y 12-17-18), en tanto que en los otros cuatro inoculantes (mezclas 4-12-16, 4-16-18, 7-12-16 y 9-17-18) se incluyeron una cepa heteróloga y dos homólogas que corresponden a FQ4-FQ16, FQ7-FQ12 y FQ9-FQ18 las que no pueden diferenciarse serológicamente por presentar reacción cruzada. Por lo que en las siguientes páginas, estas cepas homólogas se presentarán siempre por pares usando la notación FQ4-FQ16, FQ7-FQ12, etc. y se interpretará que los nódulos son formados de manera conjunta por las integrantes de cada par.

TABLA 19. COMPETITIVIDAD DE CEPAS DE *Bradyrhizobium japonicum* POR LOS SITIOS DE INFECCIÓN RADICAL EN SOYA VAR. JÚPITER BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO (EI-1).

Número de nódulos<sup>1</sup> formados por las cepas introducidas en el inoculante multicepa:

<b>4-7-9<sup>A</sup></b>	<b>4-12-16<sup>B</sup></b>	<b>4-16-18<sup>B</sup></b>	<b>4-17-18<sup>B</sup></b>	
1.7 (4)	2.0 (4-16) <sup>a</sup>	0.3 (4-16) <sup>a</sup>	0.3 (4)	
7.7 (7)	13.0(12)	14.7 (18)	8.0 (17)	
5.3 (9)			4.3 (18)	
* 4=7=9	12>(4-16)	18>(4-16)	17>18>4	-
<b>7-12-16<sup>B</sup></b>	<b>7-17-18<sup>B</sup></b>	<b>9-12-16<sup>A</sup></b>	<b>9-17-18<sup>A</sup></b>	
15(7-12) <sup>a</sup>	1.7(7)	9.7(9)	8.7(17)	
0(16)	7.3(17)	4.3(12)	4.7(9-18) <sup>a</sup>	
	2.3(18)	1.0(16)		
* (7-12)>16	17>18=7	9>12>16	17=(9-18)	
<b>12-16-17</b>	<b>12-17-18</b>			
1.7(12)	0.3(12)			
0 (16)	5.3(17)			
13.3(17)	7.3(18)			
* 17>12>16	17=18>12			

1 Promedio de 3 repeticiones.

() Cepas que ocupan los nódulos.

a Serológicamente no distinguible.

\* Nivel de competitividad de acuerdo a la prueba de Scheffé.

A Distribución de los nódulos en las partes media y superior del sistema radical.

B Distribución de los nódulos en todo el sistema radical.

Los resultados expuestos en la tabla 19 y el análisis estadístico aplicado (apéndice II.1) indican que en la mezcla 4-7-9 no existe diferencia significativa en el número de nódulos formados por cada una de las cepas participantes, en tanto que en las mezclas restantes sí existe esta diferencia, por lo que se aplicó la prueba de Scheffé (apéndice II.2) y los resultados indican que la cepa FQ4 no es competitiva, ya que en todas las mezclas en que fue incluida resultó desplazada, como lo demuestran los números bajos de nódulos en los que se detectó (tabla 19). Esto es particularmente importante en las mezclas 4-12-16 y 4-16-18 debido a que, aún cuando las cepas FQ4 y FQ16 son indistinguibles, el número de nódulos infectados por éstas es inferior al ocupado por las cepas FQ12 y FQ18, lo que indica la alta competitividad de estas últimas.

La cepa FQ7 compite bien con la FQ9 (tabla 19), observándose que no hay diferencia significativa en el número de nódulos formados por cada una. Así mismo se observa que la cepa FQ7 compite bien con la FQ18 y es menos competitiva que la cepa FQ17. Respecto a su comportamiento frente a la cepa FQ16 aún cuando ésta fue desplazada totalmente (mezcla 7-12-16), no es posible atribuir la competitividad exclusivamente a la cepa FQ7 ya que ésta es indistinguible de la FQ12 que fue la tercera cepa del inoculante.

La cepa FQ9 mostró menor capacidad competitiva que la cepa FQ17 (sin alcanzar significación estadística) ya que el número de nódulos formados por las cepas FQ9 y FQ18 juntas no supera el número de nódulos formados por la cepa FQ17 (tabla 19). Resultados similares fueron reportados por Somasegaran y Bohlool (1990), los que al inocular la mezcla de cepas TAL 102 (FQ17), TAL 379 (FQ9) y TAL 377, observaron que la primera formó mayor porcentaje de nódulos.

Analizando el comportamiento de la cepa FQ12, se tiene que ésta desplaza a la FQ4 (tabla 19) y es menos competitiva que las cepas FQ9, FQ17 y FQ18. La cepa FQ16 al igual que su homóloga FQ4 no es competitiva, como lo demuestran los resultados de la mezcla 9-12-16, en donde únicamente se registró en un número pequeño de nódulos. En tanto que en las otras mezclas fue totalmente desplazada por las otras cepas en estudio, resultados que son más evidentes en las mezclas 9-12-16 y 12-16-17 en las que se emplearon cepas heterólogas. La cepa FQ17, por el contrario se mostró altamente competitiva dando lugar al mayor número de nódulos infectados por esta cepa en todos los inoculantes en que fue incluida. La cepa FQ18 es más competitiva que la FQ4 y FQ12 (mezclas 4-17-18, 4-16-18 y 12-17-18); menos competitiva que la cepa FQ17 (mezclas 4-17-18, 7-17-18, 9-17-18 y 12-17-18) y presenta una competitividad similar con la FQ7 (mezcla 7-17-18).

La mayoría de las cepas formó los nódulos en las secciones media y superior del sistema radical y en la mayoría de las mezclas en las que están presentes las cepas FQ12, FQ17 y FQ18 se originaron nódulos en todo el sistema radical. Estos resultados, de acuerdo con los reportes de McDermott y Graham, 1989; y Wadisirisuk et al., 1989 (citados por McDermott y Graham, 1990) indican que las cepas tienen la capacidad de desplazarse en el suelo junto con el desarrollo del sistema radical, lo que asegura la presencia de nódulos activos por mas tiempo, lo que podría traducirse en un período de fijación de nitrógeno mas prolongado y por lo tanto en un mayor rendimiento de la planta.

En resumen, de acuerdo a las hipótesis planteadas y el análisis estadístico aplicado, la capacidad competitiva de las cepas probadas puede expresarse de la manera siguiente:

FQ17 > (FQ9-FQ18) > (FQ7-FQ12) > (FQ4-FQ16)

Al relacionar los resultados anteriores respecto al predominio de las cepas en los nódulos, con mezclas específicas, y los de la eficiencia simbiótica, se observa que al inocular la mezcla 4-7-9, el mayor número de nódulos fue formado por la cepa FQ7 (tabla 19), que es la mas eficiente de las tres (gráfica 1), como lo demuestra el rendimiento de masa seca obtenido al ser inoculada en forma individual, resultado que es similar al obtenido con la inoculación de la mezcla, lo que hace suponer que en este caso la fijación de nitrógeno es efectuada casi exclusivamente por la cepa FQ7 (tabla 15). Resultados similares fueron reportados por Somasegaran y Bohlool (1990) y por Martensson et al. (1989), quienes determinaron que la materia seca obtenida con una mezcla fue similar a la materia seca originada por la cepa predominante de la mezcla, cuando se inoculó individualmente. Relaciones similares se observan con la mayoría de las mezclas estudiadas, mientras que, cuando en una mezcla dos de las cepas, una mas eficiente que la otra (FQ 18 y FQ 17), forman la mayor parte de los nódulos en proporciones equivalentes, el rendimiento corresponde aproximadamente al promedio que origina cada una por separado; tal es el caso en la mezcla 4-17-18 (tablas 15 y 19). En el tratamiento 7-17-18, donde se reunen tres de las cepas mas eficientes, el rendimiento es superior al que origina cada una por separado (tabla 15), lo que hace pensar en un posible sinergismo de las tres cepas empleadas; aspecto que de acuerdo con Bradyrhizobium Wollum (1989) no se ha reportado en la asociación Bradyrhizobium japonicum-soya.

5.4 EXPRESIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y HABILIDAD COMPETITIVA DE LAS CEPAS AL INTERACTUAR CON SUELO (EI-3).

TABLA 20. EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD JÚPITER EN SUELO DE MANTE, TAMAULIPAS (EI-3).

