

1 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE
Gliricidia sepium EN RELACIÓN SIMBIÓTICA
CON *Rhizobium*.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

CARLOS MANUEL ACOSTA DURÁN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JULIO 2002



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 esta 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.

CON DEDICATORIA A:

TERESA
mi madre

DIANA
mi esposa

JUAN CARLOS
y DENISSE
mis hijos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO..... por la dirección del trabajo
y por sus valiosos consejos.

AL COMITÉ TUTORIAL

DR. JOSÉ MANUEL PALMA GARCÍA

DR. DANIEL PIÑERO DALMAU

..... por su valioso apoyo durante el desarrollo del trabajo.

AL MVZ FERNANDO ROMERO TORRES..... por la propuesta y su colaboración
durante el desarrollo de los estudios

AL COMITÉ REVISOR DE LA TESIS..... por sus observaciones que
enriquecieron considerablemente el documento de la tesis.

AL PUEBLO DE MÉXICO..... por el financiamiento de mis estudios.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	2
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. LOS ÁRBOLES FIJADORES DE NITRÓGENO (AFN).....	3
2.2.- <i>Gliricidia sepium</i>	4
2.3.- <i>Rhizobium</i>	5
2.4.- EL PROCESO DE NODULACIÓN.....	7
2.5.- INFECCIÓN Y DESARROLLO DEL NÓDULO.....	9
2.6.- FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR <i>Gliricidia sepium</i>	12
III.- HIPÓTESIS.....	14
3.1.- OBJETIVOS.....	14
IV. MATERIALES Y METODOS.....	15
4.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> AISLADAS DE <i>Gliricidia sepium</i>	15
4.2. COMPORTAMIENTO DE DOS ECOTIPOS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO Y LA NODULACION NATURAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO.....	18
4.3. EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> INOCULADAS CON CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	20
4.4. CINÉTICA DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	22
4.5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE <i>Gliricidia sepium</i> CON CEPAS NATIVAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	23
4.6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN Y LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA EN LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN EL REBROTE EN CONDICIONES DE INVERNADERO.....	25
4.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE <i>Gliricidia sepium</i> EN CONDICIONES DE CAMPO.....	27
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> AISLADAS DE <i>Gliricidia sepium</i>	29
5.2. COMPORTAMIENTO DE DOS ECOTIPOS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO Y DE SU NODULACION NATURAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO.....	41
5.3. EVALUACIÓN DE LA NODULACION DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> INOCULADAS CON CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	50
5.4. CINÉTICA DE LA NODULACION DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	55
5.5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE <i>Gliricidia sepium</i> CON CEPAS NATIVAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	58

5.6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN Y LA FERTILIZACION QUÍMICA EN LA NODULACION DE PLANTAS DE <i>Gliricidia sepium</i> EN EL REBROTE EN CONDICIONES DE INVERNADERO	66
5.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS NATIVAS DE <i>Rhizobium</i> EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE <i>Gliricidia sepium</i> EN CONDICIONES DE CAMPO.....	71
VI. CONCLUSIONES.....	73
VII. REFERENCIAS.....	75
VIII. ANEXOS	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Existe información acerca de las relaciones simbióticas que las leguminosas establecen con bacterias Rhizobiaceas, principalmente sobre biología, comportamiento y sistemática, pero poco se sabe acerca del comportamiento de ambos organismos en condiciones naturales. Así mismo se ha incrementado en muchos países en desarrollo el uso de árboles en sistemas agroforestales que aumenten la productividad del sistema y mantengan la fertilidad del suelo reduciendo la tasa de erosión.

Gliricidia sepium es una leguminosa que tiene potencial forrajero por su contenido de proteína (23 %) y su digestibilidad (60 %), por sus condiciones de adaptación es excelente para suelos de poca fertilidad como los del trópico seco. Sin embargo se conoce poco sobre las bacterias simbióticas asociadas.

El objetivo general del trabajo fue la evaluación de la productividad de *Gliricidia sepium* en relación simbiótica con *Rhizobium* para lo cual se muestrearon cepas de las localidades de Santa Rosa y Huitzilac, Morelos y de Veracruz, Veracruz. Las colonias se caracterizaron por el análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA (PCR-RFLP), electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), perfiles de plásmidos (Echardt), ensayos de hibridación, ensayos de nodulación en plantas y por sensibilidad a los antibióticos. Para determinar el comportamiento productivo y la nodulación natural se establecieron dos ecotipos (Morelos y Colima) en un suelo donde crece en condiciones naturales para observar la fase inicial de crecimiento y obtener cepas nativas. Se registraron datos de productividad de la planta y los nódulos se aislaron mediante técnicas convencionales.

Se validaron las cepas nativas en condiciones de laboratorio, en los dos ecotipos y se determinó el periodo del inicio de la nodulación mediante una cinética en condiciones de laboratorio inoculando con una mezcla de siete cepas nativas que presentaron mayor capacidad de nodulación. Como *G. sepium* es una planta caducifolia se estudio la cinética de nodulación de plantas que terminan el reposo e inician un nuevo periodo de crecimiento vegetativo.

Se evaluó el efecto de la inoculación con cepas nativas de *Rhizobium* en la respuesta productiva de *Gliricidia sepium* en condiciones de campo.

En las cepas aisladas de *G. sepium* se observaron cuatro tipos que fueron identificados como *Sinorhizobium terangae*, *Rhizobium tropici* (tipos A y B) y *Rhizobium etli*.

Los resultados del comportamiento muestran diferencias significativas en cada uno de los ecotipos, los parámetros productivos fueron superiores en el ecotipo de Colima con respecto al de Morelos, se encontraron diferencias significativas en el número de nódulos a partir de los 60 días lo que se reflejó en un efecto importante en algunas de las variables de productividad.

Se encontró diferencia en el inicio de la nodulación en condiciones de laboratorio y de invernadero. En laboratorio a los ocho días ya se observan nódulos formados. Se observó que existen nuevas etapas de infección durante el crecimiento de la planta. En condiciones de invernadero y en suelo el proceso tarda hasta 20 días. En plantas en maceta sin inoculación inició a los 20 días, con un 100 % de plantas con nódulos. Las plantas de rebrote nodularon a los 20 días y se analizaron la producción de biomasa y la

nodulación en plantas inoculadas y fertilizadas químicamente contra plantas no tratadas.

En la evaluación en condiciones de campo se observó una tendencia de las plantas inoculadas para superar a las no inoculadas en las variables estudiadas.

Los resultados de este trabajo nos llevan a concluir que la variación de *Gliricidia sepium* nos da la oportunidad de buscar aquellos genotipos con mayor capacidad productiva y con alta habilidad para establecer simbiosis con *Rhizobium* además de seleccionar dentro de las especies de bacterias aquellas que tienen mejores respuestas a la inoculación lo que en el corto plazo nos permitirá proponer un manejo para esta especie como un elemento importante en sistemas agroforestales con alta productividad y con una visión de conservación ecológica.

I. INTRODUCCIÓN.

Una de las preocupaciones más importantes de la población actual es el futuro de la producción de alimentos sin el deterioro del ambiente. Hasta ahora la tecnología generada para aumentar la oferta de alimentos, de todo tipo, se ha basado en la aplicación de prácticas tecnológicas con una consecuente alteración del ecosistema. Esto ha generado fuertes efectos de degradación y de contaminación con materiales químicos que han propiciado que los agrosistemas presenten cada vez menor capacidad para producir alimentos.

En la actualidad, la política agropecuaria en México se basa en el aumento de la productividad mediante la implementación de tecnología, como la utilización de fertilizantes en cantidades cada vez mayores para compensar las pérdidas de fertilidad, el incremento en el uso de plaguicidas de todo tipo, la introducción de variedades y razas mejoradas y el uso de maquinaria sofisticada para hacer más eficientes las tareas agrícolas. Sin embargo en sus esquemas de desarrollo no consideran los efectos que este tipo de actividades tienen más allá de las parcelas cultivadas, ni de sus implicaciones a largo plazo.

En nuestro país, las cadenas montañosas se ubican a todo lo largo del territorio por lo que la agricultura de ladera es una actividad prácticamente inevitable, se estima que solamente el 14 % del territorio mexicano tiene tierras aptas para la agricultura y menos del 26% de éstas tienen posibilidades de irrigación, por lo cual no debe extrañar que las altas tasas de erosión señaladas en México sean, en gran medida, el resultado del cultivo intensivo de maíz en zonas montañosas bajo condiciones de un inadecuado manejo agrícola.

La tendencia actual de la investigación debe mantener presente dos aspectos; primero, generar tecnologías no agresivas con el ambiente manteniendo un nivel



creciente de producción de alimentos y segundo, recuperar al máximo posible las condiciones originales del ambiente

1.1. JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda de alimentos obliga a buscar, nuevas alternativas para generar aumentos en la oferta de los mismos.

Una de las determinantes en la producción de carne, es la alimentación animal que hasta ahora ha dependido de productos estacionales que compiten por espacio y recursos con la producción de granos para la alimentación humana.

Una alternativa viable para incrementar la producción de alimentos para ganado es aumentar la disponibilidad de forraje con alto contenido de proteínas como es el caso de las leguminosas, por lo que hay que buscar la posibilidad de desarrollar tecnología para aumentar el volúmen y la calidad del forraje utilizando áreas con poco potencial agrícola en donde la competencia por el espacio se reduce considerablemente.

La selva baja caducifolia con condiciones de suelos malos y agricultura de temporal nos dan la oportunidad de utilizar especies adaptadas a la región que tienen potencial forrajero como es el caso de las leguminosas arbóreas como *Gliricidia sepium* señalada con un alto contenido protéico cuyo uso programado, constante y aprovechando su asociación simbiótica con microorganismos, podría brindarnos la posibilidad de ofrecer una alternativa forrajera de alta calidad.

II. ANTECEDENTES.

2.1. LOS ÁRBOLES FIJADORES DE NITRÓGENO (AFN).

Muchos de los árboles forestales son leguminosas y nodulan con bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* y tienen la capacidad de fijar el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera en forma de gas. Existen más de 18 000 especies de leguminosas de las cuales cerca del 40 % son arbóreas. De las especies arbóreas solo el 18 % ha sido analizado en cuanto a su capacidad de nodulación y se ha encontrado que el 92-94 % de la subfamilia mimosidae-papilionidae nodulan y solo el 34 % de la ceasalpinoidea presentan nodulación (Allen y col. 1981; Brewbaker y col. 1982; Dobereiner, 1984).

No es fácil determinar si una leguminosa arborea nodula ya que es difícil encontrar nódulos en los suelos forestales, además de que no se pueden atribuir a un árbol en particular, por lo que los estudios en plantas jóvenes son muy valiosos para establecer la capacidad de nodulación de ciertos árboles.

En la búsqueda de sistemas de cultivo que reemplacen o mejoren los métodos tradicionales que ayuden al desarrollo de métodos ecológicamente estables, el cultivo en callejones es uno de los sistemas en los que los AFN juegan un papel muy importante. Sirven para reciclar nutrientes y agua desde la profundidad del suelo, para la fijación atmosférica de N y para reducir la temperatura del suelo, así como la evaporación del agua del mismo (Onwuka, 1984)

Los árboles fijadores de nitrógeno pueden crecer en asociación con otros cultivos en sistemas agroforestales donde sirven como fuente de leña, alimento

animal, restauradores de la fertilidad del suelo y para reducir la erosión (Danso y col. 1992).

Gliricidia sepium es un árbol fijador de nitrógeno que se esta incluyendo recurrentemente en sistemas de cultivo en los trópicos (Onwuka, 1984) ya que por sus características tanto de adaptación como de productividad es una alternativa forrajera muy prometedora (Francisco y Hernández, 1998).

2.2.- *Gliricidia sepium*

Gliricidia es un género pequeño que comprende tres especies, pertenece a la tribu Robinieae, subfamilia Papilionoidae dentro de la familia Leguminosae. Las otras dos especies del género son *G. maculata* y *G. brenningii* (Lavín y Sousa, 1995). *G. brenningii* es fácilmente distinguible de las otras dos pero las diferencias entre *G. sepium* y *G. maculata* son mínimas por lo que frecuentemente son confundidas. El género *Gliricidia* es comunmente asociado con *G. sepium* ya que es la especie más ampliamente conocida y cultivada, las otras dos especies son prácticamente desconocidas fuera de sus lugares de origen (Hughes, 1987; Lavín y col. 1991).

Gliricidia sepium o mata ratón, es una leguminosa arbórea de rápido crecimiento que puede llegar hasta los 15 m de altura, es nativa de las selvas secas neotropicales de México y Centroamérica y es ampliamente cultivada en los trópicos para usar sus hojas como forraje, su madera para construcciones o como cercos vivos (Hughes, 1987). Es uno de los árboles de usos múltiples más conocidos en Centroamérica. Crece bien en lugares cálidos con una temperatura promedio de 22-30 °C y con una precipitación entre 800 y 2 300 mm por año (Onwuka, 1984; Attakrah y col., 1986).

La corteza es escamosa que puede ser de color verde-amarillento a café-grisáceo, las hojas dan una apariencia plumosa pero no son muy angostas, las cuales se caen cuando empieza a florecer, las flores se encuentran en racimos muy vistosos de aroma dulce, de color blanco, rosa o lila. Los frutos son unas vainas aplanadas de verde amarillentas a verde limón, en las que se notan las semillas.

Se han considerado distintos manejos para su producción tanto en cerco vivo como para pastoreo. Se ha evaluado su producción de forraje, su respuesta a la poda, su velocidad de crecimiento, el tiempo de rebrote, su resistencia a la sequia, así como su calidad nutritiva con tenores de proteína cruda de 23.5%, fibra cruda de 24.4% y energía metabolizable de 2.87 Mcal/Kg de materia seca y con una digestibilidad de la materia orgánica de 65%, (Glober, 1989; Otarola, 1995) por lo que esta especie tiene un gran potencial para su uso como fuente de forraje para la ganadería tropical.

Gliricidia sepium es considerada por varios autores como una de las leguminosas de trópico seco con mayor capacidad de fijación de nitrógeno ya que se estima que puede fijar de 86 a 370 Kg N/ha/año (Peoples y col. 1995).

2.3.- *Rhizobium*

Filogenéticamente el género *Rhizobium* pertenece a la subdivisión alfa de las Proteobacterias. Originalmente el género *Rhizobium* fue clasificado como dos géneros, el *Rhizobium* que agrupa las cepas de rápido crecimiento y el *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982) creado para incluir a las cepas de crecimiento lento. Posteriormente han aumentado considerablemente el número de aislamientos de bacterias de diferentes plantas en todo el mundo y se han caracterizado por métodos

modernos de taxonomía polifásica lo que ha llevado a la descripción de nuevos géneros y especies.

El género *Rhizobium* es una bacteria gram negativa que presenta un gran número de especies bacterianas de rápido crecimiento que forman colonias gomosas y translúcidas en agar-manitol-levadura y con capacidad de establecer una relación simbiótica con las plantas de la familia Leguminosae, que se caracteriza por la formación de nódulos en las raíces. Los nódulos son de formas, tamaños y apariencias diversas que dependen específicamente de la especie vegetal. La bacteria dentro del nódulo se diferencia a bacteroide.

La característica principal de esta bacteria es la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico que puede ser utilizado por la planta en sus procesos de crecimiento y desarrollo, además de que propicia el aumento de la fertilidad de un suelo, beneficiando a todo tipo de plantas que crecen en él, aunque no sean de la familia de las leguminosas, al tomar el nitrógeno del aire y convertirlo en lo que se puede llamar fertilizante biológico.

En la India en pruebas de campo en centros de investigación, la inoculación con *Rhizobium* en el cultivo de garbanzo incrementó el rendimiento de grano en 342 Kg ha⁻¹. Se observaron diferencias significativas en 7 de las 16 localidades estudiadas (Subba Rao, 1976).

Cerca de 228 pruebas de inoculación con *Rhizobium* fueron realizadas por la International Network of Legumes Inoculation Trials (INLIT) por científicos de 28 países y en aproximadamente el 52% de los casos, la inoculación incrementó significativamente el rendimiento (Davis y col. 1985).

En 12 pruebas de campo en garbanzo, las parcelas inoculadas incrementaron el rendimiento de grano en 116 Kg ha^{-1} , con respecto al testigo. En otras pruebas el promedio del incremento fue del orden de 112 a 227 Kg ha^{-1} (Chandra y Ali, 1986).

En 1 500 demostraciones de campo a los productores de la India, se lograron incrementos del 100% aplicando una combinación balanceada de dinitro amonio fosfato (DAP) e inoculación con *Rhizobium* (Chinmulgund y Hedge, 1987).

En cacahuete la respuesta a la inoculación con *Rhizobium* fue muy variable, observándose desde decrementos en el rendimiento, hasta incrementos significativos con respecto a las parcelas testigo (Kulkarni y Joshi, 1988; Nambiar y col. 1988; Subba Rao, 1976).

2.4. EL PROCESO DE NODULACIÓN.

El inicio de la nodulación se produce por señales que son enviadas por la planta mediante sustancias químicas principalmente flavonoides (Hirsch, 1999; Sprent, 2001). Estas sustancias son detectadas por el rhizobio causando la activación de un grupo específico de genes llamado genes de nodulación. Los productos de los genes de nodulación sintetizan y ayudan a secretar los llamados factores nod los cuales son lipoquitina-oligosacáridos (LCOs) (Lerouge y col. 1990; Spaink y col. 1991a) inducen a la bacteria a iniciar el proceso que necesariamente estará influenciado por factores externos (Sprent y Raven, 1992). El inicio de la comunicación se da como resultado del nivel de abastecimiento de nutrientes o de las condiciones de estrés. Diversos autores han estudiado la nodulación más como un proceso bacteriano, pero la falta de información de su comportamiento en la relación simbiótica con los árboles no ha permitido aplicar inoculantes en campo con éxito.

Las bacterias tienen hospederos específicos y cada especie de bacteria puede infectar solo uno o un limitado número de especies de plantas, implicando la especificidad del hospedero. Se ha demostrado que la naturaleza química exacta de los factores nod secretados por cada especie de Rhizobio juega un papel importante en la determinación de la especificidad del hospedero y en el inicio del proceso de nodulación.

Los genes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC* y *nodD*) están presentes en todos los *Rhizobium*. El gene *nodD* codifica a un factor de transcripción que llega a ser activado por flavonoides secretados por la planta, y la proteína *nodD* regula la expresión de los otros genes *nod*. Cuando es expresado en ausencia de otros genes de nodulación, los genes *nodA*, *nodB*, y *nodC* producen un LCO base (Spaink y col. 1991b). Estos tres genes siempre están localizados en un operón, con excepción de *M. loti*, *R. etli* y *R. sp.* cepa N33 (Cloutier y col. 1996; Scott y col. 1996). Otros genes *nod* están presentes en este operón en una cepa o en unas pocas cepas, tal como *nodX* en *R. leguminosarum* bv vicia cv TOM (Firmin y col. 1993), *nodO* en *R. leguminosarum* (Sutton y col. 1994), *nodI* en *Rhizobium sp.* NGR234 (Jabbouri y col. 1998) y *nodK* en *A. caulinodans* (Mergaert y col. 1996).

El resultado de la detección de los factores nod por la planta hospedera y los cambios resultantes en los patrones de la expresión génica preparan y facilitan la entrada de bacterias en la planta. La acción de los LCO's puede ser detectada después de la incubación de las raíces de plantas con concentraciones nanomolares de LCO's (Spaink y col. 1991a). El primer cambio detectado es una rápida despolarización de la membrana del pelo radical (Felle y col. 1995) mismo que depende de los cambios en el flujo de calcio (Allen y col. 1994) y la reorganización del citoesqueleto del pelo radicular. Subsecuentemente ocurren la deformación del pelo radical (Lerouge y col. 1990), la formación del hilo de preinfección (van Brussel y col. 1992), las divisiones de células corticales de la raíz y por último se lleva a cabo la formación de un primordio de nódulo (Spaink y col. 1991a; López-Lara y col.

1995). En el caso de *Medicago* se pueden formar nódulos completos después de la adición de LCO en ausencia de bacterias fijadoras de nitrógeno (Truchet y col. 1991).

El hecho de que la planta pueda formar un nódulo completo en la ausencia de *Rhizobium*, como en el caso de *Medicago*, demuestra que los genes de las plantas poseen la información genética necesaria para la organogénesis del nódulo y que los factores *nod* son simplemente el detonante para los cambios morfológicos de la planta (Spaink y col. 1994). En respuesta a la infección por *Rhizobium*, las plantas leguminosas expresan genes llamados "de nodulación temprana" (genes ENOD) los cuales están implicados en los estados iniciales de la nodulación. Ejemplos de estos genes son: *ENOD40* (Kouchi y Hata, 1993), *ENOD5* (Scheres y col. 1990a) y *ENOD12* (Scheres y col. 1990b). La función exacta de estos genes aún no es muy clara.

NodD es la principal proteína reguladora de la síntesis de LCO. En las cepas más estudiadas la proteína nodD esta presente en cantidades muy pequeñas pero detectables. En muchas cepas se puede llevar a cabo la autorregulación positiva o negativa (Schlaman y col. 1998). NodD activa la transcripción del remanente de genes *nod*, pero solo en la presencia del inductor correcto. NodD es un miembro de la familia de activadores de transcripción y se cree que esta localizada en la membrana citoplásmica (Schlaman y col. 1998).

2.5 .- INFECCIÓN Y DESARROLLO DEL NÓDULO.

La infección de la raíz y el desarrollo del nódulo incluye la colonización de la rizósfera y la absorción de flavonoides de la planta por el *Rhizobium* que modifica la

expresión genética para iniciar la producción de factores específicos para posibilitar la infección y la nodulación.

En el primer tipo de infección, *Rhizobium* invade los pequeños pelos radicales que inician el crecimiento causándole un enrollamiento del pelo que encierra una microcolonia de *Rhizobium*. De esta manera induce la producción de un hilo de infección con la célula del pelo radical. El hilo de infección crece en las células corticales de la raíz llevando al *Rhizobium*.

El segundo tipo de infección ocurre a través de las células corticales o de las células epidérmicas, las cuales no han formado pelos radicales, usualmente en el rompimiento de la integridad de la corteza causada por la emergencia de una raíz lateral. El *Rhizobium* invade la raíz creciendo en los espacios intercelulares, una microcolonia causa el adelgazamiento de la pared de células corticales y crece alrededor de la bacteria depositando materiales de la pared celular en la superficie interna de la pared y la bacteria parece crecer a través de esta barrera.

Una vez liberada, el *Rhizobium* induce la división celular del hospedero. Todas las células invadidas son producidas por constantes divisiones celulares del hospedero. Los nódulos producidos de esta forma, usualmente tienen una forma redonda. Los nódulos de *Parasponia* parecen formarse de esta forma.

La mayoría de los nódulos de árboles parecen desarrollarse desde el hilo de infección y también se caracterizan por un meristemo terminal, el cual continúa a formar células para el crecimiento del nódulo. A un lado del meristemo la expansión de células está invadida por hilos de infección liberados por el *Rhizobium*. El cual entonces se divide y se multiplica, al mismo tiempo que permanece encerrado en una membrana derivada de la planta. Esta membrana puede contener uno o varios bacteroides los cuales pueden tener forma de bastón pero por algunas asociaciones pueden ser muy alargados o pleomórficos. Solo una pequeña porción de las células

corticales del nódulo, en algunos nódulos de árboles esta invadido. Poco se conoce acerca del efecto que este tiene en el funcionamiento del nódulo, porque por el crecimiento continuo, los nódulos perennes pueden ser muy grandes (más de tres centímetros de largo), con frecuencia con varios meristemos desarrollados del original, dando al nódulo una apariencia alargada.

Gliricidia sepium presenta nódulos de tipo indeterminado (Corby, 1988) y puede nodular con un rango de cepas de *Rhizobium* con diferentes grados de efectividad (Turk y Keyser, 1992).

Las leguminosas arbóreas son noduladas por dos clases de *Rhizobium*. Un tipo mejor conocido como *Bradyrhizobium* de lento crecimiento en medio de laboratorio, pero que es el tipo predominante en la mayoría de los suelos tropicales, nodulando efectivamente muchas plantas tropicales. Se pensaba que todas las familias de leguminosas arbóreas eran noduladas por *Bradyrhizobium* pero recientemente se han encontrado otros géneros.

Existen diferencias entre la efectividad con ciertas cepas. El suelo contiene muchos tipos de *Rhizobium* y en algunos suelos, las poblaciones de cepas apropiadas de *Rhizobium* pueden estar ausentes o ser demasiado pequeñas para que la nodulación ocurra. En estas situaciones donde puede esperarse una respuesta a la inoculación de *Rhizobium*, las cepas para usarse como inoculante deben seleccionarse para una planta en particular. Este proceso empieza con el desarrollo de una colección de cepas que son aisladas de nódulos, generalmente obtenidos de la leguminosa en consideración. Esto sigue a la determinación de la habilidad para fijar nitrógeno en una prueba de cepas en macetas con un medio en el cual no existe *Rhizobium*.

Algunas veces los suelos contienen cepas que nodulan pero que no son muy efectivas en la fijación de nitrógeno. En esta situación, la inoculación de las plantas

con una cepa superior puede suplantar a la población indígena del suelo en la formación de nódulos. Esto no es fácil porque solo un pequeño número de bacterias puede ser agregada en el inóculo comparado con la gran y diversa población de *Rhizobium* existente en el suelo. Para superar la competencia de la población indígena la cepa del inóculo necesita tener una habilidad intrínseca para competir en la formación de nódulos y ser capaz de colonizar la raíz rápidamente, además de que la cepa debe estar presente en la zona de la raíz susceptible a la nodulación.

2.6.- FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR *Gliricidia sepium*.

En Sri Lanka, *Gliricidia sepium* es el árbol fijador de nitrógeno más usado en cultivos asociados, principalmente con palma de coco, para proporcionar biofertilizantes y alimento animal (Liyanage y Jayasundara, 1988; Liyanage y col. 1990)

Aunque *Gliricidia sepium* es uno de los árboles más populares en sistemas de granjas, hay muy poca información sobre las diferencias en la capacidad de fijación de nitrógeno de diferentes procedencias de este AFN (Liyanage y col. 1994)

Sanguinga y col. (1991), demostraron que la cantidad de N fijado en ecotipos de *Gliricidia sepium* fue influenciada por las cepas de *Rhizobium*. Estimaron que la proporción de N en la planta derivado de la fijación biológica de N fue del orden del 36% por *Rhizobium* spp. SP14 y del 71% por *Rhizobium* spp. SP44.

Por otra parte Awonaike y col. (1992), comparando la interacción genotipo-*Gliricidia* X cepa-*Rhizobium*, encontraron que de 25 asociaciones estudiadas, 22 tomaron de la atmósfera más del 50% del N necesario para su crecimiento, comparando así su potencial de fijación con el de *Leucaena leucocephala*.

Turk y Keiser (1992), en una serie de experimentos de inoculación para determinar la especificidad de *Rhizobium* con las variedades de las leguminosas encontraron que *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *C. calothyrsus* nodularon con cualquiera de los rhizobios aislados de cada una de las tres especies.

En Nigeria la inoculación de *Leucaena leucocephala* con *Rhizobium* Irc 1045 y Irc 1050 produjo un efecto estadísticamente equivalente a la aplicación de 150 Kg ha⁻¹ año⁻¹ (como urea) en la producción de materia seca (Sanguinga y col. 1994).

En algunos casos la inoculación con *Rhizobium* no aumentó el rendimiento, pero incrementó el contenido de N en el grano y en las diferentes partes de la planta con respecto a las no inoculadas (Wani y col. 1995).

El cultivo de leguminosas arbóreas "en contorno" es altamente benéfico por la habilidad de estas, para la fijación de N mediante la simbiosis con *Rhizobium*. El cálculo de la fijación biológica de N en árboles en contorno como *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *Acacia mangium* pueden derivar de la atmósfera, entre 100 y 300 Kg ha⁻¹ año⁻¹ (Sanguinga y col. 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. HIPÓTESIS

La inoculación de plantas de *Gliricidia sepium* con bacterias nativas del género *Rhizobium* puede incrementar la producción de biomasa.

3.1. OBJETIVOS.

GENERAL.

Evaluar la productividad de *Gliricidia sepium* en relación simbiótica con *Rhizobium*.

ESPECÍFICOS.

1. Identificar las especies de *Rhizobium* simbiotes de *Gliricidia sepium*.
2. Evaluar el comportamiento de *Gliricidia sepium* en relación con su nodulación natural.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de *Rhizobium* en la productividad de *Gliricidia sepium*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* AISLADAS DE *Gliricidia sepium*.

Para determinar la diversidad de los rhizobium que se asocian con *Gliricidia sepium* se colectaron nódulos de tres lugares diferentes.

Santa Rosa, Morelos es una localidad con 900 msnm con temperatura promedio de 24°C y suelo arcillo arenoso con pH de 6.3. Huitzilac, Morelos es es una localidad que esta a 1800 msnm con una temperatura promedio de 12.4 °C y suelo arenosos con un pH de 5.4. Veracruz, Veracruz, localidad que se ubica a nivel del mar con temperatura promedio de 25.2 °C y suelo arenoso con pH de 7.9.

Los nódulos fueron esterilizados con hipoclorito de sodio (Martínez y col., 1987) y estriados en cajas de petri con medio PY (peptona de caseína 5 g, extracto de almidón 3g, CaCl₂ 0.6 g y agar 15 g por litro) con o sin ácido nalidíxico (Nal, 20 mg/l) o en medio mínimo (González-Pasayo y Martínez-Romero 2000) o en medio YM (Vincent, 1970). Se probó su crecimiento en PY sin calcio, con antibióticos o a 37 °C. Se confirmó la esterilidad de la superficie y se purificó una colonia de cada nódulo. También se probó su crecimiento en placas de medio LB (Miller, 1972). Se realizaron otras pruebas fenotípicas como lo describió Wang y col. (1998).

Para analizar la diversidad es necesario contar con métodos de aislamiento más precisos por lo que se diseño un procedimiento para aislar selectivamente a *R. tropici*. Este consiste en el crecimiento de aislados de nódulos en placas de agar con medio mínimo, de ahí repicar colonias aisladas a placas con medio PY con carbenicilina (1000 mg l⁻¹) y repetirlas en placas con PY para crecimiento a 37 °C.

Con este procedimiento pueden identificarse rápidamente las cepas de *R. tropici* tipo B.

4.1.1. Análisis PCR-RFLP de los genes 16S rRNA y su secuencia.

Se sintetizaron fragmentos casi completos de genes 16S rRNA en reacciones de PCR con Taq polimerasa usando los oligonucleotidos *fd1* y *rd1* (Weisburg y col., 1991) y se digirieron con las enzimas de restricción *HinfI*, *HhaI*, *MspI*, *RsaI*, *DdeI* y *Sau3AI*. Los fragmentos resultantes fueron analizados con geles de agarosa (Laguerre y col., 1994) y comparados con los patrones de las cepas tipo de las especies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Las secuencias parciales de 16S rRNA fueron obtenidas de las cepas CFNEV21, CFNEA34 y CFNEA90 según Rogel y col. (2001). Las secuencias se alinearon y se analizaron con los programas GCG y CustalW. Los productos de PCR del gene *nifH* se obtuvieron de CFNEA90 con los primers *nifH1* y *nifH2* y se realizó la secuencia.

4.1.2. Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE).

Se cultivaron los aislados bacterianos en medio PY líquido y los extractos fueron preparados como se describió por Wang y col. (1998) corriendo la electroforesis en geles de almidón o de almidón (7.5 %) con agarosa (1.5 %). Las enzimas metabólicas probadas fueron las siguientes: hexokinasa, glutamato, glucosa-6-fosfato, malato, alanina e isocitrato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa y enzima málica (Selander y col., 1986).

4.1.3. Perfiles de plásmidos y ensayos de hibridación.

Para visualizar los plásmidos en geles de agarosa se siguió un procedimiento modificado de Eckhardt (Hynes y McGregor, 1990). El DNA fue extraído con el kit "genomic Prep TM" de Amersham Pharmacia siguiendo las instrucciones del fabricante. La hibridación fue realizada como lo estableció Wang y col. (1998).

4.1.4. Ensayos de nodulación.

Semillas de *Gliricidia sepium* ecotipo Morelos, se esterilizaron y se germinaron en cajas de petri con agar. Las plántulas fueron trasplantadas en conos de 20 cm de profundidad conteniendo vermiculita estéril y se colocaron en invernadero o en cámaras de crecimiento. Se escarificaron semillas de *Acacia farnesiana* con ácido sulfúrico. Se crecieron plántulas de *Leucaena* y *Acacia* en matraces con vermiculita estéril y con solución de Fahraeus sin nitrógeno (Fahraeus, 1957). También se pusieron a crecer semillas de *Phaseolus vulgaris* en matraces con un soporte de algodón y en condiciones de esterilidad con la misma solución nutritiva (Wang y col., 1998). La raíz de las plántulas fue inoculada con las colonias de bacterias (10^5 UFC) de cada cepa al momento de la plantación.

4.1.5. Estudio de poblaciones.

Los nódulos que se colectaron de plantas de 40 días de edad que crecieron en condiciones de invernadero en suelo sin esterilizar se llevaron al laboratorio y se desinfectaron exteriormente. Posteriormente se rompieron y el contenido de cada nódulo se estrió en cajas de petri conteniendo medio de cultivo PY.

A las 48 hr se observaron los crecimientos de las colonias y se reaislaron dos veces para obtener cultivos puros. Estas colonias se identificaron con números progresivos.



Para agrupar las cepas se utilizó la técnica de Electroforesis de Enzimas Multilocus (MLEE) (Selander, 1986).

Posteriormente se realizó un estudio de la población de cepas con capacidad de nodular a *Gliricidia sepium*. Para lo cual se muestrearon un total de 200 nódulos de los cuales se obtuvieron 184 aislados mismos que se agruparon en dos series mediante su sensibilidad a algunos antibióticos.

Los antibióticos que se utilizaron fueron: en la primera serie PY + carbenicilina 1000 µg por ml, PY + eritromicina 300 µg por ml, PY + kanamicina 500 µg por ml, PY + gentamicina 5 µg por ml, PY + nalidíxico 20 µg por ml, PY + Ca (a 37 °C) y el medio de cultivo LB. En la segunda serie, PY + carbenicilina 1000 µg por ml, PY + kanamicina 500 µg por ml, PY + nalidíxico 20 µg por ml, PY 37°C, LB y PY + Ca.

4.2. COMPORTAMIENTO DE DOS ECOTIPOS DE *Gliricidia sepium* EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO Y LA NODULACION NATURAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

El experimento se desarrolló en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UAEM en Cuernavaca Morelos, bajo condiciones de invernadero. La estructura utilizada fue un túnel de 12 x 4 x 4 m de largo, ancho y alto respectivamente, con cubierta de polietileno tratado.

Se sembraron 160 semillas de cada uno de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* (Morelos y Colima) en un suelo representativo de la zona donde crece en forma natural dentro del Estado.

El suelo es un arcillo-arenoso con pH de 6.3, 2.3% de materia orgánica, 0.15 ppm de N, 0.10 ppm de P y 0.13 ppm de K.

La siembra se realizó en macetas de polietileno de 25 cm de ancho por 20, 40, 60 y 80 cm de profundidad, con suelo sin esterilizar extraído directamente del campo. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. La unidad experimental consistió de cuatro macetas con una planta cada una. Se realizó análisis de varianza de un diseño completamente al azar y se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) para establecer la diferencia múltiple de medias.

Se tomaron datos con muestreos destructivos a los 20, 40, 60 y 80 días y las variables observadas fueron:

- a) EMERGENCIA: Días desde la siembra hasta la apertura del cotiledón.
Porcentaje total.
- b) TALLO: Longitud.- se midió desde la base del tallo hasta el meristemo apical.
Diámetro basal.- Se midió con un vernier de mano a un centímetro de altura de la base del tallo.
Peso fresco.- Se pesó el material dentro de la primera hora después de la cosecha.
Peso seco.- Se colocó el material en un horno de laboratorio a 70 °C hasta peso constante.
- c) HOJAS: Número.- Hojas abiertas sin considerar las cotiledonares.
Altura de inserción.- De la base del tallo al primer pecíolo.
Peso fresco.- Se pesó el material dentro de la primera hora después de la cosecha.
Peso seco.- Se colocó el material en un horno de laboratorio a 70 °C hasta peso constante.
- d) RELACIÓN HOJA / TALLO: El cálculo fue dividiendo el peso fresco de las hojas entre el peso fresco del tallo.
- e) RAÍZ Longitud, desde el cuello hasta la ramificación más larga.
Peso fresco.- Se pesó el material dentro de la primera hora después de la cosecha.
Peso seco - Se colocó el material en un horno de laboratorio a 70 °C hasta peso constante.

- f) NÓDULOS: Cantidad por planta y porcentaje de plantas con nódulos.
- g) VELOCIDAD DE CRECIMIENTO: Definido como la relación de altura entre número de días (cm/día).

Se analizó el comportamiento entre los ecotipos en cada fecha de muestreo y dentro de cada ecotipo, a lo largo de los 80 días. Para el análisis dentro de cada ecotipo se ajustaron los datos para evaluar los incrementos en periodos de 20 días cada uno para cada variable, excepto en el caso del número de nódulos, para considerar el efecto del total del número de nódulos y no sólo el incremento del periodo.

4.3. EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* INOCULADAS CON CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Los nódulos aislados de plantas de *Gliricidia sepium* de 40 días de edad, crecidas en suelo sin esterilizar, en condiciones de invernadero, se llevaron al laboratorio y mediante técnicas convencionales (Vincent, 1970) se aislaron las cepas que fueron marcadas con números progresivos

Las semillas de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* (Colima y Morelos) se desinfectaron y se pusieron a germinar en agar al 0.8 % durante 48 hr.

Por otro lado, se prepararon matraces de 250 ml de capacidad, con 100 gr de vermiculita y 100 ml de solución nutritiva de Faraheus (1957) sin nitrógeno y se esterilizaron.

Posteriormente se colocó una semilla previamente germinada en cada uno de los matraces y se mantuvieron a 28 °C en oscuridad constante durante 4 días para su etiolación.

Después de este tiempo, se inoculó cada matraz con una cepa nativa diferente hasta un total de 25 cepas. Las cepas fueron escogidas por su morfología, considerando las más parecidas a las del género *Rhizobium*. Como referencia se usaron dos matraces sin inocular, uno sin esterilizar el sustrato y el otro esterilizado para considerarlos como testigos.

Cuatro días después de la inoculación, se colocaron en un cuarto con condiciones de 28 °C de temperatura y periodos de 15 hr de luz por 9 de oscuridad.

Se regaron periódicamente durante 60 días y se sacaron de los matraces para evaluar su nodulación y su comportamiento.

Al final del experimento se tomaron datos de longitud de tallo (cm), longitud de raíz (cm), número de hojas, peso fresco de tallo (gr), hojas (gr) y raíz (gr), peso seco de tallo (gr), hojas (gr) y raíz (gr) y cantidad y peso fresco de nódulos (gr).

Para el análisis estadístico de los resultados se agruparon los datos en cuatro grupos denominados de la siguiente forma:

MOR +	=	Ecotipo de Morelos que presentó nódulos
MOR -	=	Ecotipo de Morelos que no presentó nódulos
COL +	=	Ecotipo de Colima que presentó nódulos
COL -	=	Ecotipo de Colima que no presentó nódulos

Con los datos agrupados se realizó análisis de varianza para un diseño completamente al azar y se separaron las medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

4.4. CINÉTICA DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Se desinfectaron semillas de *Gliricidia sepium* (ecotipo Morelos) mediante su inmersión durante 3 minutos en alcohol y 15 minutos en Cloralex al 20 %, después se lavaron cinco veces con agua estéril y se pusieron a germinar en cajas de petri con agar al 0.8 % en condiciones de obscuridad a 28 °C durante 48 hr.

Se utilizaron charolas con tubos forestales de plástico negro de 4 cm de diámetro por 16 cm de largo, mismos que se llenaron con 50 gr de vermiculita estéril y 40 ml de solución nutritiva sin nitrógeno

Se colocó una semilla previamente germinada en cada tubo y se cubrieron con papel aluminio. Una vez sembrados se colocaron en condiciones de obscuridad a 28 °C durante 48 hr para su etiolación.

Posteriormente se inocularon con una mezcla de siete cultivos frescos de las cepas: 284, 272, 281-A, 264, 287-A, 279 y 283, que fueron aisladas de *Gliricidia sepium* y que en el experimento previo mostraron una mayor capacidad de nodulación.

A las 48 horas se colocaron los conos (56 plantas) en un cuarto con 28 °C de temperatura constante y periodos de 15 hr de luz por 9 de obscuridad. Se colocaron tapones de hule espuma estériles cuando las hojas sobrepasaron el borde superior del tubo.

Se aplicaron riegos con agua estéril cada tres días durante todo el experimento.

Los muestreos fueron de tipo destructivo a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 días. Se utilizaron siete plantas en cada muestreo.

Para precisar el momento en que inicia la nodulación, se realizó otro estudio de cinética con la misma metodología descrita anteriormente utilizando el mismo ecotipo, solamente difirió en los muestreos, los cuales se hicieron diariamente a partir del tercer día después de la inoculación y finalizaron a los 10 días.

4.5. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Gliricidia sepium* CON CEPAS NATIVAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Se desinfectaron semillas de *Gliricidia sepium* (ecotipo Morelos) mediante su inmersión durante 3 minutos en alcohol y 15 minutos en Cloralex al 20 %, después se lavaron cinco veces con agua estéril y se pusieron a germinar en cajas de petri con agar al 0.8% en condiciones de obscuridad a 28 °C durante 48 hr.

Se utilizaron charolas con tubos forestales de plástico negro de 4 cm de diámetro por 16 cm de largo, mismos que se llenaron con tres sustratos. El primero fue suelo de Santa Rosa Morelos, lugar donde la planta crece abundantemente en condiciones naturales, el segundo fue suelo de Huitzilac Morelos lugar en el que no se encuentra la planta y el tercero consistió de 50 gr de vermiculita estéril y 40 ml de solución nutritiva sin nitrógeno. En ninguno de los casos se esterilizó el suelo. Se colocó una semilla previamente germinada en cada tubo y se cubrieron con papel aluminio. Una vez sembrados se colocaron en condiciones de obscuridad a 28 °C durante 48 hr para su etiolación.