Tratamiento Cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>
T(-)	2.52 abcd *	153
4	2.32 abcd	165
7	2.62 abcd	135
9	2.77 abc	177
12	2.25 bcd	211
16	1.92 cd	105
17	2.92 abc	105
18	2.47 abcd	105
4-7-9	1.70 d	84
4-12-16	2.35 abcd	158
4-17-18	2.90 abc	84
4-16-18	3.00 abc	169
7-12-16	3.12 ab	144
7-17-18	2.47 abcd	131
9-12-16	2.25 bcd	130
9-17-18	3.35 a	154
12-16-17	3.32 ab	172
12-17-18	2.70 abcd	128

<sup>1</sup>= Promedio de cuatro repeticiones.

\*= Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí (p=0.05).

Fuente de datos: Instituto de Investigaciones Alimentarias, UAT.

TABLA 21 EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD JÚPITER EN SUELO DE GONZÁLEZ, TAMAULIPAS (EI-3).

Tratamiento Cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>
T(-)	2.64 cd *	17 **
4	3.47 abcd	70
7	4.16 a	39
9	2.86 bcd	10
12	2.62 cd	5
16	2.69 cd	13
17	2.89 bcd	8
18	2.33 d	9
4-7-9	1.89 e	20
4-12-16	3.92 ab	48
4-17-18	3.41 abcd	29
4-16-18	3.40 abcd	37
7-12-16	2.74 bcd	53
7-17-18	2.32 d	24
9-12-16	3.00 abcd	53
9-17-18	3.30 abcd	38
12-16-17	3.62 abc	70
12-17-18	2.55 cd	26

<sup>1</sup>= Promedio de cuatro repeticiones.

\*= Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí (p=0.05).

Fuente de datos: Instituto de Investigaciones Alimentarias, UAT.

TABLA 22 EFECTO DE INOCULANTES UNICEPA Y MULTICEPA DE Bradyrhizobium japonicum EN SOYA VARIEDAD JÚPITER EN SUELO DE LLERA, TAMAULIPAS (EI-3).

Tratamiento Cepa FQ:	Peso seco de la parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>
T(-)	2.72	13.5
4	2.77	39.3
7	3.07	16.0
9	2.32	35.1
12	3.32	2.7
16	2.12	15.2
17	2.42	33.5
18	2.75	51.5
4-7-9	2.22	27.5
4-12-16	2.85	10.5
4-17-18	2.75	23.9
4-16-18	2.72	40.5
7-12-16	2.02	39.4
7-17-18	1.57	32.5
9-12-16	1.87	63.7
9-17-18	3.35	46.2
12-16-17	2.70	38.5
12-17-18	2.30	22.2

<sup>1</sup>= Promedio de cuatro repeticiones.

\*= No existe diferencia significativa ( $p=0.05$ ).

Fuente de datos: Instituto de Investigaciones Alimentarias, UAT.

La presencia de nódulos en los testigos negativos (tablas 20, 21 y 22) indica que fueron formados por las cepas residentes de los tres suelos, ya que estos tratamientos no fueron inoculados con las cepas en estudio. El peso de la masa nodular resultó similar en los testigos y en los tratamientos inoculados. Al comparar los resultados obtenidos del peso seco de la parte aérea, en este experimento se observa que la efectividad en la fijación de nitrógeno fue modificada por la presencia del suelo, lo cual puede deberse al efecto que ejercen los factores bióticos y abióticos del suelo, como lo indica Freire (1977) citado por Peres y Vidor (1980). Por otra parte, al realizar la identificación serológica de las cepas en los nódulos, se detectaron fallas en la metodología, ya que se estableció en los tratamientos testigo la presencia de algunas de las cepas introducidas en los tratamientos inoculados, lo que impidió en estos casos atribuir el rendimiento de la masa seca a una cepa o mezcla en particular. Así mismo, en el tratamiento inoculado con la cepa FQ 12, se obtuvieron nódulos muy pequeños que dificultaron la obtención de material suficiente para efectuar las reacciones, y en los pocos casos en los que los extractos nodulares fueron suficientes, se presentaron reacciones de autoaglutinación; esto se presentó únicamente en los tratamientos que contenían a la cepa FQ12 en forma individual, lo cual indica un mal manejo de este inoculante en particular.

Considerando los resultados de las pruebas serológicas, no se estableció la eficiencia simbiótica de las cepas en los diferentes suelos debido a que la contaminación de los testigos negativos, imposibilitó el cálculo del incremento de rendimiento con respecto a un testigo no nodulado o al rendimiento originado por las cepas de Bradyrhizobium residentes de los suelos, por lo que a continuación se discuten únicamente los resultados de la habilidad competitiva de las cepas.

#### 5.4.1 Habilidad competitiva de las cepas en muestras de suelo de los municipios de Mante, González, y Llera, Tamaulipas.

En la tabla 23 se presentan los resultados de nodulación por las cepas inoculadas en forma individual en las tres muestras de suelo y se observa que todas las cepas en estudio compiten exitosamente con la población residente, destacándose las cepas FQ16, FQ17 y FQ18, que al ser inoculadas en forma individual en la muestra de suelo del municipio de Mante desplazan totalmente a dicha población, formando el 100% de los nódulos.

En la muestra de suelo del municipio de González, las cepas FQ4 y FQ9 son las que presentan mayor competencia hacia la población de Bradyrhizobium residente, formó el 91.1% y 97.8% respectivamente. La de menor capacidad competitiva fue la cepa FQ18, que formó menos del 50% de los nódulos. En este último tratamiento se detectó además contaminación con la cepa FQ4 o FQ16.

Los resultados del tratamiento con las cepas FQ17 y FQ16 en este suelo se consideran dudosos, ya que el 66.7% de los nódulos formados por la cepa FQ17 fueron muy pequeños para efectuar las reacciones de aglutinación y únicamente logró detectarse en el 30% de ellos. En el tratamiento con la cepa FQ16, el 24.5% de los nódulos presentaron reacciones de autoaglutinación. Así mismo, en el tratamiento inoculado con la cepa FQ12, se obtuvieron nódulos muy pequeños que dificultaron la obtención de material suficiente para efectuar las reacciones, y en los pocos casos en los que los extractos nodulares fueron suficientes, se presentaron reacciones de autoaglutinación. Este problema se detectó en las tres muestras de suelo y únicamente en los tratamientos que contenían a esta cepa en forma individual, lo cual pudo ser originado por un mal manejo de este inoculante en particular. Por lo anterior no se reportan datos de número de nódulos formados por esta cepa.

En el suelo del municipio de Llera no se detectó una población residente de Bradryrhizobium, ya que no se manifestó en los nódulos formados en el testigo negativo (T-) como se esperaba. En su lugar se detectó a la cepa FQ4 en el 100% de los nódulos muestreados en este tratamiento, lo que indica que hubieron fallas en las técnicas de asepsia usadas al momento de aplicar los tratamientos.

Curiosamente, en el tratamiento inoculado con la cepa FQ4, el 8.6% de los nódulos no fue formado por esta cepa, sino por una cepa que no reacciona con ninguno de los sueros inmunes usados en este estudio. No se encontró explicación a la presencia de esta cepa desconocida, a la que no se detectó en los nódulos de ningún otro tratamiento de este suelo, ni aún en el tratamiento con la cepa FQ16, la cual únicamente formó nódulos en la tercera parte de las plantas inoculadas con esta cepa. Por otra parte, se observó que las cepas restantes nodularon el 100% de las plantas en las que fueron inoculadas

TABLA 23 EXPERIMENTO DE INVERNADERO EN MACETAS CON SUELO DE TRES LOCALIDADES DE TAMAULIPAS (EI-3).

% de nodulación<sup>1</sup> de inoculantes unicepa en suelo de:

Tratamiento	Mante	González	Llera
T(-)	60.0(4 o 16)	55.5(4 o 16)	100(4 o 16)
	11.1(D)	42.2(D)	**
	*	2.2(17) **	
FQ 4	73.3(4)	91.1(4)	91.4(4)
	26.7(D)	8.9(D)	8.6(D)
	*	*	*
FQ 7	88.9(7)	68.9(7)	100(7)
	11.1(D)	31.1(D)	**
	*	**	
FQ 9	93.3(9)	97.8(9)	100(9)
	6.7(D)	2.2(D)	**
	*	*	
FQ 16	100(16)	53.3(16)	33.3(16)
	*	17.8(D)	**
		4.4(17)	
		24.5(autoaglutinación) **	
FQ 17	100(17)	66.7(MP)	100(17)
	*	30.0(17)	**
		3.3(D)	
		**	
FQ 18	100(18)	48.9(18)	100(18)
	*	51.1(4 o 16) **	**

1 Promedio de tres repeticiones.

() Cepas que ocupan los nódulos.

D Cepa desconocida (no reacciona con los sueros inmunes usados).

MP Nódulos muy pequeños.

\* Nódulos localizados en todo el sistema radical.

\*\* Nódulos localizados únicamente en las partes media y superior de la raíz.

TABLA 24. EXPERIMENTO DE INVERNADERO CON INOCULANTES MULTICEPA EN MACETAS CON SUELO DE TRES LOCALIDADES DE TAMAULIPAS (EI-3).

Suelo Número de nódulos<sup>1</sup> formados por las cepas introducidas en las mezclas:

	4-7-9	4-12-16	4-16-18	4-17-18	7-12-16
S <sub>1</sub>	18(4) 7(7) 5(9)	35(4-16) 0(12)	32(4-16) 9(18)	12(4) 13(17) 16(18)	21(7-12) 22(16)
S <sub>2</sub>	1(4) 10(7) 4(9)	38(4-16) 7(12)	41(4-16) 4(18)	37(4) 4(17) 4(18)	11(7-12) 34(16)
S <sub>3</sub>	13(4) 19(7) 13(9)	20(4-16) 6(12)	32(4-16) 13(18)	10(4) 7(17) 11(18)	33(7-12) 9(16)
-----					
	7-17-18	9-12-16	9-17-18	12-16-17	12-17-18
S <sub>1</sub>	14(7) 23(17) 5(18)	5(9) 5(12) 27(16)	20(9-18) 20(17)	0(12) 18(16) 20(17)	0(12) 24(17) 13(18)
S <sub>2</sub>	9(7) 14(17) 12(18)	5(9) 12(12) 15(16)	28(9-18) 17(17)	24(12) 12(16) 8(17)	5(12) 11(17) 16(18)
S <sub>3</sub>	18(7) 9(17) 18(18)	11(9) 16(12) 18(16)	27(9-18) 15(17)	12(12) 26(16) 7(17)	21(12) 0(17) 15(18)

<sup>1</sup> Total de 3 repeticiones.

( ) Cepas que ocupan los nódulos.

S<sub>1</sub> Suelo del municipio de Mante, Tamaulipas.

S<sub>2</sub> Suelo del municipio de González, Tamaulipas.

S<sub>3</sub> Suelo del municipio de Llera, Tamaulipas.

La tabla 24 expone los resultados de competencia entre las cepas inoculadas en mezclas en las tres muestras de suelo. En estos resultados se excluyen los datos de número de nódulos formados por las cepas residentes en los suelos en estudio, debido a que estas cepas fueron desplazadas por las que se introdujeron en las mezclas, ya que se presentaron esporádicamente en alguna unidad experimental de determinado tratamiento y en número insignificante, y por esta razón no se les incluyó en las pruebas estadísticas aplicadas para determinar la competitividad.

En la tabla mencionada puede observarse que el número de nódulos formados por cada una de las cepas de las mezclas es muy variable en los tres suelos, sin embargo la prueba F aplicada indica que entre los tres suelos no existe diferencia significativa en cuanto a su efecto sobre la capacidad competitiva de las cepas de cada mezcla (apéndice II.2), lo cual puede deberse a la similitud de las características fisicoquímicas de los tres suelos y que las cepas residentes no tienen capacidad para competir con las cepas introducidas.

Al analizar el número de nódulos formados por las cepas de cada inoculante multicepa específico, se detecta diferencia significativa únicamente entre las cepas de la mezcla 4-16-18 (tabla 24 y apéndice II.2), y la separación de medias por el método de Scheffé nos indica que cuando se inoculan juntas las cepas FQ4 y FQ16 el número de nódulos formados por ellas es significativamente superior al originado por la cepa FQ18 (apéndice II.2).

Aún cuando la competitividad relativa de las cepas en las restantes mezclas no alcanzan diferencia estadística significativa, en la tabla 24 se observa lo siguiente:

El par de homólogas FQ4-FQ16 tiende a desplazar a la cepa FQ12 y el par de homólogas FQ7-FQ12 no logra desplazar a la cepa FQ16. Esta última cepa sí desplaza a las cepas FQ9 y FQ12 y en promedio forma mayor número de nódulos que las cepas FQ12 y FQ17.

En la muestra de suelo procedente del municipio de Mante, la cepa FQ12 en ausencia de su homóloga FQ7 prácticamente no forma nódulos (mezclas 4-12-16, 9-12-16, 12-16-17 y 12-17-18). Esto puede tener su origen en el problema presentado por el inoculante preparado con la cepa FQ12 en forma individual (como se indica en 5.4), a partir del cual se prepararon los inoculantes multicepa en los que participa.

La cepa FQ7 compite bien con la cepa FQ9 y con la cepa FQ18. lo mismo se presenta entre las cepas FQ17 y FQ18.

En resumen se tiene que:

- En dos de los suelos en estudio existen cepas de Bradyrhizobium como biota normal, esta población es poco competitiva, ya que se detectó en una baja proporción de nódulos respecto a los nódulos formados por las cepas introducidas (tabla 23).

- El comportamiento de las cepas seleccionadas bajo condiciones controladas se vio modificado al interactuar con el suelo, observándose un patrón de nodulación característico en cada uno. En el suelo del municipio de Mante, todas las cepas formaron nódulos en todo el sistema radical de las plantas, en tanto que en la muestra de González únicamente las cepas FQ4 y FQ9 fueron capaces de nodular todo el sistema radical, las cepas restantes nodularon únicamente la sección superior de la raíz. En el suelo de Llera, las cepas infectaron únicamente la sección superior y solo la cepa FQ4 noduló todo el sistemas radical.

- En las mezclas constituidas por cepas heterólogas (4-7-9, 4-17-18, 7-17-18, 9-12-16, 12-16-17 y 12-17-18) no se observa ninguna tendencia de predominancia por alguna cepa en particular sobre las otras que forman parte de la mezcla.

- En la mezcla con un par de cepas homólogas, el par 4-16 desplaza a la cepa FQ12, sin embargo el par de homólogas 7-12 no puede desplazar a la cepa FQ16, lo cual indica que esta última tiene mayor capacidad competitiva, lo cual es demostrado estadísticamente con los resultados de la mezcla 4-16-18 (apéndice II.2).

- El par de cepas homólogas 9-18 no es capaz de desplazar a la cepa FQ17, lo que indica una capacidad competitiva muy similar entre ellas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los ensayos microbiológicamente controlados, se observa que las cepas FQ4 y FQ16 registradas como las de competitividad mas baja, en presencia de suelo compitieron bien con las otras cepas probadas. Lo anterior es particularmente importante con la cepa FQ16, la que aún cuando fija eficientemente el nitrógeno, dentro del grupo de cepas seleccionadas con base en esta característica, esta cepa ha sido catalogada como una de las menos efectivas, como lo confirman los resultados expuestos en las gráficas 1 y 2 y tablas 15 a 18. La variación en la competitividad de las cepas en presencia de suelo, resultó también muy evidente en el caso de la cepa FQ17, que en condiciones controladas resultó la de mayor competitividad, en tanto que, en presencia de suelo su capacidad competitiva fue menor,. Lo anterior indica que las características de competitividad mostrada en los experimentos microbiológicamente controlados, varió cuando se probaron en suelo, lo cual puede deberse a la interacción con las características químicas y físicas del suelo y con los factores biológicos del mismo. Por ello, Moawad et al. (1984) indica que los resultados de experimentos de competitividad en condiciones controladas deben tomarse con precaución.

## 5.5 VALIDACIÓN DE LAS CEPAS BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS DE CAMPO.

## 5.5.1 Ensayo en el municipio de González, Tamaulipas (EC-1).

La nodulación en los testigos negativos indica la presencia de población residente de Bradyrhizobium en el suelo en estudio; observándose que el tratamiento con el inoculante NIT fue el único en donde el 100% de las plantas resultaron noduladas (tabla 25). Así mismo se observa que el nitrógeno mineral influye en la infección disminuyendo el porcentaje de plantas noduladas y el peso seco de nódulos, aspecto que ha sido reportado por Abaidoo et al. (1990).