Posteriormente se inocularon con una mezcla de siete cultivos recientes de las cepas: 284, 272, 281-A, 264, 287-A, 279 y 283, que fueron aisladas de *Gliricidia*

sepium y en un experimento previo mostraron una mayor respuesta a la nodulación. Solo se inoculó la mitad de los conos de cada uno de los dos tipos de suelo

A las 48 horas se colocó una charola (56 plantas) en condiciones de laboratorio, en un cuarto con 28 °C de temperatura y periodos de 15 hr de luz por 9 de oscuridad. Se colocaron tapones de hule espuma estériles cuando las hojas sobrepasaron el borde superior del tubo.

El resto de las plantas se colocaron en un invernadero donde la temperatura fue de entre 7 y 30°C.

Se aplicaron riegos con agua estéril cada tres días durante todo el experimento.

Los muestreos fueron de tipo destructivo a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 días. Se utilizaron siete plantas en cada muestreo.

Se consideraron los siguientes seis tratamientos:

- T1 = Santa Rosa - natural – invernadero
- T2 = Santa Rosa- Inoculado - Invernadero
- T3 = Huitzilac - Natural – Invernadero
- T4 = Huitzilac - Inoculado – Invernadero
- T5 = Vermiculita - Inoculado - Invernadero
- T6 = Vermiculita - Inoculado - Laboratorio

Las observaciones registradas fueron:

Nodulación (número)

Vástago (longitud, peso fresco)

Raíz (longitud, peso fresco)

Se consideró como tratamiento control a las plantas que permanecieron en condiciones de laboratorio.

Se realizó el análisis de varianza para un diseño completamente al azar para detectar las diferencias entre tratamientos y una prueba de Tukey ($P < 0.05$) para establecer las diferencias entre medias.

4.6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN Y LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA EN LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* EN EL REBROTE EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Para determinar el momento del inicio de la nodulación en plantas que inician su periodo vegetativo después del reposo, se utilizaron plantas del ecotipo Morelos de *Gliricidia sepium* de un año de edad crecidas en bolsas de polietileno de 25 cm de diámetro por 35 cm de altura, con capacidad de 6 l, en condiciones de invernadero y con riego constante, cuando se inició el amarillamiento de las hojas basales se suspendió el riego para promover la caída de las hojas.

En el inicio del experimento se escogieron 4 plantas de 30 cm de altura para cada muestreo.

Al inicio de la primavera se regaron las plantas y se mantuvo el riego cada semana. A los 4 días después del primer riego se inocularon las plantas y se aplicaron los tratamientos químicos de la siguiente forma:

T1	Control
T2	Nitrógeno (equivalente a 25 Kg / Ha)
T3	Fósforo (equivalente a 25 Kg /Ha)
T4	Nitrógeno + Fósforo (mismas dosis)
T5	Inoculado

Para la aplicación de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio (20.5 % de N), para el fósforo se utilizó superfosfato simple de calcio (30.5 % de P_2O_5).

Para la inoculación se preparó una mezcla de 10 cepas aisladas de plantas de *Gliricidia sepium* de la siguiente manera.

Se colocaron 10 cultivos con cada una de las cepas en 5 ml de PY + Ca líquido en agitación constante durante 48 hr en la obscuridad, posteriormente se mezclaron y se aforó a 2 l con agua estéril. Se aplicaron 50 ml de la mezcla a cada maceta.

La parcela experimental consistió de cuatro macetas con una planta cada una, de 30 cm de altura para cada fecha de muestreo y se realizaron muestreos destructivos cada 7 días durante 8 semanas.

Las variables observadas fueron: número de nódulos, porcentaje de plantas noduladas y producción de biomasa (peso fresco y seco del vástago).

Se analizó la varianza como un diseño completamente al azar y se estableció la diferencia entre tratamientos mediante una prueba de Tukey ($P < 0.05$).

4.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE *Gliricidia sepium* EN CONDICIONES DE CAMPO.

Se sembraron semillas de *Gliricidia sepium* en una parcela ubicada en Zacatepec Morelos, que se caracteriza por tener una temperatura media de 24.1 °C, una precipitación de 832.4 mm anuales y una altura de 920 msnm.

El suelo de la parcela es un Arcillo-Limoso, con pH de 5.4 y 2.93 % de materia orgánica. El cultivo de los dos años anteriores fue sorgo de temporal con fertilización química.

La preparación del terreno se hizo en forma convencional con surcado a 70 cm y se sembró a chorrillo para tener una densidad aproximada de 200 000 plantas por ha. La siembra se realizó en el mes de julio, cuando se estableció el temporal. Se midieron parcelas de 8 surcos de 14 m de largo. Los tratamientos fueron inoculación de la semilla en el momento de la siembra y control sin inocular.

Para la inoculación se utilizó una mezcla de las cepas 284, 272, 281-A, 264, 287-A, 279 y 283 . Se inoculó cada una de las cepas por separado en medio líquido de PY, en agitación constante durante 24 hr y en la obscuridad. Se realizó una mezcla y se aplicó a 200 gr de lombricomposta, se combinó perfectamente con la semilla y se sembró de inmediato.

No se utilizaron fertilizantes, ni agroquímicos y se eliminó la maleza a los 60 días después de la siembra. Se cosechó al final del temporal cuando las hojas basales empezaron a amarillarse y a desprenderse.

Se establecieron cuatro repeticiones de cada tratamiento y se realizó un análisis estadístico con t de student. Se midieron 6 plantas al azar dentro de cada repetición.

Las variables observadas fueron: longitud de tallo (cm), número de hojas, peso fresco de hojas (gr), peso fresco de tallos (gr), peso fresco total (gr), relación hoja / tallo, peso seco de hojas (gr) y peso seco de tallos (gr).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* AISLADAS DE *Gliricidia sepium*.

No existen referencias sobre las especies de *Rhizobium* que nodulan a *G. sepium* en condiciones naturales por lo que se consideró de utilidad caracterizar los aislamientos de nódulos de *G. sepium* con la metodología empleada en estudios de sistemática y taxonomía de *Rhizobium*.

El número de nódulos aislados de la raíz de *Gliricidia sepium* de cada sitio fue de 200 de suelo de Huitzilac, de 164 de suelo de Santa Rosa y 40 de plantas en suelo de Veracruz. *Gliricidia sepium* crece de manera silvestre en Santa Rosa y en Veracruz pero en Huitzilac no se encuentra en forma natural.

En los aislados de Santa Rosa se identificaron tres grupos principales por sus características morfológicas, por sus patrones aloenzimáticos y por PCR-RFLP de los genes 16S rRNA.

El primero de los grupos que fue el más numeroso (48 %) presentó patrones de 16S rRNA similares a los de *Sinorhizobium teranga* (Cuadro 1)

El segundo grupo que comprendió al 25 % de los aislados fue identificado como *R. tropici* tipo B comparándolo con la secuencia completa de los genes 16S rRNA de una cepa de referencia (CFNER90), así como por sus características fenotípicas como la resistencia a la carbenicilina (1 g l^{-1}), al cloramfenicol (5 g l^{-1}), su crecimiento en los medios PY a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, LB y PY sin calcio. Las cepas de Santa Rosa

presentaron colonias mas gomosas que las que crecen con la cepa de referencia CIAT899.

Cuadro 1.- Aislados seleccionados de nódulos de *Gliricidia sepium* y cepas de referencia. Las letras diferentes de los patrones de 16S rRNA representan los patrones de los productos de PCR obtenidos respectivamente con las enzimas de restricción (*MspI*, *HinfI*, *HhaI*, *RsaI*, *DdeI*) como describe Wang y col. (1998) siguiendo las técnicas descritas por Laguerre y col. (1994).

		Patrones de 16S rRNA
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. terangae</i> ORS51(referencia) ^a	LBIAF
<i>Rhizobium</i>	<i>R. tropici</i> CFN299 (referencia)	EBFDL
	<i>R. tropici</i> tipo A (de Veracruz) ^b	EBFDL
	<i>R. tropici</i> tipo A (de Santa Rosa) ^c	EBFDL
	<i>R. tropici</i> CIAT 899	FBDDBE
	<i>R. tropici</i> tipo B (de Santa Rosa) ^d	FBDDBE
	<i>R. etli</i> CFN42 (referencia)	DBECE
	<i>R. etli</i> CFNER343	DBECE

^ade Lajudie y col (1994).

^bAislados CFNEV3, CFNEV13, CFNEV16, CFNEV17, CFNEV19, CFNEV21, CFNEV24, CFNEV32, CFNEV34, CFNEV35, CFNEV37.

^cAislados CFNER2, CFNER6, CFNER13, CFNER18, CFNER26, CFNER34, CFNER35, CFNER40, CFNER41, CFNER44, CFNER47, CFNER51.

^dAislados CFNER76, CFNER83, CFNER85, CFNER88, CFNER90

El tercer grupo compuesto por el 26 % de los aislados fue altamente similar por sus características morfológicas a la cepa de *R. tropici* tipo A; las colonias no fueron gomosas, fueron sensibles a los mismos antibióticos, no crecieron en los medios LB y PY sin calcio y una cepa representativa del grupo (CFNER34) presentó en 700 pb una secuencia similar al gene 16S rRNA de CFN299.

Solo uno de los aislados de Santa Rosa se identificó como *R. etli*, mediante patrones de RFLP de los genes 16S rRNA (Cuadro 1). Esta cepa fue ubicada como *biovar phaseoli* por las características del gene *nifH* así como por presentar un gran número de plásmidos como en otras cepas de *R. etli*.

De otra colecta de nódulos de suelo de Santa Rosa, cepas aisladas de plantas de *G. sepium* de dos ecotipos diferentes (Morelos y Colima) crecidas en condiciones de invernadero, también se agruparon mediante el método de enzimas multilocus, por su resistencia a antibióticos y nos muestran tres grupos (Figura 1) El análisis se hizo con un grupo representativo del total de las cepas aisladas (Cuadro 2). Cada grupo se presentó con una frecuencia de 4.7 %, de 14.2 % y de 80.9 % para el primero, segundo y tercero respectivamente. En el primero se ubicó la cepa 266-A que procede de Colima y en el segundo y tercer grupo se encontraron cepas de ambos ecotipos. Las cepas de esta colecta no se caracterizaron posteriormente. Los aislados provinieron de plantas que tuvieron variación principalmente en el número de nódulos entre plantas de los ecotipos de Morelos y Colima en condiciones de invernadero.

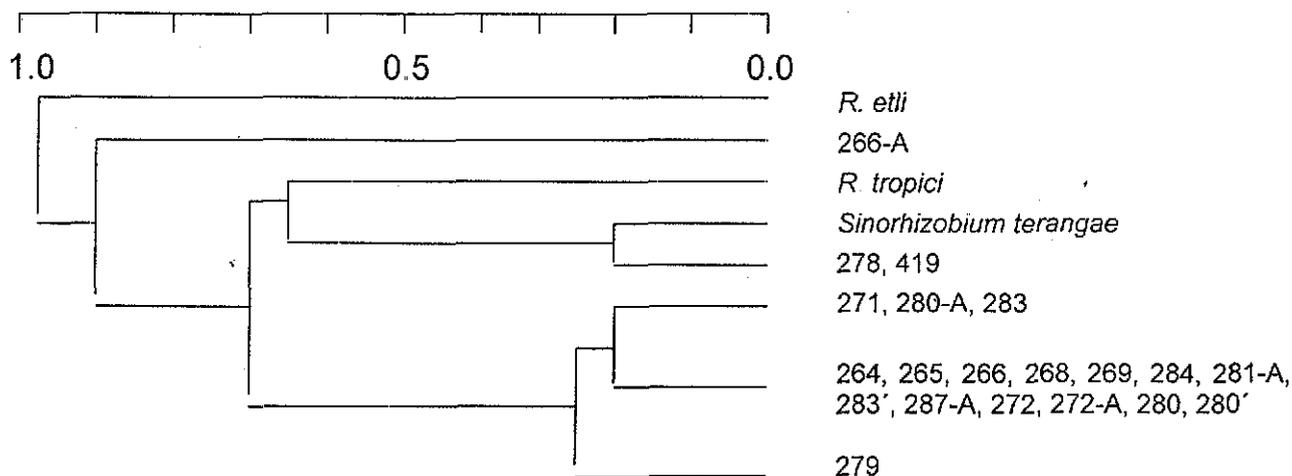


FIGURA 1.- Relaciones de las cepas aisladas de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* crecidas en suelo de Santa Rosa, agrupadas por sus electroferotipos.

Las cepas aisladas de Veracruz fueron morfológicamente idénticas entre ellas e idénticas a la morfología y tasa de crecimiento a la cepa CFN299 de *R. tropici* tipo A (en medio PY), pero sus colonias fueron menos gomosas cuando crecieron en medio YM. Tampoco fueron capaces de crecer en medio PY a 37 °C, en medio LB o

en presencia de los antibióticos, excepto con Nal como la cepa CFN299. Cepas representativas presentaron patrones de restricción idénticos de 16 rRNA (Cuadro 1) y dos cepas representativas (CFNEV21 y CFNEV34) presentaron secuencias idénticas del gene 16S rRNA a la secuencia del gene de CFN299 de *R. tropici* en más de los 700 pb secuenciados. Los patrones de plásmidos encontrados en las cepas CFNEV21 y CFNEV34 fueron similares a los encontrados en la cepa CFN299 pero también se observaron otros plásmidos más pequeños.

Ambas cepas de *R. tropici* tipo A y tipo B aislados tanto de Veracruz como de Santa Rosa fueron resistentes en medio con Nal (20 mg l⁻¹) y crecieron en pH de 4.5. Todos los aislados de *Gliricidia sepium* de suelo de Veracruz fueron agrupados con cepas de *R. tropici* por sus patrones de enzimas metabólicas.

La secuencia de los genes *nifH* de la cepa CFNER90 mostró una alta similitud con *R. tropici* tipo B cepa BR6001 aislada de frijol en Brasil (Haukka y col., 1998) que esta relacionada con *R. tropici* tipo B cepa CIAT899.

En la determinación de los niveles de hibridación del DNA total de una cepa aislada de Santa Rosa (CFNER90) y de una de Veracruz (CFNEV21), la de Santa Rosa mostró un 67 % de hibridación con la cepa CIAT899 de *R. tropici*, de 92 a 98 % con otras cepas de *R. tropici* tipo B aisladas de Santa Rosa y solo un 16 % o menos con otras de las cepas de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. La cepa CFNEV21 de Veracruz hibridizó 68% con CFN299, 100 % con CFNEV34 (de Veracruz) y 40 % con la cepa CIAT899 (*R. tropici* tipo B) (Cuadro 1).

En un estudio en el estado de Veracruz (Melchor-Marroquín y col., 1999) se observaron diferentes tipos de cepas que se podían recuperar de nódulos de *G. sepium* en México en función a la altura del sitio de aislamiento, pero no se realizó un análisis genético para determinar las especies de *Rhizobium* involucradas. La descripción que hace de las cepas parece indicar que corresponden a *R. tropici* por

su tolerancia a la salinidad que es una característica diferencial en esta cepa (Graham, 1992).

Cuadro 2.- Concentrado de cepas nativas aisladas de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* crecidas en suelo de Santa Rosa.

ECOTIPO	EDAD DE LA PLANTA	NÓDULOS POR PLANTA	CEPAS AISLADAS	TOTAL DE CEPAS
COLIMA	40	1	264	1
COLIMA	40	5	265, 266, 266-A	3
COLIMA	40	2	267	1
COLIMA	40	12	268, 289, 290, 291, 292, 293	6
MORELOS	40	9	269, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 281-A, 287-A, 283'	10
MORELOS	40	3	278, 279, 271, 278-A	4
MORELOS	40	4	272, 273, 272-A	3
MORELOS	40	2	270, 280, 280-A, 280-B, 280'	5
MORELOS	40	4	274, 275, 276, 277, 275-A	5
COLIMA	40	1	288	1
COLIMA	40	9	294, 295	2
MORELOS	60	5	306, 307, 308, 309	4
MORELOS	60	10	300, 301, 302, 303, 304, 305	6
MORELOS	60	9	296, 297, 298, 299	4
COLIMA	60	8	339, 340, 341, 342, 343	5
COLIMA	60	17	332, 333, 334, 335, 336, 337, 338	7
COLIMA	60	9	325, 326, 327, 328, 329, 330, 331	7
COLIMA	60	1	324	1
COLIMA	60	5	323	1
COLIMA	60	15	316, 317, 318, 319, 320, 321, 322	7
COLIMA	60	9	310, 311, 312, 313	4
COLIMA	60	7	314, 315	2
MORELOS	80	2	344	1
MORELOS	80	3	397, 398	2
MORELOS	80	5	396	1
MORELOS	80	7	389, 390, 391	3
MORELOS	80	5	385, 386, 387, 388	4
MORELOS	80	3	383	1
MORELOS	80	12	392, 393, 394, 395	4
MORELOS	80	1	384	1
COLIMA	80	29	348, 349, 350, 351, 352, 356, 357, 358, 359	9
COLIMA	80	5	353, 354, 355	3
COLIMA	80	2	345, 346, 347	3
COLIMA	80	5	365, 366, 367	3
COLIMA	80	4	379, 380, 381, 382	4
COLIMA	80	32	368, 369, 370, 371, 372, 373	6
COLIMA	80	4	362, 363, 364, 376, 377, 378	6
COLIMA	80	7	360, 361	2
COLIMA	80	14	374, 375	2
COLIMA	80	2	413, 414	2
COLIMA	80	5	415, 416, 417, 418	4
COLIMA	80	7	404, 405, 406, 407	4
COLIMA	80	9	399, 400, 401, 402, 403	5
COLIMA	80	8	408, 409, 410, 411, 412	5
COLIMA	60	9	419	1
TOTAL		327		163

A pesar de que Huitzilac no es un medio natural de crecimiento de *Gliricidia sepium* se encontraron nódulos en plantas crecidas en suelo de Huitzilac en condiciones de invernadero. Se realizaron dos colectas, en los cuadros 3 y 4 se muestra la existencia de grupos diferentes de acuerdo a su sensibilidad a los antibióticos en las poblaciones de cepas aisladas de nódulos de *G. sepium* crecida en suelo de Huitzilac.

En las figuras 2 y 3 podemos observar las relaciones de diferentes grupos de cepas aisladas de *G. sepium* que muestran la existencia de tres grupos diferentes. El primero que es el mayoritario fue constituido por más de la mitad de las cepas (del 52 al 70 %), el segundo grupo representó entre el 28 y 33 % de los aislados y el tercer grupo formado por un porcentaje del 1 al 13 %.

Gliricidia sepium no crece en condiciones naturales en Huitzilac por lo que estos resultados nos indican que *G. sepium* parece ser poco específica en sus requerimientos de bacterias simbiotes y que en ausencia de las "específicas" nodula con las cepas disponibles en el suelo. Es posible que las "no específicas" tuvieran capacidades de fijación limitadas por lo que se podrían esperar respuestas positivas en el desarrollo de plantas cuando se inoculen con cepas seleccionadas.

Se ha visto que *Leucaena* fuera de su lugar de origen nodula con bacterias diferentes que las que se encuentran en los sitios donde *Leucaena* es nativa. En algunos casos se ha considerado que *Leucaena* y *Gliricidia* pertenecen al mismo grupo de inoculación y tal vez se comporten de manera semejante en su selectividad por simbiotes.

Hernández-Lucas y col. (1995) reportó que la cepa CFN42 de *R. etli* bv. *phaseoli* nodula *Gliricidia maculata* en condiciones de laboratorio y otros autores mencionan que las cepas aisladas de *Calliandra* sp, *Leucaena* sp (Turk and Keiser,

1992) y *Sesbania sp.* (MacDiken, 1994) pueden formar nódulos exitosamente en *G. sepium* pero no aclaran que especies son las que se asocian.

Bala y Giller (2001) encontraron que *G. sepium* puede formar nódulos con cepas de *R tropici*, *R. mongolense*, *Mesium sp.*, *Mezorhizobium sp.*, *Sinorhizobium sp* y *Agrobacterium*.

Cuadro 3.- Sensibilidad a algunos antibióticos de las cepas aisladas de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* crecidas en suelo de Huitzilac en condiciones de invernadero.

CB1000	ERI300	KM500	GM5	NAL20	LB	CANTIDAD	PORCENTAJE
+	+	+	-	+	+	3	3.22
+	+	+	+	+	+	21	22.50
-	-	-	+	+	+	3	3.22
+	+	-	+	+	+	7	7.52
+	+	+	+	+	-	7	7.52
-	+	+	+	+	+	4	4.30
-	-	-	+	+	-	4	4.30
-	-	+	+	+	+	2	2.15
-	-	-	-	+	-	3	3.22
-	-	+	+	+	-	1	1.07
-	-	+	-	+	-	2	2.15
-	-	+	-	+	+	3	3.22
+	-	-	+	+	+	2	2.15
-	-	-	-	+	+	3	3.22
+	-	-	+	-	+	1	1.07
-	-	-	+	-	-	1	1.07
-	-	-	-	-	-	6	6.45
+	-	+	+	+	+	1	1.07
+	-	+	-	+	-	1	1.07
+	+	-	+	+	-	3	3.22
+	+	-	-	+	-	2	2.15
+	-	-	-	+	-	1	1.07
+	+	+	+	-	-	1	1.07
+	+	-	+	-	-	1	1.07
+	+	+	-	+	-	1	1.07
-	+	-	+	+	+	1	1.07
+	+	-	-	+	+	3	3.22
-	-	-	+	-	+	1	1.07
-	-	-	-	-	+	2	2.15
-	+	+	-	+	-	1	1.07
+	-	-	+	+	-	1	1.07
					TOTAL	93	99.79

Cuadro 4.- Sensibilidad a algunos antibióticos de las cepas aisladas de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* crecida en suelo de Huitzilac en condiciones de invernadero.