TABLA 25. EFECTO DE OCHO INOCULANTES SOBRE LA NODULACION EN SOYA VARIEDAD JUPITER EN EL MUNICIPIO DE GONZALEZ, TAMAULIPAS (EC-1).

Tratamiento	Plantas noduladas (%)	Peso seco de los nódulos de la planta (mg)
T(-)	82.5*	32.6*
T(P)	82.5	29.4
T(N+P)	64.5	10.8
FQ 4	90.0	20.2
FQ 7	72.5	20.0
FQ 9	87.5	22.6
FQ 17	92.5	47.9
FQ 18	92.5	17.3
FM	67.0	16.0
FIR	89.5	33.7
NIT	100.0	27.2

1= Promedio de cuatro repeticiones.

\*= No existen diferencias significativas ( $p=0.05$ ).

Respecto a la efectividad, el análisis de varianza efectuado reportó diferencias entre los tratamientos, la comparación múltiple de Duncan señala que los inoculantes FQ17 y FIRA dieron lugar al mayor rendimiento. Que en los tratamientos no inoculados, la adición de urea afectó negativamente el rendimiento, en tanto que con la adición de fósforo el rendimiento fue ligeramente superior al testigo negativo y muy similar al obtenido con la mayoría de los tratamientos inoculados (tabla 26).

TABLA 26. EFECTIVIDAD DE INOCULANTES DE Bradyrhizobium japonicum EN LA VARIEDAD JÚPITER DE SOYA, EN EL MUNICIPIO DE GONZÁLEZ, TAMAULIPAS. (EC-1)

Tratamiento	Peso seco de la parte aérea de la planta (g) <sup>1</sup>
T(-)	2.70 c
T(+N+P)	1.65 d
T(+P)	3.40 abc
FQ4	3.48 abc
FQ7	3.28 abc
FQ9	3.69 ab
FQ17	4.07 a
FQ18	3.45 abc
FM	3.03 bc
NIT	2.85 c
FIR	3.83 ab

<sup>1</sup> = Promedio de cuatro repeticiones.

Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí (p= 0.05).

Fuente de datos: Inst. de Investigaciones Alimentarias, UAT.

Los ensayos serológicos permitieron establecer que la flora nativa estuvo constituida por la cepa FQ17 y otra no identificada, predominando la primera (tabla 27). Es necesario hacer notar que anteriormente se introdujo esta cepa en este sitio durante un experimento que se interrumpió por condiciones climáticas, lo que indica que esta cepa sobrevivió y se adaptó bien a ese suelo.

En este experimento los resultados de rendimiento (tabla 26) y los obtenidos a través de los ensayos serológicos (tabla 27) indican que la cepa contenida en el inoculante FIRA es efectiva en la fijación de nitrógeno y altamente competitiva ya que desplazó a la FQ17 residente. Así mismo se observa que la FQ17 además de ser efectiva en la fijación de nitrógeno, tuvo la capacidad de adaptarse a ese sitio particular, lo que quizá la colocó en ventaja respecto a la capacidad competitiva frente a las otras cepas en estudio.

TABLA 27. EXPERIMENTO DE CAMPO EN EL MUNICIPIO DE GONZÁLEZ, TAMAULIPAS (EC-1).

Tratamiento	% de nodulación <sup>1</sup>
T-	70.0(17), 30.0(D)
N+P	65.0(17), 35.0(D)
P	73.3(17), 22.2(D), 4.5(4)
FQ 4	71.1(17), 20.0(D), 4.4(7), 4.5(4)
FQ 7	68.9(17), 6.6(7), 15.6(D), 8.9(4)
FQ 9	82.2(17), 4.5(9), 8.8(D), 2.2(4), 2.2(7)
FQ 17	46.7(17), 40.0(D), 11.1(18), 2.2(17+18)
FQ 18	73.3(17), 11.1(18), 8.9(D), 2.2(4), 2.2(17+18), 2.2(7+17)
FM	72.2(17), 27.8(D)
NIT	64.5(17), 35.5(D)
FIRA	48.1(D), 47.7(17), 4.2(18)

1= Promedio de 3 repeticiones.

()= Cepas que ocupan los nódulos.

D= Cepa desconocida (no reacciona con los sueros inmunes usados).

#### 5.5.2 Ensayo en el municipio de Mante, Tamaulipas (EC-3).

En este sitio no se detectó población residente de Bradyrhizobium, sin embargo, los testigos estaban nodulados en al menos una repetición, debido a contaminación cruzada con las cepas en estudio (tabla 28), no obstante, la cantidad de nódulos fue muy reducida, lo que se atribuye a células de Bradyrhizobium arrastradas por escorrentías.

En los tratamientos inoculados se observa muy buena nodulación con ambas cepas (FQ16 y FQ17), que el nitrógeno mineral inhibe casi por completo a la nodulación, y que el efecto del fósforo sobre la infectividad no fué significativo (tabla 29).

En este caso no fue posible establecer relación con los resultados de rendimiento debido a que el experimento fue interrumpido por intereses del agricultor cooperante.

TABLA 28. EXPERIMENTO DE CAMPO EN EL MUNICIPIO DE MANTE, TAMAULIPAS. (EC-3)

Tratamiento	% de nódulos originados por cada cepa <sup>1</sup>
T (-)	31.1(16), 2.2(17)
T (+N+P)	0.0
T (+P)	28.9(16), 4.4(17)
FQ 17 (+P)	100.0(17)
FQ 16 (+P)	100.0(16)
FQ 17	93.3(17), 6.3(16)
FQ 16	100.0(16)

<sup>1</sup> = Promedio de tres repeticiones.

( ) = Cepas que ocupan los nódulos.

TABLA 29. EFECTO DE DOS INOCULANTES SOBRE EL PESO SECO DE NÓDULOS DE SOYA VARIEDAD JÚPITER EN EL MUNICIPIO DE MANTE, TAMAULIPAS (EC-3).

Tratamiento	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>
T(-)	21.5 b*
T(N+P)	0.5 b
T(P)	84.5 b
FQ 17+P	322.0 ab
FQ 16+P	510.0 a
FQ 17	301.8 ab
FQ 16	297.2ab

1= Promedio de cinco repeticiones.

\*= Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p=0.05$ ).

Fuente de datos: Instituto de Investigaciones Alimentarias, UAT.

### 5.5.3 Ensayo en el municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato (EC-2).

En este experimento se observa que todos los inoculantes indujeron la formación de nódulos, lo que indica la infectividad de las cepas bajo estas condiciones (tabla 30).

En relación a la efectividad se observa que algunas de las cepas procedentes de la Fac. de Química, UNAM, son superiores a las contenidas en los restantes inoculantes empleados, ya que inoculadas en forma aislada o como mezclas dieron lugar a un mayor porcentaje de nitrógeno en parte aérea, así como un mayor rendimiento de grano (tablas 31 y 32).

TABLA 30. EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL PESO SECO DE NÓDULOS EN DOS VARIEDADES DE SOYA, MUNICIPIO DE APASEO EL ALTO, GUANAJUATO (EC-2).

Tratamiento	Peso seco de los nódulos de la planta (mg) <sup>1</sup>	
	Var. BM-2	Var. Cajeme
T(-)	0.00 c	0.00 c
T(N+P)	0.00 c	0.00 c
FQ 8	144.28 b	147.67 b
FQ 9	121.04 b	205.70 ab
FQ 17	160.87 ab	154.54 ab
FQ 18	130.52 b	127.68 b
MEZCLA	(A) 142.13 ab	(B) 154.45 ab
FM	152.08 ab	240.11 a
NIT	0.18 c	5.74 c
FIR	9.01 c	20.02 c

<sup>1</sup> Promedio de tres repeticiones.

Los datos que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p=0.01$ ).

A Mezcla de las cepas 8+9+18

B Mezcla de las cepas 9+17+18

Fuente de datos: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.

TABLA 31. EFECTO DE LA INOCULACIÓN SOBRE EL PORCENTAJE DE NITRÓGENO EN LA PARTE AEREA DE LA PLANTA EN DOS VARIEDADES DE SOYA. MUNICIPIO DE APASEO EL ALTO, GUANAJUATO (EC-2)

Tratamiento	Nitrógeno (%) de la parte aérea de la planta <sup>1</sup>	
	BM-2	Cajeme
T(-)	1.80 d	1.15 d
T(N+P)	1.30 d	1.37 cd
FQ 8	1.95 ab	2.40 a
FQ 9	1.80 bc	2.00 ab
FQ 17	2.02 ab	2.12 ab
FQ 18	1.97 ab	2.15 ab
MEZCLA	(A) 2.24 ab	(B) 2.05 ab
FM	1.89 b	1.90 b
NIT	1.06 d	0.94 d
FIR	1.11 d	1.34 cd

<sup>1</sup> = promedio de tres repeticiones.

Los datos que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p=0.01$ ).

A Mezcla de las cepas 8+9+18

B Mezcla de las cepas 9+17+18

Fuente de datos: Inst. Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.

TABLA 32 EFECTO DE INOCULANTES SOBRE EL RENDIMIENTO EN GRANO EN DOS VARIEDADES DE SOYA, MUNICIPIO DE APASEO EL ALTO, GUANAJUATO.

Tratamientos	Var. BM-2 Kg/ha de grano <sup>1</sup>	Var. CAJEME
T(-)	431.17 c	435.75 c
T(+N+P)	606.48 bc	727.86 abc
FQ 8	639.32 bc	1121.53 ab
FQ 9	960.62 abc	766.07 abc
FQ 17	992.96 ab	848.00 abc
FQ 18	687.40 bc	1367.59 a
MEZCLA	(A) 814.34 abc	(B) 754.21 abc
FM	980.39 abc	806.70 abc
NIT	468.25 c	496.34 bc
FIR	400.33 c	623.76 abc

\* Promedio de tres repeticiones.

Las cantidades que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí ( $p= 0.05$ ).

A Mezcla de las cepas 8+9+18

B Mezcla de las cepas 9+17+18

Fuente de datos: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 33. EXPERIMENTO DE CAMPO EN EL MUNICIPIO DE APASEO EL ALTO, GUANAJUATO (EC-2).

% de nódulos<sup>1</sup> ocupados por las cepas introducidas como inoculantes unicepa y multicepa en dos variedades de soya.

T	Var. BM2	Var. Cajeme
T(-)	0	0
T(+N+P)	0	0
8	100(8*)	100(8*)
9	55.5(8*), 24.4(9*), 20.1(D)	100(9*)
17	100(8*)	100(8*)
18	95.5(9*), 4.5(D)	51.1(9*), 44.4(8*), 1.5(D)
MEZCLA	A: 78.3(8*), 12.6(9*) 9.1(D)	B: 95.5(8*), 4.5(9*)
FM	0	15.6(8*), 84.4(D)
NIT	33.3(D)	100(D)
FIR	66.7(D)	100(D)

<sup>1</sup>= Promedio de 3 repeticiones.

()= Cepas que ocupan los nódulos.

8\*= Serológicamente no distinguible de la cepa 17.

9\*= Serológicamente no distinguible de la cepa 18.

A= Mezcla de las cepas 8+9+18. B= Cepas 9+17+18.

D= Cepa desconocida (no reacciona con los sueros inmunes usados).

T= Tratamientos.

FM, NIT, FIR (inoculantes comerciales).

Por otra parte, al analizar el porcentaje de nódulos formados por cada cepa (tabla 33), se detectaron contaminaciones, observándose en la variedad BM-2, en el tratamiento FQ9 a las cepas FQ8 (o FQ 17) y en los tratamientos FQ9, FQ18 y A a una cepa no identificada (D).

En este suelo no existe bradyrhizobia residente, ya que no se detectó nodulación en los testigos, por lo que se supone que la

cepa D corresponde a alguno de los inoculante comerciales, los que no pueden identificarse serológicamente debido a que no se cuenta con los sueros inmunes respectivos. Esta cepa es poco competitiva, ya que forma un bajo porcentaje de nódulos. Lo contrario ocurre con la cepa FQ 8 (o FQ 17), la cual al ser inoculada individualmente nodula al 100% de las plantas; incluso al actuar como contaminante forma un alto porcentaje de nódulos desplazando al inoculante aplicado. Esta habilidad competitiva se confirma al ser inoculada junto con las cepas FQ 9 y FQ 18 en donde expresa su alta capacidad competitiva, resultados que se observaron en las dos variedades en estudio.

El éxito de la cepa FQ17 (FQ8) en las distintas localidades indica su superioridad (respecto a las cepas restantes utilizadas) en las características de efectividad y competitividad en diferentes ambientes, resultados que confirman lo obtenido por George et al. (1987) citado por Somasegaran y Bohlool, (1990) con la cepa TAL 102 (FQ17), la cual demostró competitividad superior en cinco variedades de soya, en diferentes tipos de suelo y en diferentes temperaturas.

Aun cuando Peres y Vidor (1980) indican que los estudios de competencia realizados sobre muestras de suelo en condiciones de invernadero, proporcionan resultados similares a los obtenidos en campo, en este estudio los resultados de pruebas de invernadero y campo fueron diferentes, como lo reportan también Kosslak et al. (1983). Lo anterior manifiesta la importancia de realizar pruebas de campo, bajo condiciones específicas de la región de interés, antes de recomendar a las cepas para la producción de inoculantes, como lo indican Vidor et al. (1979), quienes citan como característica principal de una cepa seleccionada, su eficiencia comprobada en experimentos de campo.

## 6. CONCLUSIONES

### 6.1 Ensayos en invernadero.

#### 6.1.1 Sistemas hidropónicos.

- Se confirmaron las características de infectividad y efectividad de las cepas FQ4, FQ7, FQ9, FQ12, FQ16, FQ17 y FQ18 en las variedades de soya Júpiter, UFV-1 y Santa Rosa; de las cepas FQ34, FQ45, FQ46 y FQ47 en las variedades Júpiter y Santa Rosa, y de la cepa FQ3 en la variedad Júpiter.

- La habilidad competitiva de las cepas presentó el siguiente esquema: FQ17 > (FQ18-FQ9) > (FQ12-FQ7) > (FQ4-FQ16).

- Se comprobó la utilidad del uso de inoculantes multicepa, siempre y cuando estos incluyan cepas de alta eficiencia, las que en tales condiciones parecen tener un efecto sinérgico, originando incrementos en el rendimiento vegetal superior al obtenido mediante la inoculación individual de las cepas.

#### 6.1.2 Sistema de macetas con muestras de suelo:

- La capacidad competitiva de las cepas fue modificada por la influencia de los factores del suelo únicamente en el patrón de nodulación, ya que en cada suelo la distribución de los nódulos en el sistema radical fue variable.

- Las cepas probadas fueron altamente competitivas frente a la población residente de Bradyrhizobium.

- La competitividad relativa de las cepas en presencia de suelo cambió con respecto a la competitividad expresada en condiciones controladas, destacando como mas competitivas en los tres suelos el par de homólogas FQ4-FQ16.

### 6.2 En los experimentos de campo, tambien se expresó la respuesta particular de cada cepa al interactuar con el ambiente:

- En el Municipio de González, la cepa FQ17 que había sido utilizada en ciclos de cultivo anteriores demostró adaptación y sobrevivencia en ausencia del cultivo y desplazó a las cepas introducidas como inoculantes. Los mayores rendimientos en materia seca se obtuvieron con esta cepa y con el inoculante FIRA.

- En el municipio de Mante, al no existir una población residente de Bradyrhizobium, las dos cepas introducidas (FQ16 y FQ17) no tuvieron problemas para originar una buena masa nodular.

- En el municipio de Apaseo el Alto, Guanajuato, las cepas experimentales indujeron mayores rendimientos de grano, lo que

indica que el éxito de esta tecnología depende en gran medida del uso de inoculantes de alta calidad, los que deben contener un alto número de células de las cepas de Bradyrhizobium seleccionadas con base en numerosas características, condiciones que reunieron los inoculantes producidos en la Facultad de Química para este experimento.

Aun cuando todas las cepas dieron origen a un incremento significativo de rendimiento sobre el testigo no inoculado, la cepa FQ8 (FQ17) promete ser la de mayor éxito en este sitio, ya que es más competitiva.

De lo anterior se confirma la necesidad de ensayar las cepas en las condiciones específicas de los sitios donde se pretenden introducir antes de hacer la recomendación de las mismas.

### 6.3 Respecto a la metodología:

- Se confirmó que la liofilización es un método adecuado para la conservación de las cepas ya que, mediante él, éstas han conservado su capacidad infectiva, su capacidad de fijar nitrógeno y su baja especificidad de hospedero, aspecto que fue demostrado al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en las pruebas de rutina que se aplican como control de las cepas en el Laboratorio de Microbiología Experimental, y los resultados obtenidos en otros estudios en donde se utilizaron estas mismas cepas.