Cb1000	Km500	Nal20	PY 37°C	LB	PY+Ca	CANTIDAD	PORCENTAJE
-	+	+	-	+	+	11	12.08
+	+	+	+	+	-	1	1.09
+	+	+	+	-	+	11	12.08
+	+	+	-	+	+	14	15.28
-	+	+	-	-	+	4	4.39
-	+	+	+	+	+	5	5.49
+	+	+	+	+	+	28	30.76
+	+	+	-	-	+	6	6.59
-	-	+	-	+	+	4	4.39
-	-	+	-	-	+	2	2.19
-	-	+	+	+	+	1	1.09
-	+	+	+	-	+	3	3.29
-	-	+	+	-	+	1	1.09
TOTAL						91	99.81

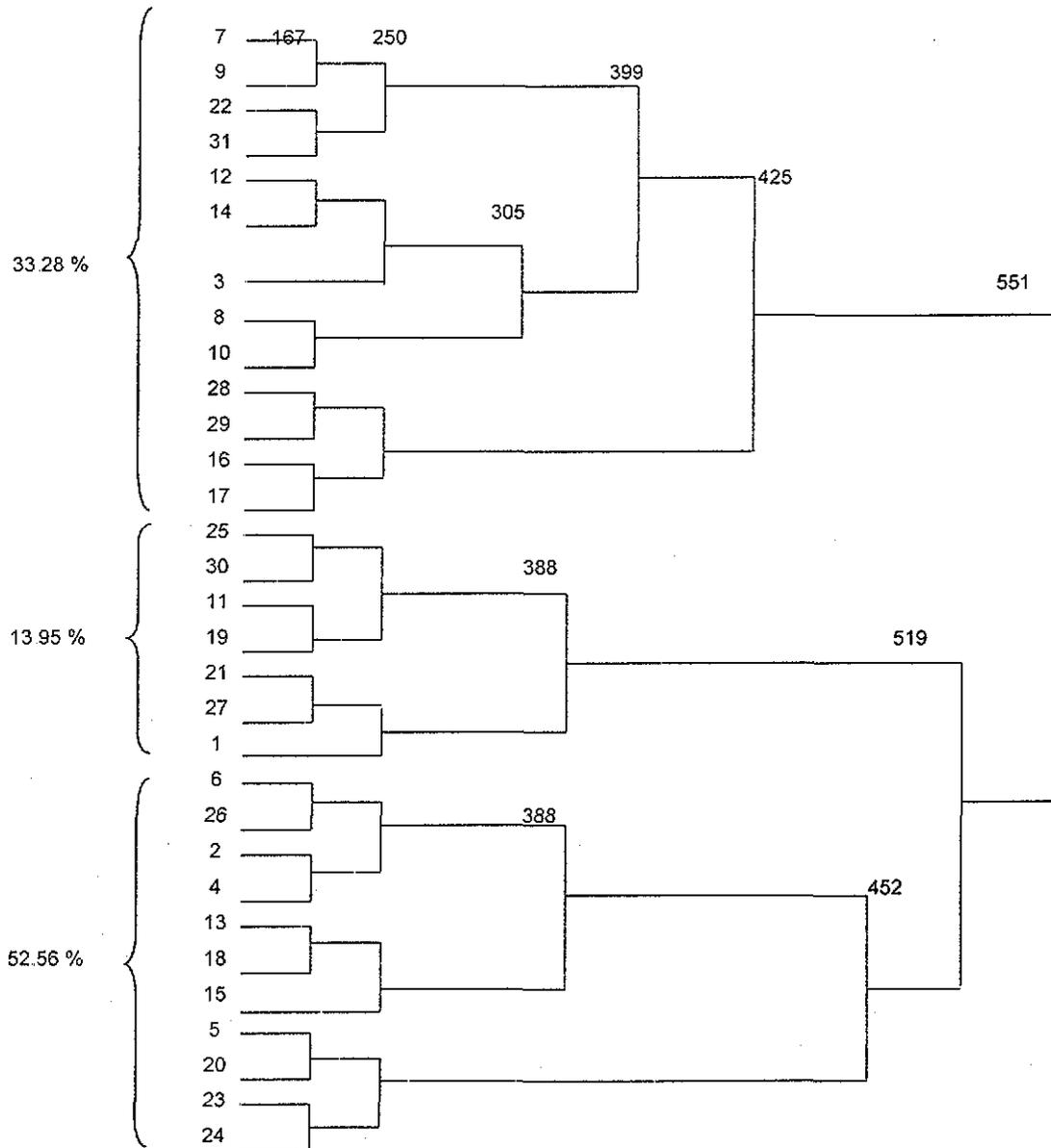


Figura 2.- Relaciones de cepas aisladas de nódulos de plantas de *G. sepium* crecidas en suelo de Huitzilac, por su sensibilidad a algunos antibióticos.

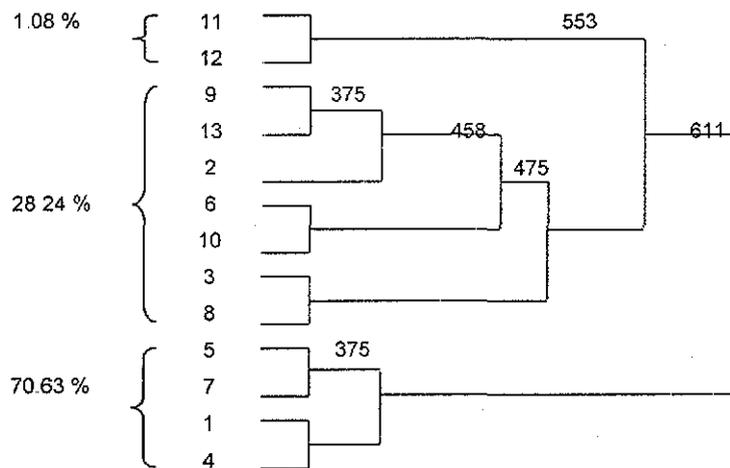


Figura 3.- Relaciones de cepas aisladas de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* crecidas en suelo de Huitzilac, por su sensibilidad a algunos antibióticos.

Los nódulos de *Gliricidia sepium* (ecotipo Morelos) aparecieron 8 días después de la inoculación con diferentes cepas en las cámaras de crecimiento. En condiciones de laboratorio las cepas de *R. tropici* tipo A y B aisladas de *G. sepium* nodularon plantas de *Phaseolus vulgaris* (frijol común) y formaron un promedio de 15 nódulos por planta a los 14 días después de la inoculación. Los aislados de tipo B también nodularon en plantas de *Acacia farnesiana* y *Leucaena leucocephala*.

R. tropici ha llegado a ser un modelo de estudio de las interacciones planta-bacteria (Debelle y col., 1996; Laeremans y Vanderleyden, 1998; Mavingui y col., 1997, 1998; Ricillo y col., 2000) aunque es menos competitivo que *R. etli* para la nodulación en frijol (Martínez-Romero y Rosenblueht, 1991) se ha observado que *R. tropici* bloquea la nodulación de *R. etli* en algunos cultivares de frijol con alta capacidad de fijación de nitrógeno (Martínez-Romero y col., 1998).

Hay que resaltar que el plásmido simbiótico de *R. tropici* es la pieza esencial que contiene la información genética de la simbiosis y puede ser transferida a diferentes hospederos y transmitirles la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno (Martínez y col., 1987; Rogel y col., 2001). La definición de un hospedero natural de *R. tropici* enriquece el panorama de la investigación en la interacción *R. tropici* - planta. La seguridad del conocimiento de los simbioses de *G. sepium* puede ayudar a promover la inoculación y mejorar su productividad como un insumo para la producción animal, ya que se ha reconocido la importancia de elegir a la cepa más adecuada para la inoculación que tenga la capacidad de propiciar el establecimiento exitoso de las plántulas (Melchor-Marroquín y col., 1999).

En este estudio se identificaron tres grupos principales que se ubicaron en las especies de, *Shinorizobium terangae*, *Rhizobium tropici* tipos A y B y *Rhizobium etli* (Figura 4).

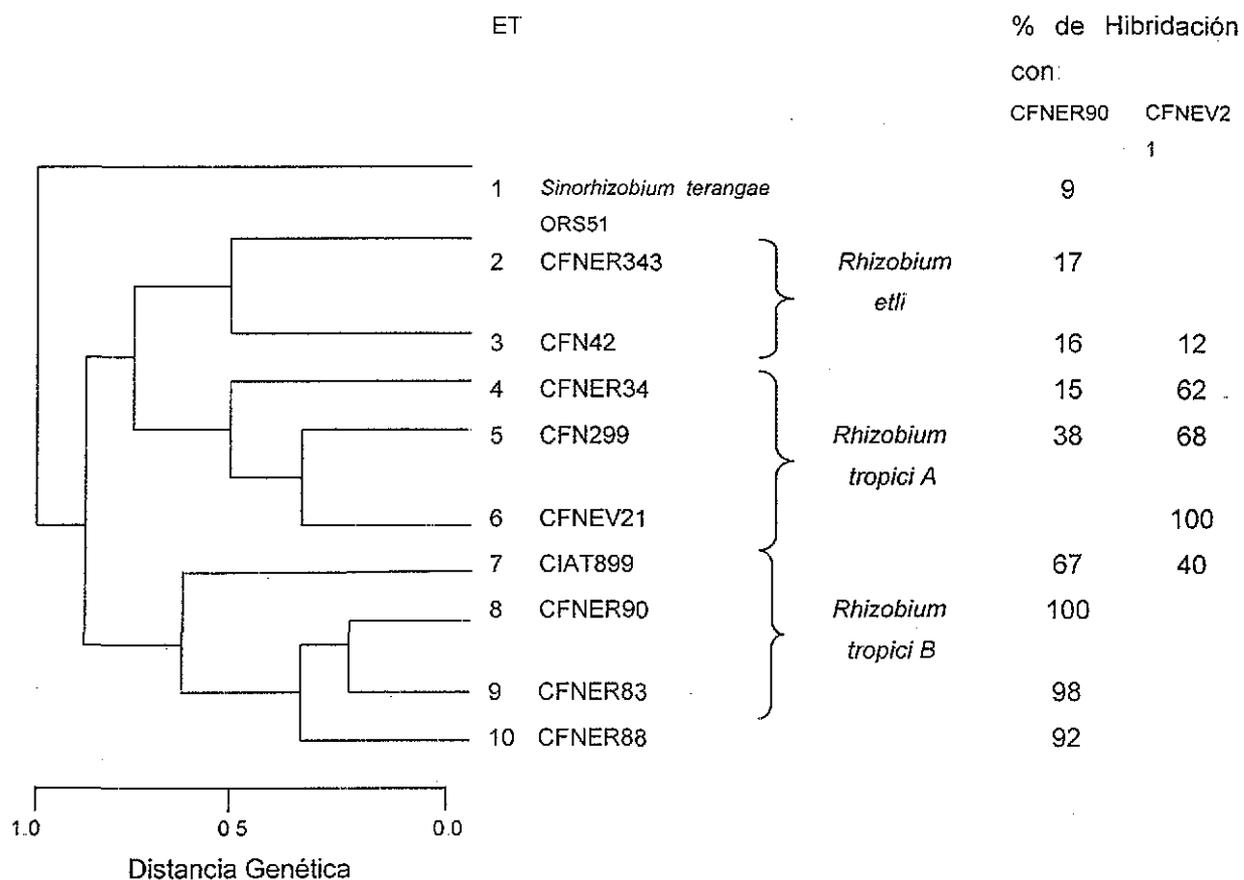


Figura 4.- Relaciones de cepas aisladas de *Gliricidia sepium* y cepas de referencia.

5.2. COMPORTAMIENTO DE DOS ECOTIPOS DE *Gliricidia sepium* EN LA FASE DE ESTABLECIMIENTO Y DE SU NODULACIÓN NATURAL EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

5.2.1. Emergencia.

El inicio de la emergencia se observó a los cinco días después de la siembra y la apertura del cotiledón se observó a los siete días, el porcentaje de emergencia a los 15 días fue de 40.62 y 77.50 para el ecotipo de Morelos y Colima respectivamente (Cuadro 5).

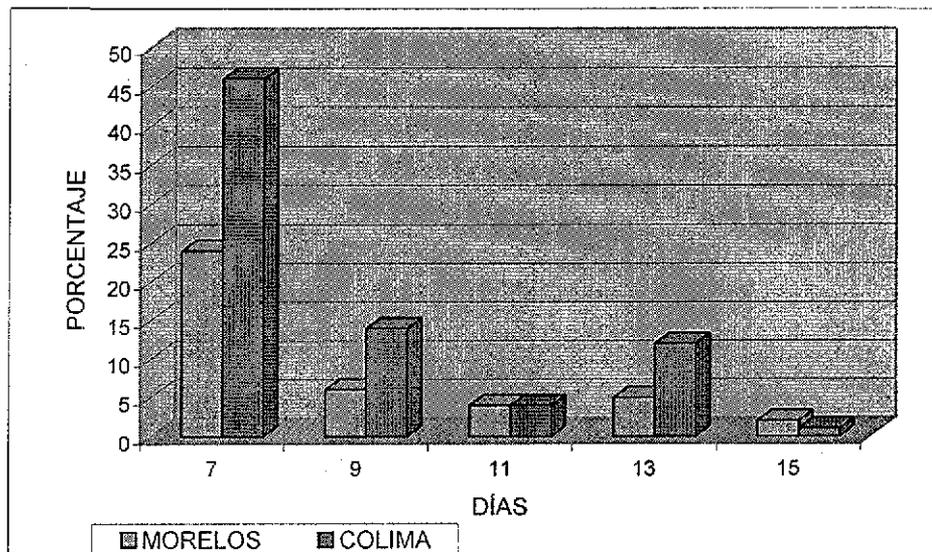
La máxima emergencia se observó a los siete días después de la siembra y posteriormente los incrementos fueron mínimos. A los nueve días había emergido el 73% y el 77% del total de la planta emergida de los ecotipos de Morelos y Colima respectivamente (Gráfica 1).

Cuadro 5.- Número de plántulas y porcentaje de emergencia de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* en suelo de Santa Rosa y en condiciones de invernadero.

Ecotipo	Días									
	7		9		11		13		15	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
MORELOS	38	23.75	48	30.00	54	33.75	62	38.75	65	40.62
COLIMA	73	45.62	96	60.00	103	64.37	123	76.87	124	77.50

Las diferencias observadas entre los dos ecotipos posiblemente son debidas a sus características genéticas como lo menciona Mondragón (1999) que encontró diferencias en el porcentaje de emergencia de ocho ecotipos de *G. sepium* y entre ellos el ecotipo de Colima fue el de mayor porcentaje y velocidad de emergencia. Ambos ecotipos iniciaron la emergencia a los cinco días pero el de Colima presentó mayores porcentajes de emergencia durante los siete días siguientes; sin embargo ninguno de los dos alcanzó un 100 % de emergencia. Harrington (1972) y Palma

(1999) mencionaron que *G. sepium* tiene tasas de germinación del 90 al 100 %. En este trabajo el máximo alcanzado fue de 77 % lo que coincide con Mondragón (1999) que comparando ocho ecotipos diferentes en condiciones de invernadero, en ninguno observó tasas de emergencia superiores al 71 %.

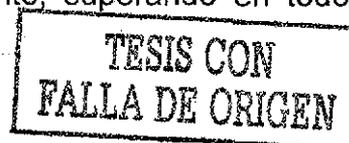


Gráfica 1.- Porcentaje de emergencia de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* en condiciones de invernadero.

5.2.2.- Comparación de la nodulación y desarrollo de la planta entre dos ecotipos de *Gliricidia sepium*.

El comportamiento entre los dos ecotipos fue estadísticamente igual en plantas de 20 y 40 días de edad, en todas las variables. A los 20 días no se observaron nódulos en ninguno de los ecotipos (Cuadros 6 y 7).

En plantas de 60 días de edad se observaron diferencias estadísticas entre los ecotipos en las variables de longitud de tallo, peso seco de tallo, inserción de la primera hoja, peso fresco de hojas, longitud de raíz, peso fresco de raíz, peso seco de raíz, número de nódulos y velocidad de crecimiento, superando en todos los



casos el ecotipo de Colima al de Morelos, similar comportamiento se observó en plantas de 80 días de edad, pero además se encontró diferencia estadística en el peso fresco del tallo y el peso seco de las hojas con mejor comportamiento.

El efecto de la fijación de nitrógeno puede observarse en los parámetros de crecimiento de la planta como son las medidas de longitud, de peso y la producción de materia seca.

Se observó una gran variación dentro de cada ecotipo en el número e nódulos por planta y el ecotipo de Colima presentó mayor nodulación y más plantas noduladas que el de Morelos. La nodulación en condiciones de invernadero se observó desde los 40 días, las plantas del ecotipo de Morelos tuvieron de 2 a 9 nódulos por planta y el de Colima varió de 1 a 12 nódulos sin diferencia estadística entre los ecotipos. A los 60 días en el ecotipo de Morelos se observaron de 5 a 10 nódulos por planta y en el de Colima de 1 a 17. A los 80 días el ecotipo de Colima fue estadísticamente superior al de Morelos observándose que el de Morelos presentó de 1 a 12 nódulos por planta y el de Colima de 2 a 29. El promedio de número de nódulos por planta fue superior en el ecotipo de Colima y las diferencias fueron de 36.4, 217.2 y 180.2 % a los 40, 60 y 80 días de crecimiento respectivamente. El ecotipo de Colima presentó un porcentaje de plantas noduladas a los 40 días igual al del ecotipo Morelos, sin embargo a los 60 días el de Colima ya había superado en 25 % y a los 80 días en 31.25 % al ecotipo de Morelos, logrando la totalidad de plantas noduladas en el ecotipo de Colima, lo que coincide con las diferencias estadísticas observadas en la longitud y el peso seco del tallo entre los dos ecotipos.

El desarrollo de vástago se comportó sin variación entre los ecotipos dentro de los primeros 40 días aunque en otros trabajos el comportamiento entre ecotipos ha presentado diferencias desde las etapas iniciales también en condiciones controladas (Mondragón, 1999). Según Palma (1999) el crecimiento de *Gliricidia* en

condiciones de témporal y sin fertilización es de 70.9 ± 2.4 cm en cinco meses, con crecimiento inicial de 0.65 cm/día (en julio) decreciendo hasta 0.11 cm /día (en noviembre) cuando detiene su crecimiento por condiciones de sequía. En este trabajo los incrementos en la velocidad de crecimiento fueron descendentes de 0.25 y 0.27 cm/día al inicio a 0.11 y 0.14 cm/día al final, en el ecotipo de Morelos y Colima respectivamente pero su comportamiento fue estadísticamente igual en ambos ecotipos. A partir de los 60 días se observaron diferencias estadísticas entre los ecotipos en el vástago, siendo notorias la longitud, el peso fresco y el peso seco del tallo que parecen ser efecto de la nodulación ya que sus diferencias coinciden en el tiempo.

El número de hojas es una característica que depende del genotipo y en este trabajo siempre fue igual en los dos ecotipos, no se observaron diferencias estadísticas como en un estudio realizado por Mondragón (1999) en el que comparando ocho ecotipos diferentes no encontró diferencias en el número de hojas. La altura de inserción de la primera hoja se relaciona con la velocidad de crecimiento del tallo por lo que las diferencias coincidieron con las que presentaron los ecotipos en la longitud del tallo.

Una variable en la que se observó un efecto diferencial debido a la nodulación fue el peso fresco y el peso seco de las hojas en las que se observaron diferencias a los 60 y 80 días respectivamente siendo el ecotipo de Colima superior al de Morelos. En el peso fresco de las hojas el ecotipo de Colima superó en 55.5 y 50.35 % y en el peso seco en 68.5 y 64.1 % al de Morelos a los 60 y 80 días respectivamente. El peso seco y fresco de las hojas tiene una relación directamente proporcional a la cantidad de nitrógeno que absorbe la planta y las diferencias en este trabajo coinciden con la época de mayor nodulación.

La relación hoja/tallo es importante porque nos indica si son mas hojas que tallos lo que esta a disposición del ganado y en plantas de *Gliricidia sepium* no

depende de la radiación solar, de la precipitación ni de la altura de corte, Depende de la edad y del ecotipo de la planta y por lo tanto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) que cambia con la edad de la planta y esto tiene un efecto importante en plantas de más de 2 años de edad (Palma y col., 1997). En este trabajo no se observaron diferencias entre los ecotipos.

El crecimiento de la raíz depende de la concentración de nutrientes en el suelo así como de la disponibilidad de agua, en este trabajo la humedad se mantuvo en cantidades suficientes para el buen desarrollo de la planta, por lo que las diferencias observadas se deben a la mayor velocidad de crecimiento del ecotipo de Colima. El rápido desarrollo de la raíz del ecotipo de Colima podría promover una mayor y más rápida nodulación lo que se refleja en un mayor desarrollo del vástago con respecto al ecotipo de Morelos (Cuadro 7).