- se confirmó que el cálculo de la eficiencia simbiótica recomendada por Materon y Vincent (1980), constituye una mejor alternativa para medir la capacidad de la cepa para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con el hospedero, que el considerar el peso seco de la parte aérea y de la masa nodular por separado.

- La técnica de aglutinación en placa utilizada para el reconocimiento de las cepas de los nódulos, no es la más específica ni la más sensible, sin embargo permitió establecer la competitividad de las cepas entre sí, excepto cuando se reunieron en una mezcla los pares de cepas que presentan reacciones cruzadas. Además, la sencillez de la técnica, así como la facilidad de almacenamiento de nódulos secos, permitieron el manejo y procesamiento de un gran número de muestras.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABALDOO, R.C., T. GEORGE, B.B. BOHLOOL Y P.W. SINGLETON. 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. Can. J. Microbiol. 36: 92-96.
- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editores. México.
- AMARGER, N. 1981. Selection of Rhizobium strains on their competitive ability for nodulation. Soil Biol. Biochem. vol. 13: 481-486.
- APP, A. Y A. EAGLESHAM. 1982. Biological nitrogen fixation - problems and potential. pp 1-7 In: Graham, P.H. y Harris, S.C. (Eds.). Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Centro Internacional de Agricultura tropical. Cali, Colombia.
- ARMENTA, B.A.D. 1985. Interacción de Rhizobium japonicum en cultivares de soya (Glycine max L.) en el estado de Sinaloa. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- BALATTI, A.P. 1982. Culturing Rhizobium in large scale fermentors. pp 127 In: P.H. Graham y S.C. Harris (Eds.). Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- BARRIGA, S.C. 1978. Cultivo de la soya en el Sur de Sonora. SARH-INIA. Circular CIANO 98. Sonora, México.
- BARRIGA, S.C. Y NIETO, H. 1983. Logros y Aportaciones de la Investigación Agrícola de la soya. SARH-INIA, México.
- BRADSHAW, L.J. 1976. Microbiología de laboratorio. Ed. El Manual Moderno. México.
- CÁRDENAS Y ESPINOZA R.A. 1991. Hechos en biotecnología. AGT Editor S.A. México.
- CASAS, I.A. 1984. Specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. pp 99-125 In: Alexander, M. (Ed.). Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology and physiology. Plenum Press, Nueva York.

- CASTILLO Y CANO, P. Y M.P. RONZON, R. 1987. Determinación de la capacidad competitiva de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum mediante técnicas serológicas. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química UNAM. México.
- CHAMBER P., M.A. 1980. Especificidad en la simbiosis entre tres variedades de soja (Glycine max L. Merrill) y cuatro razas de Rhizobium japonicum. An. INIA/Ser. Prod. veg./N. 12: 269-277.
- COTA, G.E., F. DE LA GARZA R. Y R.M. RAMIREZ GAMA. 1985. Selección de cepas de Rhizobium japonicum para el estado de Tamaulipas. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- CRISPÍN M., A. Y C. BARRIGA S. 1975. El cultivo de la soya en México. INIA, SAG. Folleto de Divulgación N° 54.
- DANSO, S.K.A. 1987. Nitrogen fixation in soybean as influenced by cultivar and Rhizobium strain. Plant and Soil 99: 163-174.
- DATE, R.A. 1969. A decade of legume inoculant quality control in Australia. J. Aust. Inst. Agric. Sci. pp 27-37.
- DEVINE, T.E. 1984. Genetics and breeding of nitrogen fixation. pp 127-153 In: Alexander, M. (Ed.). Biological nitrogen fixation: ecology, technology and physiology. Plenum Press, Nueva York.
- DEVINE, T.E. Y B.H. BREITHAUPT. 1980. Significance of incompatibility reactions of Rhizobium japonicum strains with soybean host genotypes. Crop Science 20: 269-271.
- DREYFUS, B.L., H.G. DIEM, J. FREIRE, S.O. KEVA Y Y.R. DOMMERMUES. 1987. Nitrogen fixation in tropical agriculture and forestry. pp 7-49. In: Da Silva E.J., Dommergues Y.R., Nyns E.J. y Ratledge C. (Eds.) Microbial Technology in the Developing World. Oxford University Press. Inglaterra.
- EAGLESHAM A.R.J Y A. AVANABA. 1984. Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume fixation. pp. 1-35. In: Subba Rao, N.S. (Ed). Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Edward Arnold. Nueva Delhi.
- ECOTECNIA AGRÍCOLA 1960-1982. 1983. Producción Agrícola Nacional. Subsecretaría de Agricultura y Operaciones/DGEA. México.

- FAHRAEUS, G. Y K. SHALMAN. 1977. The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. Annls. Acad. Reg. Sci. Upsaliensis 20: 103-131.
- FERNANDEZ-FLOURET, D. Y J.C. CLEYET-MAREL. 1987. The influence of the culture medium on the competitive abilities of Bradyrhizobium japonicum strains. Plant and Soil 103: 126-128.
- FERRERA-CERRATO, R. Y D. JALPA B. 1980. Inoculación de la soya (Glycine max (L) Merrill) con diferentes cepas de Rhizobium japonicum en Cuetzalan, Puebla. Biótica 5: 191-197.
- FLORES R., D.; S. PALACIOS M. Y E. VALLEJO G. 1987. Efecto de la fertilización e inoculación de soya var. BM-2 con Rhizobium en el rendimiento y calidad de semilla, en condiciones de campo, riego y temporal, bajo el sistema de tres cosechas al año. Rev. Latinoam. Microbiol. 29: 311-320.
- FREIRE, J.R.J. 1984. Important limiting factors in soil for the Rhizobium-legume symbiosis. pp 51-74. In: Alexander, M. (Ed.) Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology and physiology. Plenum Press. Nueva York.
- FUHRMANN, J. Y A.G. WOLLUM, II. 1989. Symbiotic interactions between soybean and competing strains of Bradyrhizobium japonicum. Plant and Soil 119: 139-145.
- GARCÍA, B.A. Y J. MONCADA F. 1969. Fertilización e inoculación como factores determinantes en el rendimiento de la soya, en la región de Delicias, Chihuahua. Memorias del IV Congreso de la Ciencia del Suelo.
- GARCÍA, S.D.; F. DE LA GARZA R.; M. AGUILAR G. Y R.M. RAMÍREZ-GAMA. 1981. Programa de inoculación en soya en el estado de Tamaulipas. Resúmenes del Seminario: Fijación Biológica del Nitrógeno. CINVESTAV, IPN. México, D.F.
- GIBSON, A.H.; D.H. DEMEZAS; R.R. GAULT; T.V. BHUVANESWARI Y J. BROCKWELL. 1990. Genetic stability in rhizobia in the field. Plant and Soil 129: 37-44.
- GRAHAM, P.H. 1984. Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. pp 75-98. In: Alexander, M. (Ed.) Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology and physiology. Plenum Press, Nueva York.

- HALLIDAY, J. 1984. Principles of Rhizobium strain selection. pp 155-171 In: Alexander, M. (Ed.). Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology and physiology. Plenum Press, Nueva York.
- KAMICKER, B.J. Y W.J. BRILL. 1987. Methods to alter the recovery and nodule location of Bradyrhizobium japonicum inoculant strains on field-grown soybeans. App. Environ. Microbiol. 53(8): 1737-1742.
- KEYSER, H.H. Y P.B. CREGAN. 1987. Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among Bradyrhizobium japonicum serogroup 123 isolates. App. Environ. Microbiol. 53(11): 2631-2635.
- KOSSLAK, R.M. Y B.B. BOHLOOL. 1985. Influence of environmental factors on interstrain competition in Rhizobium japonicum. App. Environ. Microbiol. 49(5): 1128-1133.
- KOSSLAK, R.M.; B.B. BOHLOOL; S. DOWDLE Y M.J. SADOWSKY. 1983. Competition of Rhizobium japonicum strains in early stages of soybean nodulation. App. Environ. Microbiol. 46(4): 870-873.
- KREMER, R.J. Y H.L. PETERSON. 1982. Isolation, selection and evaluation of Rhizobium under controlled conditions. Soil Sci. Plant Anal. 13: 749-774.
- KVIEN, C.S.; G.E. HAM Y J.W. LAMBERT. 1981. Recovery of introduced Rhizobium japonicum strains by soybean genotypes. Agronomy Journal 73: 900-905.
- LÓPEZ A., E. Y R. FERRERA-CERRATO. 1983. Generación de tecnología de producción con el uso de inoculantes en soya (Glycine max L.) como cultivo de introducción en la Mixteca Poblana. Resúmenes de la Segunda Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- MÁRQUEZ-BERBER S.R. Y N.M.S. BANAFUNZI. 1985. Inoculación en programas de mejoramiento nutricional con soya. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- MARTENSSON, A.M.; L. BRUTTI Y H. LJUNGGREN. 1989. Competition between strains of Bradyrhizobium japonicum for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. Plant and Soil 117: 219-225.
- MARTÍNEZ, G.A. 1988. Diseños experimentales, métodos y elementos de teoría. Editorial Trillas. México.

- MATERON, L.A. Y J.M. VINCENT. 1980. Host specificity and interstrain competition with soybean rhizobia. Field Crops Res. 3: 215-224.
- McDERMOTT, T.R. Y P.H. GRAHAM. 1990. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of Bradyrhizobium japonicum. App. Environ. Microbiol. 56(10): 3035-3039.
- McDERMOTT, T.R., P.H. GRAHAM Y M.L. FERREY. 1991. Competitiveness of indigenous populations of Bradyrhizobium japonicum serocluster 123 as determined using a root-tip marking procedure in growth pouches. Plant and Soil 135: 245-250.
- MERCADO, P.J.J. Y S.R. MÁRQUEZ-BERBER. 1985. Inoculación y fertilización con N y P en 3 variedades de soya en el Ejido de Venta de Palula, Gro. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- MIRCEN/UNEP/UNESCO/ICRO/IPAGRO. 1984. Coleções de estirpes de Rhizobium da America Latina. Porto Alegre, R.S. Brasil.
- MOAWAD, H.A., W.R. ELLIS Y E.L. SCHMIDT. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous Rhizobium japonicum for nodulation of field-grown soybeans. App. Environ. Microbiol. 47(4): 607-612.
- MUÑOZA, C.S.; J.M. CENA V.; I. MUÑOZ A. Y R.M. RAMÍREZ GAMA. 1989. Evaluación de seis cepas introducidas de Bradyrhizobium japonicum en soya (Glycine max L.) en Villaflores, Chiapas. Resúmenes del Segundo Congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno. Guadalajara, Jalisco. México.
- NIETO H., J., M. RIVERA DE LABRA Y J.J. SÁNCHEZ. 1983. Agrupación de ambientes en el trópico mexicano de acuerdo al desarrollo fenológico de 10 cultivares de soya. Agric. Téc. Méx. 9(1): 45-63.
- NORMAN, M.J.T. 1982. A role for legumes in tropical agriculture. pp. 9-26 In: Graham P.H. y Harris, S.C. (Eds.) Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

- NORRIS, D.O. Y R.A. DATE. 1976. Legume bacteriology, pp 134-174 In: Shaw, H.N. y Bryan, W.W. (Eds.). Tropical Pasture Research, Principles and Methods. Commonwealth bureau of pastures and field crops, Bulletin 51. Hurley, England.
- NUTMAN, P.S. 1956. The influence of the legume in root nodule symbiosis: a comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 31: 109-151.
- OKEREKE, G.U. Y D. UNAEGBU. 1992. Nodulation and biological nitrogen fixation of 80 soybean cultivars in symbiosis with indigenous rhizobia. World J. Microbiol. Biotech. 8(2): 171-174.
- ORIHUELA, G.J.A., S.R. MÁRQUEZ-BERBER, H. GARCÍA Y J. SOLANO V. 1985. Evaluación de inoculantes en la variedad de soya BM-2. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- PARKER, C.A., M.J. TRINICK Y D.L. CHATEL. 1977. Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. pp 311-345 In: Hardy, R.W.F. y Gibson, A.H. (Eds.). A treatise on Dinitrogen Fixation, section IV: agronomy and ecology. Wiley-Interscience Publication.
- PERES, J.R.R. AND C. VIDOR. 1980. Seleçao de estirpes de Rhizobium japonicum e competitividade por sitios de infecçao nodular em cultivares de soja (Glycine max (L) Merrill). Agronomia Sulriograndense 16(2): 205-219.
- PROGRAMA DE FERTILIDAD ESTATAL. 1977. Informe técnico. Zona Sur. Tamaulipas, México.
- PROGRAMA DE FERTILIDAD ESTATAL. 1979. Tercer informe técnico. Tamaulipas, México.
- PUEPPKE, S.G. Y J.H. PAYNE. 1987. Responses of Rj<sub>1</sub> and rj<sub>1</sub> soybeans isolines to inoculation with Bradyrhizobium japonicum. Plant Physiology 84: 1291-1295.
- RAMÍREZ-GAMA, R.M., M.N. RODRÍGUEZ M. Y FERRERA-CERRATO, R. 1984. Estado actual de la investigación sobre fijación biológica de nitrógeno en México. XII Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Campinas, Brasil.

- 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.
- ROBERTS, G.P., W.T. LEPS, L.E. SILVER Y W.J. BRILL. 1980. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify Rhizobium strains. App. Environ. Microbiol. 39(2): 414-422.
- SADOWSKY, M.J., P.B. CREGAN, F. RODRÍGUEZ-QUINONES Y H.H. KEYSER. 1990. Microbial influence on gene-for-gene interactions in legume-Rhizobium symbioses. Plant and Soil 129: 53-60.
- 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.
- SARH. 1992a. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 1991. SARH-Subsecretaría de Planeación, México. Tomo I.
- SARH. 1992b. Granos, México en el Contexto Agrícola Mundial 1980-1990. SARH-Subsecretaría de Planeación, México.
- SARH. 1992c. Boletín Mensual de Información Básica del Sector Agropecuario y Forestal, Avance a Julio de 1992. SARH-Subsecretaría de planeación, México.
- SOMASEGARAN, P. Y B.B. BOHLOOL. 1990. Single strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean and dry bean. App. Environ. Microbiol. 56(11): 3298-3303.
- SOMASEGARAN, P., H. HOBEN Y J. HALLIDAY. 1981. Ejercicios Prácticos en Tecnología Rhizobium-leguminosa. Curso Internacional de Tecnología de Rhizobium y Producción de Inoculantes. Colegio de Postgraduados, Chapingo. México.
- SOMASEGARAN, P., R. WOOLFENDEN Y J. HALLIDAY. 1983. Suitability of oven-dried root nodules for Rhizobium strain identification by immunofluorescence and agglutination. J. App. Bacteriol. 55: 253-261.
- SREEKUMAR, K.R. Y A.N. SEN. 1989. Competition among Bradyrhizobium sp strains on nodulation of Vigna radiata (L) (Wilczek). Plant and Soil 117: 287-290.

- SUBBA RAO, N.S. 1984. Interaction of nitrogen fixing microorganisms with other soil microorganisms. pp 37-63. In: Subba Rao, N.S. (Ed.) Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Edward Arnold. Nueva Delhi.
- TCHAN, Y.T. 1982. Application of some newer serological techniques. pp 27-33 In: Vincent, J.M. (Ed.). Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Australia.
- TRINICK, M.J. 1982. Competition between rhizobial strains for nodulation. pp 229-238 In: Vincent, J.M. (Ed.). Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Australia.
- TRUJILLO, G.G. 1981. Producción de inoculantes en México. Resúmenes del Seminario: Fijación Biológica del Nitrógeno. CINVESTAV, IPN. México.
- TSUZUKI R., G., T. BARRIOS L. Y R.M. RAMÍREZ-GAMA. 1981. Selección de cepas efectivas de Rhizobium japonicum para soya variedad Júpiter (PISET III). Resúmenes del Seminario: Fijación Biológica del Nitrógeno. CINVESTAV, IPN. México.
- TSUZUKI R.M.G., M.P. MONTEERRUBIO S., G. VALENCIA R. Y R.M. RAMÍREZ-GAMA. 1985. Efecto de la inoculación en soya en suelos de temporal del tropico húmedo. Resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Fac. de Química UNAM, México.
- UVALLE B., J.X. 1983. La inoculación con Rhizobium japonicum y efecto de molibdeno en frijol soya (Glycine max (L) Merr.) así como la influencia de la nutrición con fósforo y zinc sobre el rendimiento y la toma de nutrimentos. Resúmenes de la Segunda Reunión sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- VARGAS, A.A.T. Y P.H. GRAHAM. 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of Rhizobium in beans. Plant and Soil 117: 195-200.
- VELAGALETI, R.R. Y SARAH MARSH. 1989. Influence of host cultivars and Bradyrhizobium strains on the growth and symbiotic performance of soybean under salt stress. Plant and Soil 119: 133-138.
- VIDOR, C., E. BROSE Y J.S. PEREIRA. 1979. Competição por sitio de infecção nodular entre estirpes de Rhizobium japonicum em cultivares de soja (Glycine max (L) Merrill). Agronomia Sulriograndense 15(2): 227-238.