Los resultados muestran que en todos los casos en que se observaron diferencias estadísticas en el número de nódulos también se observaron diferencias en las variables de longitud, peso fresco y seco del tallo, peso fresco y seco de las hojas y en la velocidad de crecimiento. Los indicadores de crecimiento fueron superiores en los casos en que la nodulación fue más abundante y en todos los casos el ecotipo de Colima superó al de Morelos. *Gliricidia* es una planta que generalmente crece en suelos de baja fertilidad con poca disponibilidad de N por lo que su desarrollo inicial depende de su capacidad de fijar nitrógeno en las fases tempranas de su crecimiento. El mayor número de nódulos representa una mayor disponibilidad de nitrógeno para el crecimiento de la planta (Whiteman y col. 1986) lo que se observa principalmente en el desarrollo de la biomasa es decir en la materia seca de hojas y tallos principalmente lo que sugiere que el ecotipo de Colima al tener una mayor capacidad de nodulación propicia una mayor productividad.

Cuadro 6.- Desarrollo del vástago de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* crecida en suelo de Santa Rosa durante los primeros 80 días de edad en condiciones de invernadero.

ECOTIPO	DÍAS			
	20	40	60	80
LONGITUD DE TALLO (cm)				
MORELOS	5.16 ± 0.94 a	7.13 ± 1.19 a	8.34 ± 1.26 b	9.41 ± 1.65 b
COLIMA	5.52 ± 0.85 a	7.16 ± 1.85 a	10.18 ± 1.94 a	11.93 ± 1.47 a
DIAMETRO BASAL (cm)				
MORELOS	0.28 ± 0.03 a	0.32 ± 0.04 a	0.34 ± 0.04 a	0.37 ± 0.03 a
COLIMA	0.30 ± 0.02 a	0.33 ± 0.04 a	0.37 ± 0.04 a	0.38 ± 0.04 a
PESO FRESCO DE TALLO (gr)				
MORELOS	0.73 ± 0.20 a	0.70 ± 0.27 a	0.48 ± 0.18 a	0.68 ± 0.18 b
COLIMA	0.80 ± 0.14 a	0.68 ± 0.31 a	0.62 ± 0.23 a	1.04 ± 0.29 a
PESO SECO DE TALLO (gr)				
MORELOS	75.62 ± 0.03 a	62.50 ± 23.80 a	73.12 ± 22.43 b	118.12 ± 32.70 b
COLIMA	31.48 ± 0.20 a	71.78 ± 27.38 a	121.87 ± 46.26 a	183.5 ± 56.55 a
NUMERO DE HOJAS				
MORELOS	3.81 ± 0.98 a	6.81 ± 1.04 a	8.31 ± 1.53 a	8.75 ± 1.39 a
COLIMA	4.43 ± 0.88 a	6.18 ± 1.04 a	8.06 ± 1.61 a	8.93 ± 1.91 a
INSERCIÓN DE LA PRIMERA HOJA (cm)				
MORELOS	4.06 ± 0.75 a	4.80 ± 1.00 a	4.47 ± 0.75 b	4.73 ± 0.95 b
COLIMA	4.57 ± 0.79 a	4.58 ± 1.24 a	5.66 ± 0.85 a	6.35 ± 1.93 a
PESO FRESCO HOJAS (gr)				
MORELOS	0.19 ± 0.09 a	0.70 ± 0.18 a	1.11 ± 0.40 b	1.43 ± 0.59 b
COLIMA	0.23 ± 0.08 a	0.81 ± 0.37 a	2.00 ± 0.86 a	2.84 ± 1.33 a
PESO SECO DE HOJAS (mg)				
MORELOS	27.50 ± 0.01 a	145.62 ± 27.56 a	185.00 ± 70.43 a	288.75 ± 97.22 b
COLIMA	41.25 ± 0.02 a	154.37 ± 71.36 a	270.00 ± 133.9 a	450.00 ± 207.60 a
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (cm/día)				
MORELOS	0.25 ± 0.02 a	0.18 ± 0.02 a	0.14 ± 0.01 b	0.11 ± 0.01 b
COLIMA	0.27 ± 0.01 a	0.18 ± 0.01 a	0.17 ± 0.01 a	0.14 ± 0.01 a
RELACION HOJA - TALLO				
MORELOS	0.27 ± 0.03 a	1.03 ± 0.27 a	2.32 ± 0.28 a	2.09 ± 0.30 a
COLIMA	0.28 ± 0.07 a	1.22 ± 0.29 a	4.14 ± 3.01 a	2.73 ± 0.31 a
En las columnas letras iguales son iguales estadísticamente (P < 0.05).				

Cuadro 7.- Desarrollo de la raíz y nodulación natural de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* crecida en suelo de Santa Rosa durante los primeros 80 días de edad en condiciones de invernadero.

ECOTIPO	DÍAS			
	20	40	60	80
LONGITUD DE RAÍZ (cm)				
MORELOS	5.89 ± 3.17 a	13.49 ± 2.42 a	18.04 ± 6.28 b	21.56 ± 5.29 b
COLIMA	5.92 ± 2.71 a	12.93 ± 2.84 a	20.65 ± 6.43 a	27.06 ± 9.23 a
PESO FRESCO DE RAÍZ (gr)				
MORELOS	0.17 ± 0.11 a	0.42 ± 0.20 a	0.38 ± 0.20 b	0.46 ± 0.17 b
COLIMA	0.12 ± 0.06 a	0.40 ± 0.26 a	0.94 ± 0.44 a	0.84 ± 0.60 a
PESO SECO DE RAÍZ (mg)				
MORELOS	20.00 ± 0.01a	56.25 ± 27.29 a	60.62 ± 33.16 b	121.25 ± 47.03 b
COLIMA	23.70 ± 0.01a	46.87 ± 32.56 a	117.50 ± 52.47 a	183.12 ± 100.70 a
NÚMERO DE NÓDULOS				
MORELOS	0.00 ± 0.00 a	1.37 ± 1.25 a	3.19 ± 1.34 b	3.19 ± 1.65 b
COLIMA	0.00 ± 0.00 a	1.87 ± 1.25 a	10.12 ± 4.67 a	8.94 ± 2.51 a
PORCENTAJE DE PLANTAS CON NÓDULOS				
MORELOS	0.00	31.25	68.75	68.75
COLIMA	0.00	37.50	93.75	100.00

En las columnas letras iguales son iguales estadísticamente (P < 0.05).

5.2.3.- Comparación de la nodulación y desarrollo de la planta dentro de cada ecotipo.

En la observación de cada ecotipo dentro de los periodos de muestreo se observan diferencias estadísticas en algunas variables. A los 20 días no se observó nodulación en ninguno de los ecotipos (Cuadro 8 y 9).

En el ecotipo de Morelos, no se observaron diferencias estadísticas en el número de nódulos en los muestreos a los 40, 60 y 80 días. Las plantas que presentaron nódulos superaron estadísticamente a las que no los presentaron en los incrementos del peso seco de las hojas y la relación hoja/tallo.

En las variables de longitud de tallo, diámetro basal, peso fresco y seco del tallo, número de hojas, inserción de la primera hoja, longitud de la raíz, peso fresco de la raíz y velocidad de crecimiento los incrementos en el tiempo fueron decrecientes, cuando se observaron mayor cantidad de nódulos los incrementos

fueron menores. En las variables como peso fresco y seco del tallo no hay relación en el comportamiento de los incrementos ya que suben y bajan sin mostrar tendencias. En el peso fresco de las hojas no se observaron diferencias significativas.

Los incrementos marcados con cero indican que el promedio del peso fresco de las plantas de 40 días fue igual al de las plantas de 60 días, lo mismo que para el peso seco en el periodo de 20 a 40 días.

En el ecotipo Colima, no hubo diferencias en el número de nódulos en los incrementos de los muestreos de 20 y 40 días pero si las hubo con los otros dos. El muestreo de 40 días presenta diferencias con los de 60 y 80 días. Los de 60 y 80 días fueron iguales entre sí (Cuadro 9).

Las diferencias estadísticas en el número de nódulos coincidieron con las diferencias de los incrementos del peso fresco del tallo, el peso fresco y seco de las hojas, la relación hoja/tallo y el peso seco de la raíz. Los incrementos del diámetro basal, número de hojas, inserción de la primera hoja y velocidad de crecimiento se comportaron de manera inversa al número de nódulos. En los incrementos en la longitud del tallo y peso seco de la raíz no se observan tendencias y en los incrementos del peso seco del tallo y la longitud de la raíz no se observaron diferencias significativas.

El crecimiento del vástago de ambos ecotipos de *G. sepium* es mayor en los primeros 20 días que en periodos posteriores. Se observaron diferencias estadísticas en el número de nódulos en el ecotipo de Colima para cada periodo. El crecimiento del tallo tanto en longitud como en diámetro mantiene una constante durante todo el periodo el experimento, no así en el peso fresco y en el peso seco del tallo donde se observa un decremento después de los 20 días y posteriormente un incremento muy rápido. El número de hojas tiende a decrecer mientras que el peso de las mismas no tiene un patrón definido.

Cuadro 8.- Análisis de los incrementos de las variables de desarrollo del ecotipo "MORELOS" de *Gliricidia sepium* crecida en suelo de Santa Rosa y en condiciones de invernadero.

DIAS	Número de nódulos	Longitud de tallo (cm)	Diámetro basal (cm)	Peso fresco de tallo (mg)	Peso seco de tallo (mg)
20	0.00 ± 0.00 b	5.16 ± 0.46 a	0.29 ± 0.01 a	728.00 ± 45.70 a	75.60 ± 9.44 a
40	1.38 ± 1.25 ab	1.98 ± 0.80 b	0.03 ± 0.01 b	65.00 ± 123.00 c	0.00 ± 0.00 c
60	3.19 ± 1.34 a	1.21 ± 0.72 b	0.03 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 c	11.40 ± 9.62 c
80	3.19 ± 1.65 a	1.08 ± 1.07 b	0.03 ± 0.02 b	208.00 ± 145.00 b	44.30 ± 11.50 b
DIAS	Número de hojas	Inserción 1° hoja (cm)	Peso fresco de hojas (mg)	Peso seco de hojas (mg)	Relación Hoja/Tallo
20	3.82 ± 0.39 a	4.06 ± 0.31 a	198.00 ± 29.10 a	27.50 ± 6.12 b	0.26 ± 0.03 c
40	2.99 ± 0.80 a	0.74 ± 0.42 b	504.00 ± 116.00 a	146.00 ± 9.44 b	1.03 ± 0.27 b
60	1.50 ± 1.34 b	0.00 ± 0.00 c	416.00 ± 216.00 a	185.00 ± 29.40 a	2.32 ± 0.28 a
80	0.94 ± 0.72 b	0.26 ± 0.32 c	411.00 ± 328.00 a	289.00 ± 47.30 a	2.09 ± 0.30 a
DIAS	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco de raíz (mg)	Peso seco de raíz (mg)	Velocidad de crecimiento cm/día	Porcentaje de plantas con nódulos
20	5.89 ± 0.74 ab	176.00 ± 38.80 ab	20.00 ± 3.54 bc	0.25 ± 0.02 a	0.00
40	7.60 ± 0.60 a	251.00 ± 126.00 a	36.30 ± 4.33 b	0.18 ± 0.02 b	31.25
60	4.55 ± 1.40 b	3.75 ± 7.50 c	7.50 ± 13.40c	0.14 ± 0.01 c	68.75
80	3.52 ± 2.79 b	112.00 ± 94.60 bc	60.60 ± 23.60 a	0.11 ± 0.01 c	68.75

En las columnas letras iguales son iguales estadísticamente ($P < 0.05$).

La raíz crece más rápido que el tallo en ambos ecotipos y luego reduce la velocidad de crecimiento. La velocidad de crecimiento del vástago tiende a decrecer mientras que la raíz crece significativamente lo que sugiere que el vástago y la raíz de la *G. sepium* crecen alternadamente en la etapa de establecimiento de la planta. En el ecotipo Colima los incrementos del peso seco de la raíz fueron significativamente mayores que en el de Morelos lo que posiblemente provocó una mayor nodulación. La mayor cantidad de nódulos pudo incrementar el peso fresco y seco de las hojas provocando también un efecto en la relación hoja/tallo. Parece ser que el número de nódulos determina un mayor crecimiento del vástago lo que sugiere que *G. sepium* tiene capacidad de respuesta a la inoculación con cepas seleccionadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mondragón (1999) observó una gran variación en el comportamiento de las variables de crecimiento de ocho ecotipos durante 165 días, notando diferencias estadísticas en las primeras etapas mismas que desaparecieron al final del trabajo.

Cuadro 9.- Análisis de los incrementos de las variables de desarrollo del ecotipo "COLIMA" de *Gliricidia sepium* crecida en suelo de Santa Rosa y en condiciones de invernadero.

DIAS	Número de nódulos	Longitud de tallo (cm)	Diámetro basal (cm)	Peso fresco de tallo (mg)	Peso seco de tallo (mg)
20	0.00 ± 0.00 b	5.53 ± 0.31 c	0.31 ± 0.01 b	808.00 ± 63.40 c	31.50 ± 20.40 a
40	1.88 ± 1.25 b	1.63 ± 0.48 a	0.02 ± 0.02 a	0.00 ± 0.00 a	40.30 ± 30.20 a
60	10.10 ± 4.67 a	3.03 ± 0.85 b	0.04 ± 0.03 a	80.00 ± 113.00 a	50.00 ± 9.13 a
80	8.94 ± 2.51 a	1.76 ± 1.09 a	0.02 ± 0.04 a	418.00 ± 273.00 b	61.60 ± 40.00 a
DIAS	Número de hojas	Inserción 1° hoja (cm)	Peso fresco de hojas (mg)	Peso seco de hojas (mg)	Relación Hoja/Tallo
20	4.44 ± 0.31 b	4.57 ± 0.22 b	236.00 ± 56.20 a	41.30 ± 6.29 a	0.28 ± 0.07 a
40	1.75 ± 0.79 a	0.24 ± 0.29 a	575.00 ± 136.00 ab	154.00 ± 35.80 ab	1.22 ± 0.29 ab
60	1.88 ± 0.78 a	1.09 ± 0.72 a	1190.00 ± 397.00 c	270.00 ± 62.90 ab	4.14 ± 3.01 c
80	0.88 ± 0.63 a	0.60 ± 0.84 a	839.00 ± 518.00 bc	450.00 ± 58.60 b	2.74 ± 0.31 bc
DIAS	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco de raíz (mg)	Peso seco de raíz (mg)	Velocidad de crecimiento cm/día	Porcentaje de plantas con nódulos
20	5.93 ± 1.63 a	123.00 ± 39.20 a	23.80 ± 4.79 a	0.27 ± 0.02 c	0.00
40	7.01 ± 3.02 a	278.00 ± 104.00 a	23.10 ± 16.00 a	0.18 ± 0.01 b	37.50
60	7.73 ± 2.29 a	540.00 ± 292.00 b	70.60 ± 24.40 b	0.17 ± 0.01 b	93.75
80	6.41 ± 3.72 a	33.60 ± 67.30 a	65.62 ± 35.60 b	0.14 ± 0.01 a	100.00

En las columnas letras iguales son iguales estadísticamente ($P < 0.05$).

5.3. EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* INOCULADAS CON CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

De las 25 cepas que se inocularon se observó nodulación con 16 de ellas. Las cepas fueron inoculadas de acuerdo al ecotipo del que fueron aisladas (Cuadro 10). En el ecotipo Morelos se inocularon 12 cepas de las cuales ocho nodularon con una variación de 17 a 62 nódulos por planta y cuatro plantas no nodularon. En el ecotipo

de Colima se inocularon 13 cepas de las cuales ocho nodularon con una variación de 4 a 69 nódulos por planta y cinco cepas no nodularon.

Cuadro 10.- Respuesta de *Gliricidia sepium* a la inoculación con cepas nativas de *Rhizobium* en condiciones de laboratorio.

ECOTIPO	CEPA	LONGITUD DE TALLO	LONGITUD DE RAÍZ	HOJA	PESO FRESCO			PESO SECO			NÓDULOS	
		60 días	cm	No.	gr	gr	gr	gr	gr	gr	No.	PESO FRESCO gr
MOR+	280	24.0	16.0	7	1.04	1.70	0.76	0.12	0.23	0.05	19	0.10
MOR+	280-A	27.2	22.0	9	0.83	1.12	0.68	0.09	0.15	0.05	23	0.06
MOR+	281-A	24.6	18.2	10	1.20	2.34	1.05	0.17	0.32	0.08	35	0.14
MOR+	283	26.6	17.1	11	0.96	1.91	1.18	0.13	0.24	0.08	32	0.11
MOR+	284	23.2	15.1	9	0.87	1.09	0.90	0.11	0.17	0.06	62	0.12
MOR+	272	25.0	14.0	9	1.34	2.11	1.01	0.25	0.31	0.09	36	0.10
MOR+	272-A	21.6	19.2	7	0.73	1.04	0.66	0.08	0.13	0.06	17	0.03
MOR+	287-A	25.4	13.1	10	0.91	1.11	0.62	0.09	0.13	0.04	17	0.05
MOR-	280-B	22.2	16.9	7	0.77	0.89	0.75	0.08	0.11	0.06	0	0.00
MOR-	281	24.6	16.4	9	1.02	1.63	1.19	0.16	0.21	0.10	0	0.00
MOR-	282	23.2	14.5	6	0.92	1.11	1.14	0.21	0.16	0.11	0	0.00
MOR-	273	24.3	14.1	6	0.85	1.03	0.90	0.10	0.14	0.06	0	0.00
COL+	268	24.1	17.1	6	0.83	1.21	0.50	0.08	0.14	0.03	15	0.05
COL+	269	25.9	19.1	8	1.23	2.25	1.12	0.16	0.27	0.08	14	0.11
COL+	271	25.1	12.4	11	1.02	1.89	0.82	0.13	0.24	0.06	44	0.13
COL+	264	21.0	14.2	7	0.65	1.14	0.48	0.07	0.14	0.04	7	0.21
COL+	265	29.6	16.0	9	1.33	1.96	0.97	0.15	0.27	0.06	28	0.12
COL+	266	25.8	10.6	6	1.16	1.60	0.99	0.13	0.21	0.05	30	0.08
COL+	279	28.6	11.0	8	1.10	2.29	0.86	0.13	0.29	0.06	69	0.17
COL+	278	20.5	12.7	9	0.61	0.78	0.58	0.08	0.11	0.05	4	0.02
COL-	267	25.4	12.6	6	0.88	1.14	0.51	0.10	0.15	0.04	0	0.00
COL-	285	19.1	13.9	7	0.54	0.94	0.84	0.08	0.13	0.07	0	0.00
COL-	275-A	22.0	19.7	11	0.96	1.66	0.85	0.19	0.21	0.07	0	0.00
COL-	275	21.0	15.2	5	0.58	0.80	0.54	0.09	0.11	0.05	0	0.00
COL-	278-A	23.7	16.9	7	0.83	1.21	0.68	0.10	0.14	0.05	0	0.00

Con los resultados se formaron cuatro grupos y en el análisis estadístico (Cuadro No. 11) se observaron diferencias significativas en las variables de longitud de tallo, peso seco de la raíz, número de nódulos y peso fresco de los nódulos.

En la longitud de tallo los grupos que presentaron nódulos superaron estadísticamente a los que no nodularon en ambos ecotipos siendo el de COL- el de menor crecimiento. En el peso seco de la raíz los grupos MOR- (Morelos sin nódulos) y MOR+ (Morelos con nódulos) fueron iguales entre sí y superaron a los dos de Colima que también fueron iguales entre sí.

Los ecotipos que nodularon fueron superiores estadísticamente a los que no nodularon tanto en número de nódulos como en el peso fresco de los mismos. En el resto de las variables no se observaron diferencias significativas.

Los resultados muestran que en condiciones controladas el comportamiento de ambos ecotipos es estadísticamente igual (Cuadro 11) debido principalmente a que la variación de *G. sepium* es influenciada en gran medida por las condiciones ambientales y en condiciones de laboratorio no se manifiestan como diferencias aunque se observa una tendencia de las plantas con nódulos sobre las que no los presentan (Grafica 2), pero comparando las plantas en condiciones de invernadero con las de laboratorio existe una gran diferencia (cuadro 12).

Cuadro 11. Efecto de la nodulación en diferentes variables de crecimiento de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* inoculados con *Rhizobium* nativo en condiciones de laboratorio.