- VILELA, L., L.N. MIRANDA, J.R.R. PERES. 1978. A cultura da soja em solos de cerrados de Distrito Federal. Comunicado Técnico 2:10. EMBRAPA/CPAC Brasília.
- VINCENT, J.M. 1982. The basic serology of rhizobia. pp 13-26 In: Vincent, J.M. (Ed.). Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Australia.
- VINCENT, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook Nº 15. Blackwell Scientific Pub.. Oxford, Inglaterra.

## 8. APÉNDICE

## Análisis estadístico.

## I. Efectividad e infectividad.

## I.1 Experimento de invernadero con soya de las variedades Júpiter y UFV-1 en macetas con tezontle (EI-1).

Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea (PSPA) y del peso seco de los nódulos (PSN) de la planta.

Var.	PSPA		PSN	
	$F_c$	$F_{0.05}$	$F_c$	$F_{0.05}$
Júpiter	6.7	1.75	1.32	1.80
UFV-1	19.0	1.88	1.93	1.95

Hipótesis

$H_0$ : todas las medias de tratamientos son iguales.

$H_1$ : al menos una de las medias es diferente.

Regla de decisión

Si  $F_c \leq F_{0.05}$  no se rechaza  $H_0$  y se acepta que los tratamientos no ejercen efecto significativo.

Si  $F_c > F_{0.05}$  se rechaza  $H_0$  y se acepta que al menos uno de los tratamientos produce efecto significativo.

I.2 Experimento de invernadero con soya de las variedades Júpiter y Santa Rosa en macetas con tezontle (EI-2).

Análisis de varianza del peso seco de la parte aérea (PSPA) y del peso seco de los nódulos (PSN) de la planta.

Var.		PSPA		PSN	
		$F_C$	$F_{0.05}$	$F_C$	$F_{0.05}$
Júpiter	(b)	0.03	2.47	0.50	2.48
	(t)	3.22	1.69	3.29	1.70
Santa Rosa	(b)	25.94	2.47	7.89	2.48
	(t)	12.48	1.69	4.79	1.70

(b) = bloques                      (t) = tratamientos

Hipótesis

$H_0(b)$ : todas las medias de bloques son iguales.

$H_0(t)$ : todas las medias de tratamientos son iguales.

Regla de decisión

Si  $F_C > F_{0.05}$ , al menos uno de los tratamientos (o de los bloques) produce efecto significativo sobre la variable en estudio.

Si  $F_C < F_{0.05}$ , no existen diferencias significativas entre tratamientos (o entre bloques).

I.3 Experimento en invernadero con soya variedad Júpiter en macetas con suelo de los municipios de Mante, González y Llera, Tams. (EI-3).

Suelo	PSPA		PSN	
	F <sub>C</sub>	F <sub>0.05</sub>	F <sub>C</sub>	F <sub>0.05</sub>
Mante	2.00	1.83	1.20	2.35
González	2.61	1.83	1.38	2.35
Llera	0.95	1.83	0.93	2.35

#### Regla de decisión

Si  $F_C < F_{0.05}$  No se rechaza  $H_0$  y se acepta que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

Si  $F_C > F_{0.05}$  Se rechaza  $H_0$  y se acepta que al menos uno de los tratamientos produce efecto significativo sobre la variable en estudio.

## II. Competitividad.

### II.1 Experimento de invernadero con soya variedad Júpiter en macetas con tezontle (EI-1).

Análisis de varianza (1 factor).

#### Hipótesis

$H_0$ : todas las medias de tratamientos son iguales.

$H_1$ : al menos una de las medias es diferente.

#### Regla de decision

Si  $F_C \leq F_{0.05}$  no se rechaza  $H_0$  y se acepta que los tratamientos no ejercen efecto significativo.

Si  $F_C > F_{0.05}$  se rechaza  $H_0$  y se acepta que al menos uno de los tratamientos produce efecto significativo.

#### Prueba F

Factor (cepas)	$F_C$	$F_{0.05}$
4-7-9	3.29	5.14
4-17-18	23.24	5.14
7-17-18	14.39	5.14
9-12-16	22.48	5.14
12-17-18	16.74	5.14

## Separación de medias (Scheffé)

Cepas	$\xi$	$ \bar{Y}_j - \bar{Y}_k $	Decisión
4-17-18	1.91	$ 17-4  = 7.67$ $ 17-18  = 3.67$ $ 18-4  = 4.0$	17>18>4
7-17-18	1.96	$ 7-17  = 5.66$ $ 17-18  = 5.0$ $ 18-7  = 0.66$	17>18=7
9-12-16	2.20	$ 9-12  = 5.34$ $ 9-16  = 8.67$ $ 12-16  = 3.33$	9>12>16
12-17-18	2.12	$ 18-17  = 2.0$ $ 18-12  = 7.0$ $ 17-12  = 5.0$	17=18>12

Regla de decisiónSi  $|\bar{Y}_j - \bar{Y}_k| \geq \xi$ ,  $\tau_j = \tau_k$ Si  $|\bar{Y}_j - \bar{Y}_k| < \xi$ ,  $\tau_j = \tau_k$ 

## Pruebas de hipótesis

Ho:  $\mu_x = \mu_y$ H<sub>1</sub>:  $\mu_x > \mu_y$  $\alpha = 0.05$ Si  $t_0 \leq c$  no se rechaza Ho, Si  $t_0 > c$  se rechaza Ho

Cepas	$t_0$	c	Decisión
4-12-16	6.73	2.13	12>4-16
4-16-18	30.32	2.13	18>4-16
9-17-18	0.93	2.13	17=9-18
12-16-17	12.38	2.13	17>12>16

II.2 Experimento en invernadero con soya variedad Júpiter en macetas con suelo de Mante, Tams. ( $S_1$ ), González, Tams. ( $S_2$ ), y Llera, Tams. ( $S_3$ ). (EI-3).

Análisis de varianza (2 factores).

R= filas= factor suelo, C= columnas= factor cepas

I= interacción suelo X cepa.

### Hipótesis

Ho(R): todas las medias de tratamiento son iguales.

Ho(C): todas las medias de bloque son iguales.

Ho(I): no hay interacción entre tratamientos y bloques.

### Regla de decisión

Si  $F_C > F_{0.05}$ , el factor produce efecto significativo sobre el carácter en estudio.

Si  $F_C < F_{0.05}$ , el factor no produce efecto significativo.

Cuadro latino.		Prueba F				Decisión
R	C	$F_C(R)$	$F_C(C)$	$F_C(I)$	$F_{0.05}$	
$S_1$	4-7-9	0.31	0.07	0.27	19.0	No se rechaza Ho.
	4-17-18	0.22	0.94	2.11	19.0	
$S_2$	7-17-18	0.03	0.03	0.33	19.0	de los factores en estudio produce efecto.
	9-12-16	0.09	0.83	0.43	19.0	
$S_3$	12-17-18	0.009	0.105	1.03	19.0	produce efecto.
	12-16-17	0.028	0.28	1.42	19.0	

Bloques al azar.		Prueba F			Decisión
R	C	$F_C(R)$	$F_C(C)$	$F_{0.05}$	
$S_1$	(4-16)-12	0.032	0.76	R= 18.5	No se rechaza Ho (R, C)
$S_2$	(4-16)-18	0.059	23.21	C= 19.0	Se rechaza Ho (C)
$S_3$	(7-12)-16	0.004	0.0		No se rechaza Ho (R, C)
	(9-18)-17	0.143	3.98		No se rechaza Ho (R, C)

Separación de medias (Scheffé)

Cepas	$\xi$	$ \bar{Y}_j - \bar{Y}_k $	Decisión
(4-16)-18	13.36	26.33	(4-16) > 18