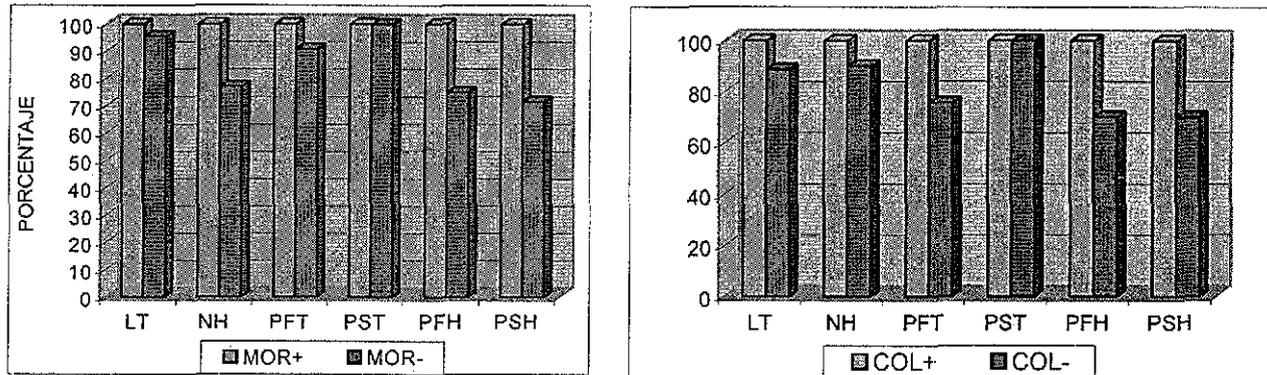
ECOTIPO	Longitud de tallo cm	Longitud de raíz cm	Número de hojas	Peso fresco de tallo gr	Peso fresco de hojas gr	Peso fresco de raíz gr
MOR +	24.70 ± 1.8 a	16.83 ± 2.9 a	9.00 ± 1.4 a	0.98 ± 0.2 a	1.55 ± 0.5 a	0.85 ± 0.2 a
MOR -	23.57 ± 1.0 ab	15.47 ± 1.3 a	7.00 ± 1.4 a	0.89 ± 0.1 a	1.16 ± 0.3 a	0.99 ± 0.2 a
COL +	25.07 ± 3.2 a	14.13 ± 3.0 a	8.00 ± 1.6 a	0.99 ± 0.2 a	1.64 ± 0.5 a	0.79 ± 0.2 a
COL -	22.24 ± 2.4 b	15.66 ± 2.7 a	7.20 ± 2.2 a	0.75 ± 0.1 a	1.15 ± 0.3 a	0.68 ± 0.1 a

ECOTIPO	Peso seco de tallo gr	Peso seco de hojas gr	Peso seco de raíz gr	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos gr
MOR +	0.13 ± 0.05 a	0.21 ± 0.07 a	0.06 ± 0.01 ab	30.12 ± 15.1 a	0.08 ± 0.03 a
MOR -	0.13 ± 0.05 a	0.15 ± 0.04 a	0.08 ± 0.02 a	0.00 ± 0.0 b	0.00 ± 0.00 b
COL +	0.11 ± 0.03 a	0.20 ± 0.07 a	0.05 ± 0.01 b	26.37 ± 21.7 a	0.11 ± 0.06 a
COL -	0.11 ± 0.04 a	0.14 ± 0.03 a	0.05 ± 0.01 b	0.00 ± 0.0 b	0.00 ± 0.00 b

MOR+ = ecotipo Morelos con nódulos; MOR- = ecotipo Morelos sin nódulos; COL+ = ecotipo Colima con nódulos; COL- = ecotipo Colima sin nódulos. En las columnas letras iguales son iguales estadísticamente (P < 0.05).

En el laboratorio, el promedio de número de nódulos por planta es muy superior al de las plantas que crecieron en suelo y no se observó diferencia entre los ecotipos. Las cepas fueron aisladas del mismo ecotipo en el que se inocularon, sin

embargo algunas de las cepas (30-35 %) no presentaron nodulación sugiriendo cierto grado de especificidad dentro del ecotipo.



Gráfica 2.- Diferencia entre variables de crecimiento en plantas con y sin nodulación de dos ecotipos de *G. sepium* en condiciones de laboratorio.

(MOR+ = ecotipo Morelos con nódulos; MOR- = ecotipo Morelos sin nódulos; COL+ = ecotipo Colima con nódulos; COL- = ecotipo Colima sin nódulos)

Cuando las plantas se colocaron en condiciones de esterilidad (en laboratorio) y el inóculo fue una mezcla de cepas, el 100 % de las plantas presentó nódulos lo que indica que dentro de la mezcla, cada planta pudo escoger alguna de las cepas para nodular.

Los parámetros de crecimiento a los 60 días no marcaron las diferencias que se habían observado en plantas que crecieron en suelo lo que nos indica que esas diferencias son atribuibles a la respuesta al medio ambiente. En este experimento, el medio en el que se encontraban las plantas carecía totalmente de nitrógeno y la solución nutritiva que se aplicó tampoco lo contenía (Faraheus, 1957). El número de nódulos por planta fue muy superior al que se observó en las plantas crecidas en suelo por lo que su efecto en los parámetros de crecimiento también fueron muy superiores.

Cuadro 12.- Comparación de las variables de crecimiento de *G. sepium* en condiciones de suelo y de laboratorio en plantas de 60 días.

VARIABLE	ECOTIPO MORELOS		ECOTIPO COLIMA	
	SUELO EN INVERNADERO	SUSTRATO EN LABORATORIO	SUELO EN INVERNADERO	SUSTRATO EN LABORATORIO
Longitud de tallo (cm)	8.34	24.70	10.18	25.07
Peso fresco de tallo (mg)	480.00	980.00	620.00	990.00
Peso seco de tallo (mg)	73.12	130.00	121.87	110.00
Peso fresco de hojas (mg)	1110.00	1550.00	2000.00	1640.00
Peso seco de hojas (mg)	185.00	210.00	270.00	200.00
Longitud de raíz (cm)	18.04	16.83	20.65	14.13
Peso fresco de raíz (gr)	0.38	0.85	0.94	0.79
Peso seco de raíz (mg)	60.62	0.06	117.50	0.05
Numero de nódulos	3.19	30.12	10.12	26.37

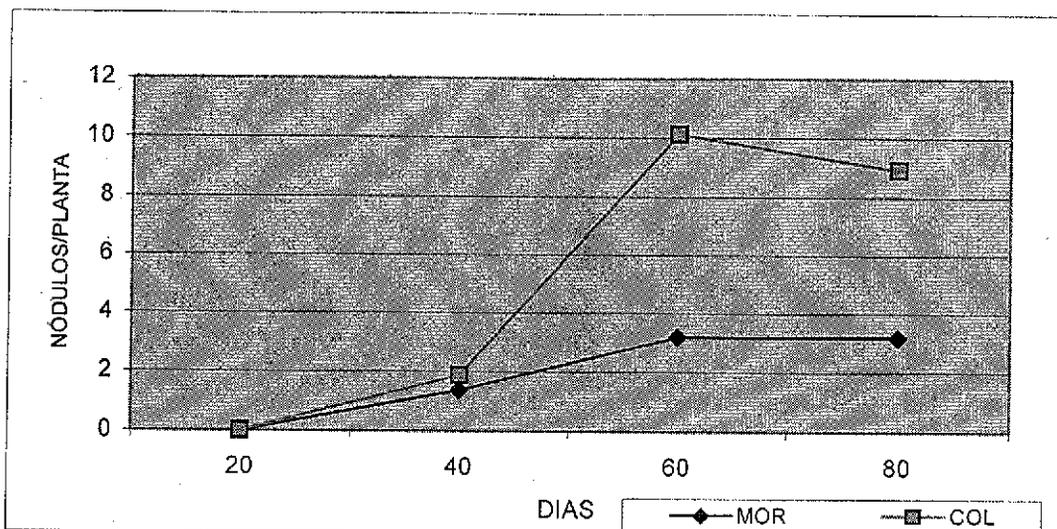
El efecto de mayor crecimiento en las plantas de ambos ecotipos es atribuible a la gran cantidad de nódulos observados. Esta cantidad se presentó principalmente debido a que, al no haber N en el medio, el árbol induce sustancias para que la bacteria forme los nódulos para abastecer las necesidades de N de la planta, lo que coincide con Sprent (2001) quien dice que la nodulación se presenta como una respuesta a condiciones adversas y que la nodulación depende en mucho más medida de la planta que de la bacteria. En el caso de las plantas que crecieron en suelo, tomaron el N para su desarrollo inicial del propio suelo por lo que la nodulación aparece cuando el abastecimiento en el suelo empieza a ser insuficiente.

5.4. CINÉTICA DE LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Existe poca información sobre el inicio de la nodulación de plantas jóvenes de *Gliricidia sepium*. García (1997) observó un promedio de 2.4 nódulos por planta a los 100 días después de la siembra y Mondragón (1999) observó promedios de 0.2 y 9.8 nódulos por planta en condiciones de invernadero a los 65 y 165 días respectivamente. En ninguno de los casos se inocularon las plantas. En este trabajo se observaron promedios de 3.19 en el ecotipo de Morelos y de 10.12 en el de Colima, en plantas de 60 días de edad.

En este trabajo la nodulación se observó desde los 40 días de edad en ambos ecotipos crecidos en suelo de Santa Rosa, sin inoculación y en condiciones de invernadero. El porcentaje de plantas con nódulos fue de 31.25, 68.75 y 68.75 en el ecotipo de Morelos y de 37.50, 93.75 y 100.00 en el ecotipo de Colima, a los 40, 60 y 80 días respectivamente. El promedio del número de nódulos por planta fue de 0, 1.37, 3.19 y 3.19 en el ecotipo Morelos y 0, 1.87, 10.12 y 8.94 en el ecotipo Colima, a los 20, 40, 60 y 80 días respectivamente (Grafica 3). El ecotipo Colima presentó mayor nodulación en todos los muestreos tanto en el promedio del número de nódulos por planta como en el porcentaje de plantas con nódulos.

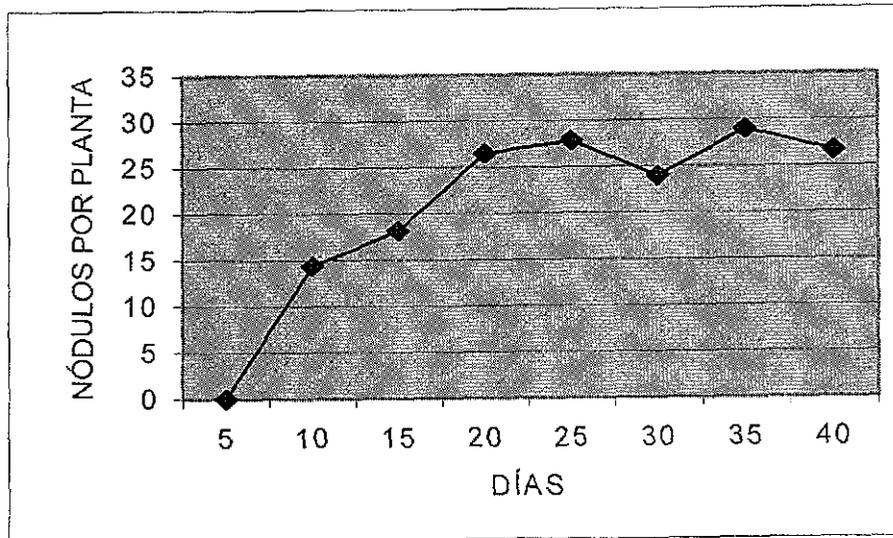
Para definir con precisión el momento de la emergencia de los nódulos, se muestrearon las plantas a partir de los tres días después de la inoculación en condiciones de laboratorio. Los nódulos se observaron desde los ocho días después de la inoculación observando un porcentaje de plantas con nódulos de 33.3, 50.0 y 66.6 a los 8, 9 y 10 días respectivamente, desde ese momento el 100 % de plantas presentó nódulos (Gráficas 4 y 5). El promedio del número de nódulos por planta fue desde 14.33 a los 10 días hasta 29.00 a los 35 días. En otras leguminosas como el frijol y la alfalfa los nódulos aparecen a los 5-7 días en condiciones de laboratorio.



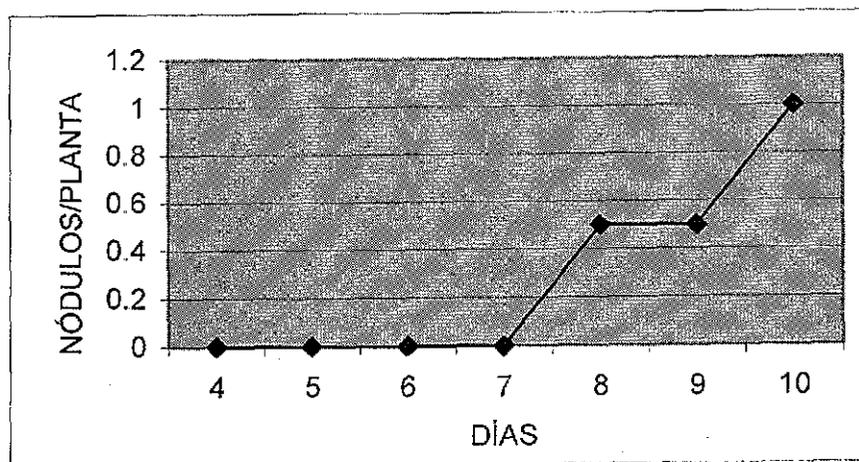
Gráfica 3.- Número de nódulos por planta en el crecimiento de dos ecotipos de *Gliricidia sepium* en condiciones de invernadero (MOR = Morelos; COL = Colima).

Las plantas son las que determinan el inicio de la simbiosis por lo que es importante conocer el comportamiento y las condiciones que permitirán que este proceso se realice exitosamente. El inicio de la nodulación se produce por señales que son enviadas por la planta mediante sustancias químicas principalmente flavonoides (Hirsch, 1999; Sprent, 2001). Estas sustancias inducen a la bacteria a iniciar el proceso, que necesariamente estará influenciado por factores externos (Sprent y Raven, 1992). El inicio de la comunicación se da como resultado del nivel de abastecimiento de nutrientes o de las condiciones de estrés. Diversos autores han estudiado la nodulación más como un proceso bacteriano, pero la falta de información de su comportamiento en la relación simbiótica con los árboles no ha permitido la aplicación exitosa de inoculantes en el campo.

Los resultados nos muestran que en realidad la concentración de N en el medio es un factor determinante para el inicio de la simbiosis. En plantas cultivadas en suelo sin esterilizar los primeros nódulos se observaron a los 40 días de edad de las plantas, en condiciones de vermiculita estéril y con solución nutritiva sin nitrógeno y con inoculación, los primeros nódulos se observaron a los ocho días después de la inoculación.



Grafica 4.- Promedio del número de nódulos de plantas de *Gliricidia sepium* durante los primeros cuarenta días de desarrollo en condiciones de laboratorio.



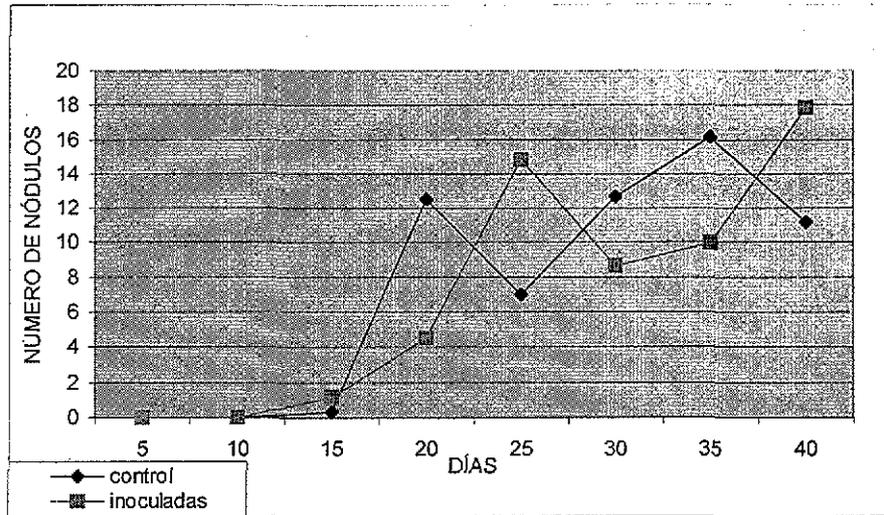
Gráfica 5.- Promedio del número de nódulos por planta en *Gliricidia sepium* durante los primeros 10 días de desarrollo.

5.5. EFECTO DE LA INOCULACION DE *Gliricidia sepium* CON CEPAS NATIVAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

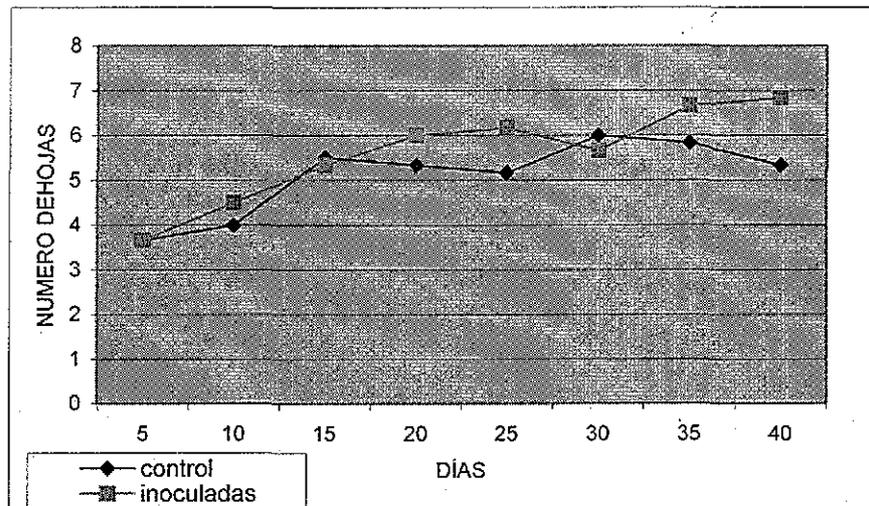
Se comparó el efecto de la inoculación con cepas nativas cuando las plantas se sembraron en suelo de Santa Rosa donde crece en condiciones naturales y donde suponemos que existen cantidades importantes de bacterias que funcionan como inóculo. También se consideró importante comparar plantas sembradas en suelo de Huitzilac donde no se encuentra en condiciones naturales y donde posiblemente nos se encuentren poblaciones suficientes para desarrollar una buena simbiosis con la planta. Otra condición fue la vermiculita inoculada en invernadero comparada con vermiculita estéril inoculada y crecida en laboratorio.

En las plantas que crecieron en suelo de Santa Rosa se observaron diferencias estadísticas en el número de nódulos a los 25 días entre las plantas inoculadas y las control (Gráfica 6), también se observó diferencia a los 25 días en el número de hojas (Gráfica 7) y en el peso de la raíz (Cuadro 13). A los 35 y 40 días se observaron diferencias en el número de hojas pero la cantidad de nódulos fue estadísticamente igual. En todas las otras variables no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas y las plantas control en todo el periodo.

El hecho de no haber encontrado diferencias importantes entre plantas inoculadas y no inoculadas nos indica que efectivamente existen en el suelo de Santa Rosa cantidades suficientes de bacterias y al aplicar inoculante de las mismas cepas no se genera una respuesta diferente a la condición normal.



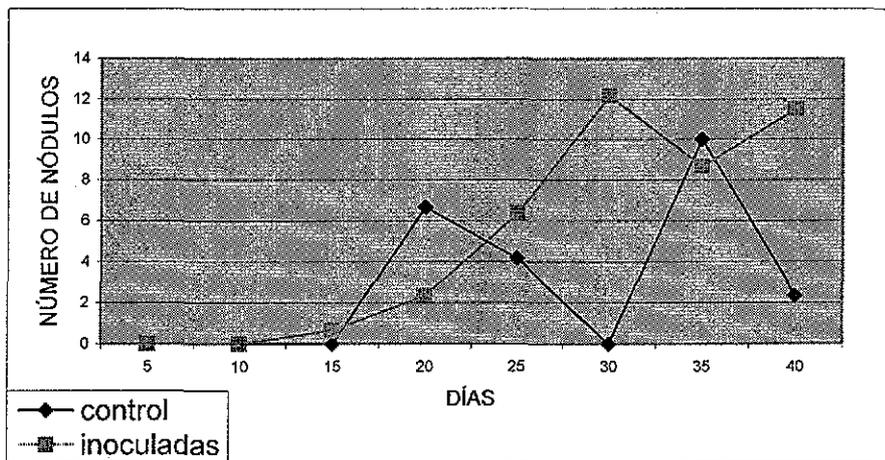
Gráfica 6.- Comparación del número de nódulos entre plantas de *G. sepium* inoculadas y plantas control crecidas en suelo de Santa Rosa.



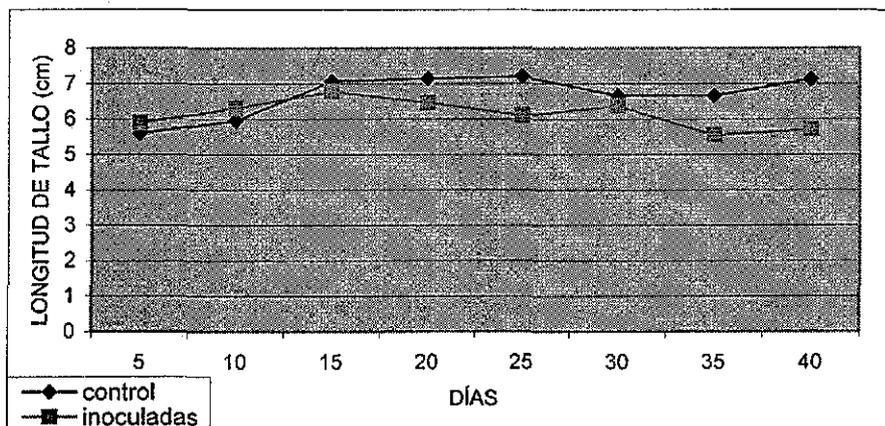
Gráfica 7.- Comparación del número de hojas entre plantas de *G. sepium* inoculadas y plantas control crecidas en suelo de Santa Rosa.

En las plantas que crecieron en el suelo de Huitzilac, se observaron diferencias en el número de nódulos entre las plantas inoculadas y las plantas control a los 30 días (Gráfica 8), esas diferencias coincidieron con las diferencias en el número de hojas, longitud de raíz y peso fresco de raíz. También se observaron

diferencias en la longitud de tallo a los 35 y 40 días (Gráfica 9), en el peso fresco de tallo a los 25 y 35 días, en la longitud de raíz a los 5 días y en el peso fresco de la raíz a los 20 y 25 días. En el suelo de Huitzilac a diferencia del suelo de Santa Rosa se observó respuesta en un mayor número de variables sobre todo después de los 30 días de edad en que la diferencia entre el número de nódulos fue muy superior en las plantas inoculadas.

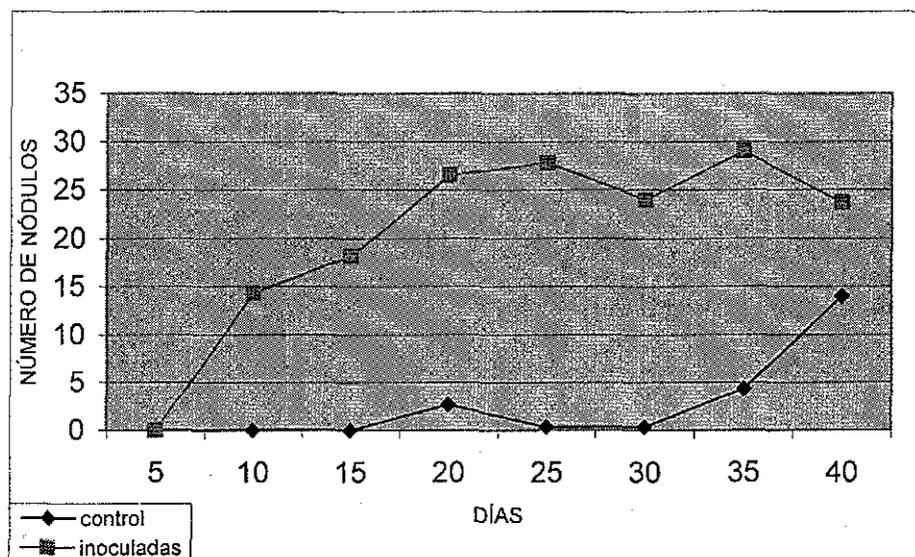


Gráfica 8.- Comparación del número de nódulos entre plantas de *G. sepium* inoculadas y plantas control crecidas en suelo de Huitzilac.

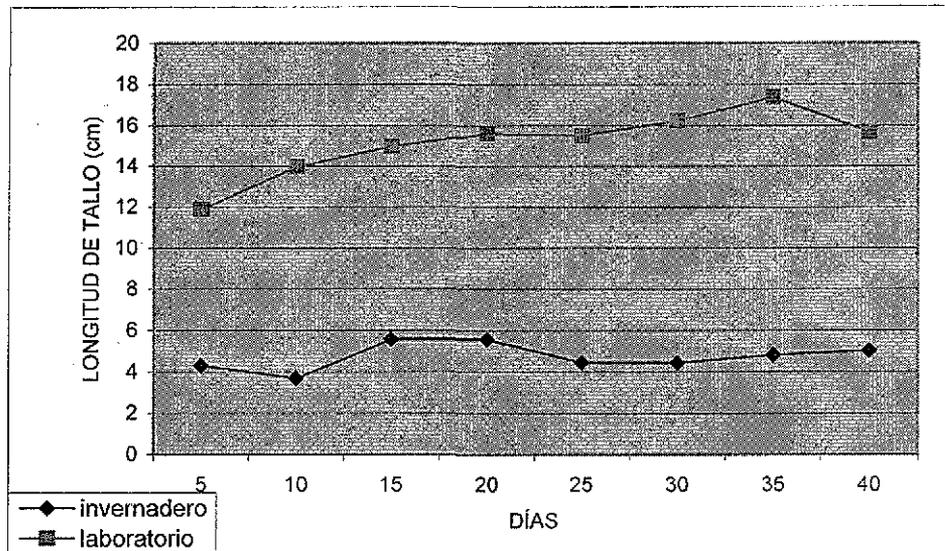


Gráfica 9.- Comparación de la longitud de tallo entre plantas de *G. sepium* inoculadas y plantas control crecidas en suelo de Huitzilac.

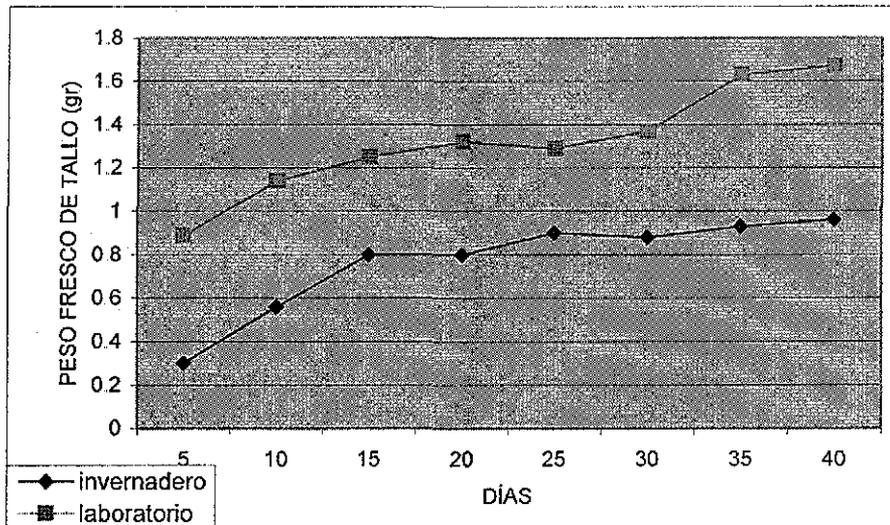
En las plantas crecidas en vermiculita y en dos ambientes de crecimiento se observaron diferencias estadísticas entre las plantas ubicadas en laboratorio e invernadero (ambas inoculadas) en el número de nódulos a los 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días (Gráfica 10), asimismo esas diferencias coincidieron con las diferencias estadísticas en la longitud de tallo en todos los muestreos (Gráfica 11), en el peso fresco de tallo en casi todos los muestreos (Gráfica 12) (excepto a los 5 días), en el número de hojas a los 5, 15 y 25 días (Gráfica 13), en la longitud de raíz a los 5, 10, 20 y 40 días y en el peso fresco de raíz a los 10 días. Las plantas inoculadas fueron superiores a las no inoculadas en todos los casos excepto en la longitud de raíz a los 40 días y en el peso fresco de la raíz a los 10 días.



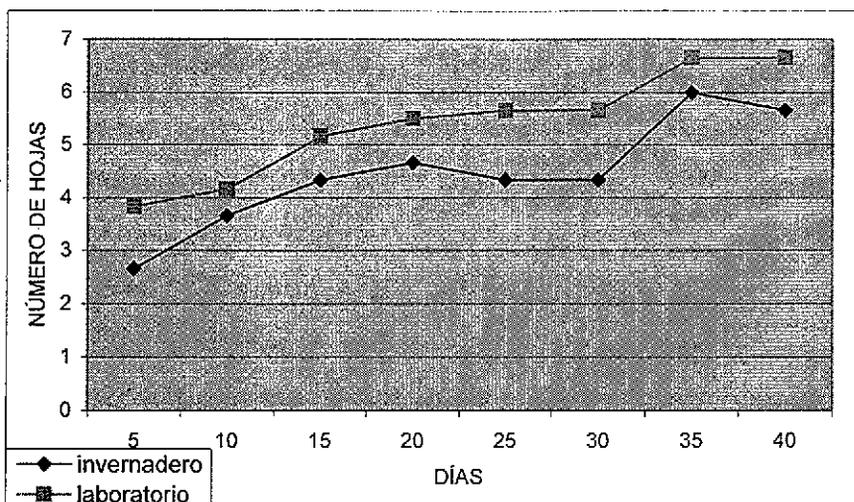
Gráfica 10.- Comparación del número de nódulos entre plantas de *G. sepium* inoculadas crecidas en vermiculita en condiciones de invernadero y de laboratorio.



Gráfica 11.- Comparación de la longitud de tallo entre plantas de *G. sepium* inoculadas crecidas en vermiculita en condiciones de invernadero y de laboratorio.



Gráfica 12.- Comparación del peso fresco del tallo entre plantas de *G. sepium* inoculadas crecidas en vermiculita en condiciones de invernadero y de laboratorio.



Gráfica 13.- Comparación del número de hojas entre plantas de *G. sepium* inoculadas crecidas en vermiculita en condiciones de invernadero y de laboratorio.

Como en el suelo de Santa Rosa existe el inóculo en forma natural, la inoculación muestra una tendencia a incrementar la nodulación (11.16 y 17.85 nódulos / planta en control e inoculadas respectivamente). En el caso del suelo de Huitzilac donde la planta no crece en condiciones naturales, el inóculo específico existe en pequeñas cantidades por lo que la inoculación tuvo un efecto positivo en el número de nódulos (2.33 y 11.50 nódulos por planta en control e inoculadas respectivamente) además de acelerar el inicio de la misma. En conclusión respecto al número de nódulos, se observó buena respuesta a la inoculación en el suelo de Huitzilac y una respuesta más limitada en el suelo de Santa Rosa.

En el resto de las variables no se observaron tendencias claras de ninguno de los tratamientos ya que se presentó mucha variación en cada una de las fechas de muestreo. Es notable que al final del experimento los tratamientos que estaban en suelo superaron ampliamente en el peso fresco de la raíz, a los que estaban en vermiculita. En las plantas crecidas en vermiculita en invernadero, a pesar de que el número de nódulos por planta fue estadísticamente igual a las crecidas en

laboratorio, las plantas fueron superadas por los tratamientos en suelo en cuanto a longitud, peso fresco y seco de tallo y número de hojas. Las plantas en vermiculita en invernadero superaron a los demás en longitud de raíz posiblemente como respuesta a la baja cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Posiblemente las elevadas temperaturas registradas en el invernadero en los conos con vermiculita disminuyeron la fijación de nitrógeno (Gráfica 9). Se ha observado en otros casos que la temperatura óptima para la nodulación es normalmente más alta que para la fijación de nitrógeno (Gibson, 1967) y en los registros de la temperatura del sustrato en el invernadero, los conos que contenían vermiculita tenían 1 °C arriba comparados con los conos que contenían suelo.

Cuadro 13.- Análisis del efecto de la inoculación y las condiciones de cultivo en el desarrollo y la nodulación de plantas de *Gliricidia sepium* durante los primeros 40 días.

	DÍAS							
	NÚMERO DE NÓDULOS							
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.33 ± 0.5 b	12.5 ± 11.9 b	7.00 ± 7.2 c	12.66 ± 1.9 b	16.16 ± 13.7 b	11.16 ± 12.5 bc
T2	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	1.16 ± 0.9 b	4.50 ± 5.2 bc	14.83 ± 6.5 b	8.66 ± 7.9 b	10.00 ± 7.3 bc	17.85 ± 9.2 bc
T3	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.00 ± 0.0 b	6.66 ± 10.3 bc	4.16 ± 4.5 cd	0.00 ± 0.0 c	10.00 ± 7.9 bc	2.33 ± 1.8 c
T4	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.66 ± 0.8 b	2.33 ± 3.6 c	6.33 ± 2.8 cd	12.16 ± 5.3 b	8.66 ± 5.5 bc	11.50 ± 10.3 bc
T5	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.00 ± 0.0 b	2.66 ± 4.1 c	0.33 ± 0.5 d	0.33 ± 0.5 c	4.33 ± 5.9 c	14.00 ± 10.8 ab
T6	0.00 ± 0.0 a	14.33 ± 7.2 a	18.16 ± 6.3 a	26.50 ± 5.6 a	27.83 ± 6.5 a	24.00 ± 6.6 a	29.00 ± 12.3 a	23.66 ± 9.9 a
	LONGITUD DE TALLO (cm)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	7.7 ± 0.5 b	6.16 ± 0.7 c	7.71 ± 0.3 b	7.55 ± 1.2 b	7.70 ± 1.0 b	7.41 ± 0.5 b	6.56 ± 0.7 b	7.03 ± 0.3 b
T2	6.1 ± 1.1 c	7.18 ± 0.8 b	7.76 ± 1.4 b	7.31 ± 1.3 b	7.51 ± 0.5 b	7.33 ± 0.9 bc	7.15 ± 0.5 b	7.55 ± 0.9 b
T3	5.6 ± 0.6 c	5.96 ± 0.7 c	7.06 ± 0.6 b	7.15 ± 1.1 b	7.21 ± 0.5 bc	6.66 ± 1.1 bc	6.66 ± 0.8 b	7.13 ± 1.3 b
T4	5.9 ± 0.4 cd	6.31 ± 0.9 bc	6.78 ± 0.5 bc	6.46 ± 0.3 bc	6.10 ± 0.6 c	6.36 ± 0.8 c	5.55 ± 0.8 c	5.71 ± 0.8 c
T5	4.3 ± 0.6 d	3.70 ± 0.4 d	5.56 ± 1.3 c	5.56 ± 1.2 c	4.46 ± 1.4 d	4.43 ± 0.7 d	4.83 ± 1.0 c	5.03 ± 0.8 c
T6	11.9 ± 2.5 a	13.98 ± 0.8 a	14.98 ± 1.3 a	15.60 ± 1.1 a	15.50 ± 1.2 a	16.23 ± 0.5 a	17.36 ± 0.9 a	15.68 ± 1.8 a

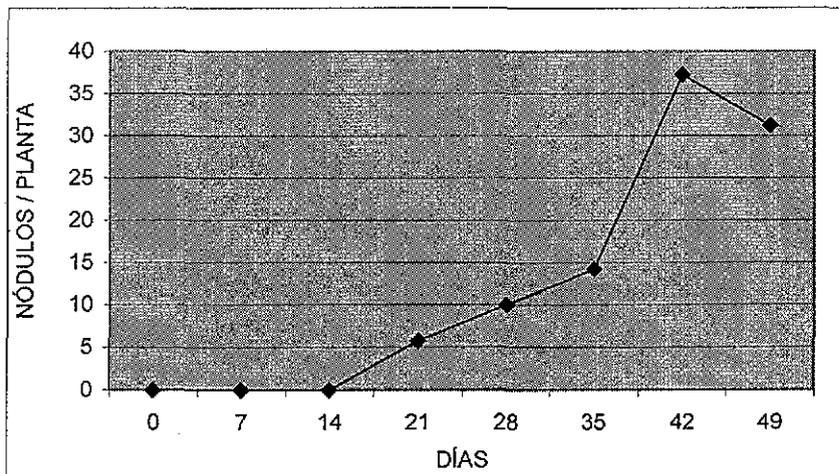
PESO FRESCO DE TALLO (gr)								
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	0.55 ± 0.0 a	1.25 ± 0.1 ab	1.40 ± 0.3 a	1.56 ± 0.4 a	1.33 ± 0.4 ab	1.31 ± 0.1 a	1.15 ± 0.1 bc	1.13 ± 0.2 bc
T2	0.25 ± 0.1 b	1.31 ± 0.1 a	1.43 ± 0.2 a	1.28 ± 0.5 a	1.56 ± 0.2 a	1.35 ± 0.1 a	1.10 ± 0.4 bc	1.31 ± 0.1 ab
T3	0.20 ± 0.0 c	1.08 ± 0.0 bc	1.23 ± 0.3 a	1.46 ± 0.3 a	1.58 ± 0.0 a	1.23 ± 0.3 a	1.33 ± 0.2 ab	1.30 ± 0.3 b
T4	0.28 ± 0.1 bc	0.98 ± 0.1 c	1.20 ± 0.2 a	1.40 ± 0.2 a	1.26 ± 0.2 b	1.28 ± 0.1 a	0.95 ± 0.2 c	1.00 ± 0.3 bc
T5	0.30 ± 0.0 bc	0.56 ± 0.0 d	0.80 ± 0.0 b	0.80 ± 0.1 b	0.90 ± 0.0 c	0.88 ± 0.1 b	0.93 ± 0.2 c	0.96 ± 0.3 c
T6	0.89 ± 0.0 b	1.14 ± 0.2 abc	1.25 ± 0.1 a	1.32 ± 0.0 a	1.29 ± 0.1 b	1.37 ± 0.1 a	1.63 ± 0.1 a	1.67 ± 0.2 a
NÚMERO DE HOJAS								
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	3.66 ± 0.8 a	4.00 ± 0.8 ab	5.50 ± 0.5 a	5.33 ± 1.0 abc	5.16 ± 0.7 bc	6.00 ± 0.6 a	5.83 ± 0.7 bc	5.33 ± 0.8 c
T2	3.66 ± 0.5 a	4.50 ± 0.5 a	5.33 ± 0.5 ab	6.00 ± 0.8 a	6.16 ± 0.7 a	5.66 ± 1.6 ab	6.66 ± 0.8 a	6.83 ± 0.7 a
T3	3.66 ± 0.5 a	4.33 ± 0.5 ab	4.66 ± 0.5 bc	5.00 ± 1.0 bc	5.50 ± 0.5 ab	4.00 ± 1.5 c	5.66 ± 0.5 bc	6.33 ± 1.0 ab
T4	3.83 ± 0.9 a	4.50 ± 0.5 a	5.33 ± 0.5 ab	5.66 ± 0.8 ab	6.00 ± 0.0 ab	5.83 ± 0.9 a	5.50 ± 1.0 c	5.83 ± 0.4 bc
T5	2.66 ± 0.5 b	3.66 ± 0.5 b	4.33 ± 0.5 c	4.66 ± 0.5 c	4.33 ± 1.3 c	4.33 ± 1.0 bc	6.00 ± 0.0 abc	5.66 ± 0.5 bc
T6	3.83 ± 0.7 a	4.16 ± 0.7 ab	5.16 ± 0.9 ab	5.50 ± 0.5 abc	5.66 ± 0.5 ab	5.66 ± 0.5 ab	6.66 ± 0.5 ab	6.66 ± 0.5 ab
LONGITUD DE RAÍZ (cm)								
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	10.08 ± 1.1 bc	8.28 ± 2.2 b	10.20 ± 2.4 b	12.83 ± 1.1 ab	12.58 ± 1.0 a	14.48 ± 0.5 a	12.70 ± 1.0 a	12.96 ± 0.4 b
T2	8.88 ± 3.4 dc	12.48 ± 2.9 a	11.88 ± 2.5 ab	11.60 ± 3.7 ab	14.08 ± 0.8 a	13.31 ± 2.1 ab	13.51 ± 0.3 a	13.43 ± 0.4 b
T3	6.85 ± 3.1 d	10.76 ± 1.0 ab	10.61 ± 3.0 b	13.13 ± 0.6 ab	11.88 ± 1.8 a	11.03 ± 3.4 b	14.33 ± 0.4 a	13.26 ± 0.2 b
T4	12.38 ± 1.2 ba	9.30 ± 2.9 b	12.36 ± 1.5 ab	11.88 ± 3.7 ab	11.98 ± 3.4 a	14.16 ± 3.8 a	14.30 ± 1.7 a	13.95 ± 1.8 b
T5	9.20 ± 3.1 dc	9.46 ± 1.6 b	11.03 ± 1.2 ab	10.66 ± 3.6 b	13.50 ± 4.1 a	12.50 ± 2.7 ab	13.60 ± 2.8 a	15.90 ± 0.9 a
T6	14.23 ± 0.9 a	12.61 ± 1.8 a	13.20 ± 1.1 a	13.96 ± 1.0 a	13.65 ± 0.6 a	13.00 ± 1.4 ab	13.36 ± 0.7 a	13.51 ± 0.9 b
PESO FRESCO DE RAÍZ (gr)								
	5	10	15	20	25	30	35	40
T1	0.55 ± 0.0 a	0.40 ± 0.2 a	0.36 ± 0.1 bcd	0.41 ± 0.0 bc	0.43 ± 0.0 bc	0.53 ± 0.2 b	0.43 ± 0.2 bc	0.56 ± 0.1 a
T2	0.25 ± 0.1 b	0.33 ± 0.1 a	0.43 ± 0.1 abc	0.28 ± 0.1 cd	0.73 ± 0.1 a	0.56 ± 0.2 bc	0.51 ± 0.1 ab	0.58 ± 0.1 a
T3	0.20 ± 0.0 b	0.41 ± 0.1 a	0.55 ± 0.1 ab	0.63 ± 0.1 a	0.36 ± 0.1 c	0.33 ± 0.0 cd	0.70 ± 0.1 a	0.73 ± 0.2 a
T4	0.28 ± 0.1 b	0.36 ± 0.1 a	0.56 ± 0.2 a	0.45 ± 0.1 b	0.50 ± 0.1 b	0.81 ± 0.3 a	0.65 ± 0.1 a	0.63 ± 0.2 a
T5	0.30 ± 0.0 b	0.33 ± 0.1 a	0.23 ± 0.0 d	0.30 ± 0.0 bcd	0.20 ± 0.0 d	0.30 ± 0.0 d	0.33 ± 0.1 bc	0.30 ± 0.0 b
T6	0.23 ± 0.1 b	0.10 ± 0.0 b	0.41 ± 0.2 cd	0.26 ± 0.1 d	0.26 ± 0.0 d	0.20 ± 0.0 d	0.28 ± 0.0 c	0.31 ± 0.0 b

T1= Suelo de Santa Rosa; T2= Suelo de Santa Rosa inoculado; T3= Suelo de Huitzilac; T4= Suelo de Huitzilac inoculado; T5= Vermiculita inoculada en invernadero; T6= Vermiculita inoculada en laboratorio (en las columnas, letras iguales son estadísticamente iguales P<0.05).

5.6. EFECTO DE LA INOCULACIÓN Y LA FERTILIZACIÓN QUÍMICA EN LA NODULACIÓN DE PLANTAS DE *Gliricidia sepium* EN EL REBROTE EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Gliricidia sepium por ser un árbol de la selva baja caducifolia pierde sus hojas durante la época de sequía y se observó que los nódulos senescen en este periodo. Las plantas vuelven a producir hojas una vez que disponen de agua ("rebrote") por lo que nos interesó determinar si los nódulos también reaparecen en las condiciones de rebrote (imitadas en el invernadero).

La nodulación en plantas de rebrote sin inoculación se observó desde los 21 días en plantas control y los porcentajes de plantas con nódulos fueron 100.0, 100.0, 50.0, 75.0 y 100.0 a los 21, 28, 35, 42 y 49 días respectivamente. El promedio del número de nódulos por planta varió desde 5.75 a los 21 días hasta 37.25 a los 42 días (Gráfica 14).



Gráfica 14.- Promedio del número de nódulos en plantas de *Gliricidia sepium* que inician el rebrote en condiciones de invernadero.

La ventaja de la inoculación fue que aceleró el inicio de la nodulación porque las plantas que fueron inoculadas, presentaron nódulos desde los 14 días. En las

plantas que se aplicó fertilizante químico la nodulación inició a los 21 días al igual que en las plantas control.

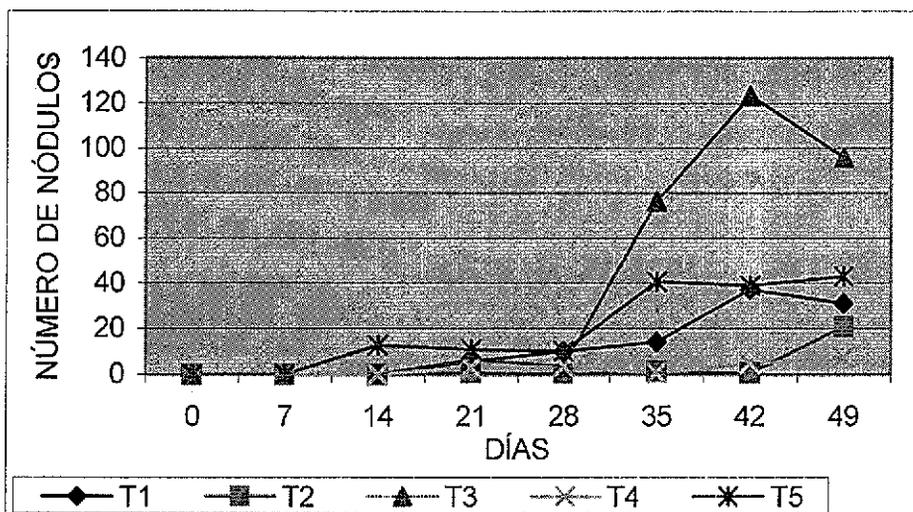
Se observaron diferencias estadísticas del número de nódulos entre los cinco tratamientos a los 28, 35, 42 y 49 días en las que las plantas con el tratamiento de fósforo solo, superaron estadísticamente a los demás tratamientos (Cuadro 14), La inoculación y la aplicación de fósforo mejoraron el porcentaje de plantas con nódulos ya que desde los 28 y 35 días respectivamente, fueron los únicos tratamientos que presentaron la totalidad de las plantas con nódulos (Cuadro 15).

Cuadro 14.- Número de nódulos en relación con la fertilización química y la inoculación de plantas de *Gliricidia sepium* que inician el rebrote.

	DIAS						
	7	14	21	28	35	42	49
T1	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	5.75 ± 4.2 a	10.00 ± 9.4 a	14.25 ± 18.9 b	37.25 ± 37.2 b	31.25 ± 20.2 b
T2	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	0.75 ± 0.9 a	0.00 ± 0.0 b	1.50 ± 1.9 b	0.50 ± 1.0 b	21.00 ± 5.1 b
T3	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	6.50 ± 9.2 a	3.50 ± 6.3 ab	76.50 ± 84.7 a	123.25 ± 85.3 a	96.00 ± 64.1 a
T4	0.00 ± 0.0 a	0.00 ± 0.0 b	3.00 ± 6.0 a	3.50 ± 6.3 ab	0.75 ± 1.5 b	4.75 ± 3.3 b	7.25 ± 7.8 b
T5	0.00 ± 0.0 a	12.75 ± 13.6 a	11.00 ± 9.8 a	10.00 ± 6.3 a	40.75 ± 27.5 ab	39.00 ± 18.8 b	43.00 ± 35.5 b

T1= Control; T2= 25 Kg de N/Ha; T3= 25 Kg de P/Ha; T4= 25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= Inoculadas (en las columnas, letras iguales son estadísticamente iguales P<0.05).

La adición de fosfato provocó un notable aumento en el número de nódulos por planta mientras que la adición de nitrógeno inhibió la nodulación. Los valores más bajos del número de nódulos se observaron en los tratamientos a los que se les aplicó nitrógeno (Gráfica 15).



Gráfica 15.- Número promedio de nódulos de plantas de *G. sepium* que inician el rebrote (T1=Control; T2=25 Kg de N/Ha; T3=25 Kg de P/Ha; T4=25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5=inoculadas).

Cuadro 15.- Porcentaje de plantas noduladas como efecto de la fertilización química y la inoculación en plantas de *Gliricidia sepium* que inician el rebrote.

	DÍAS						
	7	14	21	28	35	42	49
T1	0	0	100	100	50	75	100
T2	0	0	50	0	50	25	75
T3	0	0	75	50	100	100	100
T4	0	0	25	50	25	50	100
T5	0	100	75	100	100	100	100

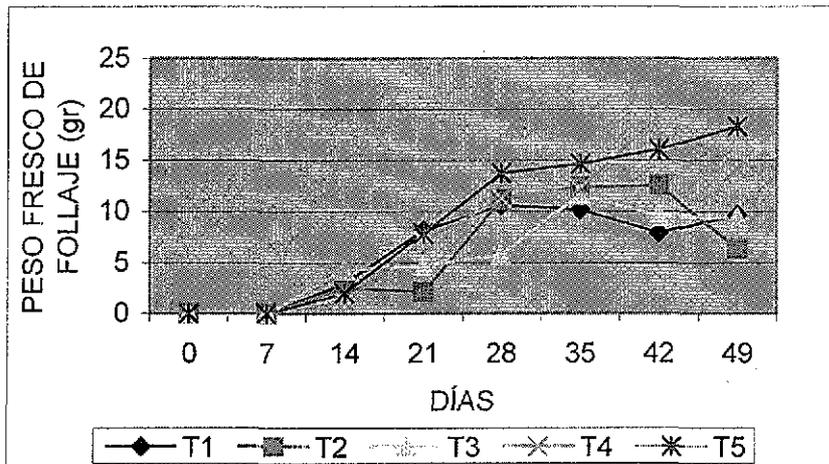
T1= Control; T2= 25 Kg de N/Ha; T3= 25 Kg de P/Ha; T4= 25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= inoculadas (en las columnas, letras iguales son estadísticamente iguales P<0.05).

En el caso de la producción de follaje fresco se observó gran variabilidad en el comportamiento de las plantas que iniciaron el rebrote (Cuadro 16) ya que a las primeras etapas sobresalió el tratamiento de fósforo, a los 35 días el comportamiento era similar en todos los tratamientos. Al final las plantas inoculadas fueron estadísticamente iguales a las fertilizadas con la mezcla de nitrógeno y fósforo y superiores a los otros tres tratamientos (Gráfica 16).

Cuadro 16.- Peso fresco de follaje como efecto de la fertilización química y la inoculación en plantas de *Gliricidia sepium* que inician el rebrote.

	DÍAS						
	7	14	21	28	35	42	49
T1	0.00 ± 0.0 a	2.99 ± 2.0 ab	8.15 ± 5.5 a	10.63 ± 4.1 ab	10.23 ± 8.2 a	7.94 ± 2.5 c	9.67 ± 5.6 bc
T2	0.00 ± 0.0 a	2.57 ± 2.2 ab	2.08 ± 1.6 a	11.21 ± 2.7 ab	12.38 ± 0.8 a	12.57 ± 7.0 abc	6.35 ± 2.5 c
T3	0.00 ± 0.0 a	4.32 ± 2.4 a	4.75 ± 0.9 a	5.75 ± 3.8 b	11.69 ± 2.6 a	9.60 ± 4.9 bc	9.39 ± 2.1 bc
T4	0.00 ± 0.0 a	1.13 ± 0.2 b	7.16 ± 5.5 a	11.30 ± 5.21ab	12.26 ± 7.9 a	19.25 ± 4.7 a	14.21 ± 4.1 ab
T5	0.00 ± 0.0 a	2.00 ± 0.7ab	7.86 ± 4.6 a	13.75 ± 3.5 a	14.66 ± 5.7a	16.08 ± 4.6 ab	18.33 ± 5.3 a

T1=Control; T2=25 Kg de N/Ha; T3=25 Kg de P/Ha; T4=25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= Inoculadas (en las columnas, letras iguales son estadísticamente iguales P<0 05).



Gráfica 16.- Peso fresco de follaje de *Gliricidia sepium* en plantas que inician el rebrote (T1=Control, T2=25 Kg de N/Ha; T3=25 Kg de P/Ha; T4=25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= Inoculadas)

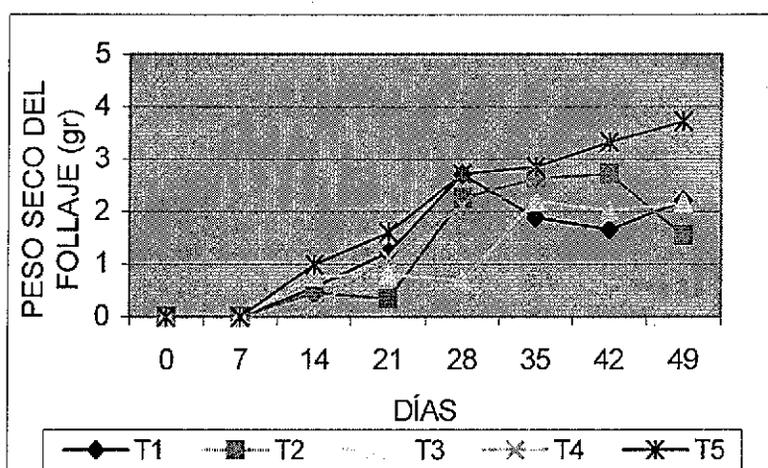
En la producción de materia seca (Cuadro 18) las plantas inoculadas superaron estadísticamente a los 49 días a las fertilizadas con nitrógeno solo, con fósforo solo y a las plantas control. En este muestreo las plantas inoculadas fueron estadísticamente iguales a las plantas fertilizadas con la mezcla de nitrógeno y fósforo.

Los dos tratamientos con nitrógeno se comportaron de manera similar entre ellos y la aplicación de fósforo no fue determinante por sí solo para mejorar la producción de materia seca (Gráfica 17).

Cuadro 17.- Efecto de la fertilización química y la inoculación en el peso seco de follaje de plantas de *Gliricidia sepium* que inician el rebrote.

	DIAS						
	7	14	21	28	35	42	49
T1	0.00 ± 0.0 a	0.55 ± 0.3 ab	1.22 ± 0.9ab	2.71 ± 0.8 ab	1.88 ± 1.4 a	1.66 ± 0.6 b	2.21 ± 1.4 bc
T2	0.00 ± 0.0 a	0.46 ± 0.3 ab	0.33 ± 0.3 b	2.26 ± 0.7 a	2.63 ± 0.7 a	2.72 ± 1.6 ab	1.54 ± 0.6 c
T3	0.00 ± 0.0 a	0.76 ± 0.4 ab	0.80 ± 0.2 ab	0.69 ± 0.7 b	2.21 ± 0.6 a	2.01 ± 1.0 b	2.16 ± 0.5 bc
T4	0.00 ± 0.0 a	0.18 ± 0.0 b	1.12 ± 0.8 ab	2.11 ± 1.0 ab	2.40 ± 1.5 a	4.00 ± 1.2 a	3.30 ± 0.9 ab
T5	0.00 ± 0.0 a	0.99 ± 0.6 a	1.60 ± 0.8 a	2.72 ± 0.6 a	2.85 ± 1.0 a	3.33 ± 0.9 ab	3.72 ± 1.1 a

T1=Control; T2=25 Kg de N/Ha; T3=25 Kg de P/Ha; T4=25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= Inoculadas (en las columnas, letras iguales son estadísticamente iguales P<0.05).



Gráfica 17.- Peso seco de follaje de *Gliricidia sepium* en plantas que inician el rebrote (T1=Control; T2=25 Kg de N/Ha; T3=25 Kg de P/Ha; T4=25 Kg de N+ 25 Kg de P/Ha; T5= Inoculadas).

Desde hace tiempo se sabe que el fósforo es importante en el aumento y mantenimiento de la fertilidad del suelo a través de su efecto en el crecimiento de las leguminosas (Donald y Williams, 1954). Se han acumulado evidencias de un efecto específico del fósforo en el crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium* y su capacidad para la nodulación y la fijación de nitrógeno (Singleton y col., 1985; McLaughlin y col., 1990). Un ejemplo notable del papel de la adecuada nutrición con fósforo es el aumento de la fijación de nitrógeno en soya (Cassman y col., 1993).

La inhibición de la nodulación y del proceso de fijación de nitrógeno por formas inorgánicas de nitrógeno, principalmente de nitratos, es bien conocida (Vincent, 1965). A pesar de que existe mucha literatura sobre el tema, el modo de acción del nitrato en la reducción de la nodulación no está claramente entendido. Munns (1968), por ejemplo, lo considera como un complejo de efectos en el rizado de los pelos radicales, la infección del pelo radical y la tasa de desarrollo de los pelos radicales infectados. Por otro lado, Dazzo y col. (1981) relacionaron el ion nitrato en la interferencia con la expresión del fenómeno de reconocimiento que precede al proceso de infección.

El efecto de la inoculación fue determinante en el número de plantas con nódulos, en el inicio de la nodulación y en la producción de follaje.

5.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* EN LA RESPUESTA PRODUCTIVA DE *Gliricidia sepium* EN CONDICIONES DE CAMPO.

En los resultados no se detectaron diferencias estadísticas en ninguna de las variables observadas aunque sí se observa una tendencia de los tratamientos inoculados comparados con las plantas que no se inocularon (Cuadro 18).

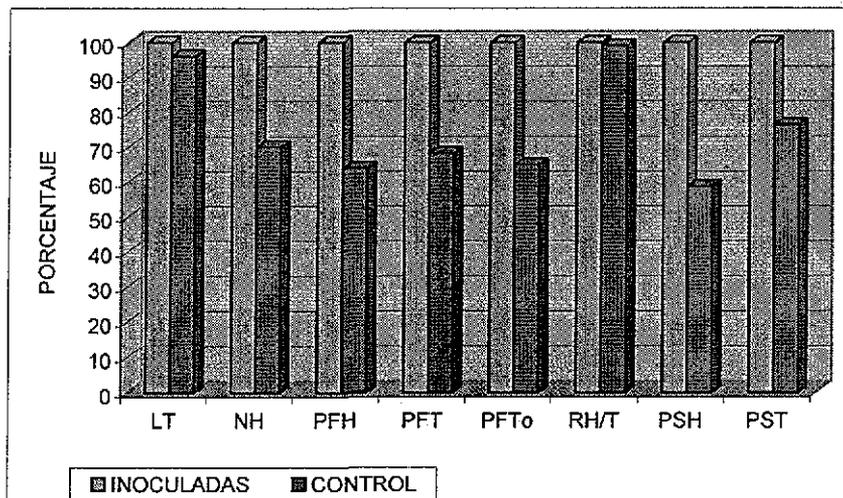
Las plantas inoculadas superaron en 3.87 % en altura de planta a las no inoculadas. En el número de hojas la diferencia fue de 29 85 superior. En el peso fresco del follaje producido las inoculadas fueron en promedio 35 % más productivas que las no inoculadas, observando una tendencia similar en la producción de materia seca con una diferencia de 32% en promedio (Gráfica 18).

Los resultados nos muestran una respuesta que posiblemente pueda ser mejorada mediante la utilización de cepas seleccionadas por su potencial de fijación de nitrógeno, las cepas utilizadas fueron seleccionadas por su capacidad de nodulación pero la fijación de nitrógeno no se evaluó en el presente trabajo.

Cuadro 18.- Resultados de las variables productivas en plantas de *Gliricidia sepium* inoculadas con cepas nativas de *Rhizobium* en condiciones de campo.

TRATAMIENTOS	ALTURA DE PLANTA (cm)	NUMERO DE HOJAS	PESO FRESCO DE HOJAS (gr)	PESO FRESCO DE TALLOS (gr)
INOCULADAS	50.36 a	12.70 a	115.25 a	31.75 a
NO INOCULADAS	48.48 a	9.78 a	84.75 a	24.10 a

TRATAMIENTOS	PESO FRESCO TOTAL (gr)	RELACION HOJA / TALLO	PESO SECO DE HOJAS (gr)	PESO SECO DE TALLOS (gr)
INOCULADAS	147.00 a	3.56 a	23.45 a	8.40 a
NO INOCULADAS	108.85 a	3.53 a	16.60 a	6.80 a



Gráfica 18.- Diferencia entre las variables de crecimiento de plantas de *G. sepium* inoculadas y control, en condiciones de campo.

VI. CONCLUSIONES

1. Las especies que se asocian con *Gliricidia sepium* son *Sinorhizobium teranga*, *Rhizobium tropici* tipo A, *Rhizobium tropici* tipo B y *Rhizobium etli*.
2. Las proporciones y la presencia o ausencia de cada especie depende del sitio de muestreo.
3. La emergencia de *Gliricidia sepium* tiene un máximo del 77 % y esta condicionada a la interacción del ecotipo y su respuesta a las condiciones ambientales.
4. Existe diferencia entre los ecotipos en las variables de crecimiento en las primeras etapas de desarrollo.
5. El comportamiento de las variables de crecimiento y la nodulación dentro de los ecotipos presentó variaciones mínimas.
6. En condiciones controladas la variación en el comportamiento de las variables de crecimiento se reduce considerablemente con respecto a las condiciones de invernadero.
7. En condiciones controladas la nodulación inicia a los 8 días después de la inoculación. En condiciones de suelo, inicia después de los 20 días, y cuando se inocula en condiciones de suelo el inicio de la nodulación se adelanta siete días.
8. La inoculación tiene un mayor efecto en el inicio de la nodulación y en el porcentaje de plantas noduladas que en el promedio de nódulos por planta.

9. En plantas de rebrote la inoculación adelanta la nodulación en siete días y promueve la producción de materia seca superando a la fertilización nitrogenada.

10. En condiciones de campo se observó una tendencia de los tratamientos inoculados a superar a los no inoculados en las variables de crecimiento.

VII.- REFERENCIAS.

- Allen O. N. and Allen E.K. (1981). The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, 812 pp.
- Allen, N.S., Bennet, M.N., Cox, D.N., Shipley, A., Ehrhardt, D.W., and Long, S.R. 1994. Effects of Nod factors on alfalfa root hair Ca^{++} , and H^+ currents and on cytoskeletal behavior. In: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. M.J. Daniels, J.A., Downie and A.E. Osbourne, eds. Kluwer, Dordrecht. p. 107-114.
- Atta-Krah A.N., Sumberg, J.E. and Reynolds, L. 1986. Leguminous fodder tree in Farming Systems, in: Potential of Forage Legumes in Farming Systems in Sus-Sahara Africa, Addis Ababa, Ethiopia, International Livestock Centre for Africa (ILCA).
- Awonaike K.O. and G Hardarson. 1992. Biological Nitrogen Fixation of *Gliricidia sepium/Rhizobium* symbiosis as influenced by plant genotype, bacterial strain and their interactions. Trop. Agric.(Trinidad) 69(4): 381-385.
- Bala A. and Giller K.E. 2001. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. New Phytologist 149: 495-507.
- Brewbaker J.L., van den Beldt, R. and McDicken K. (1982). Nitrogen-Fixing tree resources: potentials and limitations. In: Graham P.H. and Harris S.C. (eds), Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. CIAT, Cali, Colombia, pp 413-425.
- Cassman K G, Singleton P W and Linquist B A. (1993). Input/output analysis of the cumulative soybean response to Phosphorus on an Ultisol. Field Crops. Res. 34, 23-36.
- Chandra S. And Ali M. 1986. Recent achievements in pulses production. Tech. Bull. No. 1. Directorate of Pulse Research, ICAR, Kampur. 44p.
- Chinmulgund V.K. and Hedge S.V. 1987. Increasing redgram yields through diammonium phosphate (application) and *Rhizobium* (inoculation) treatment. Fert. Mkt. News, 18, 9-13.
- Cloutier, J., Laberge, S., Prevost, D., and Antoun, H. 1996. Sequence and mutational analysis of the common nodBCIJ region of *Rhizobium* sp. (*Oxytropis arctobia*) strain N33, a nitrogen-fixing microsymbiont of both arctic and temperate legumes. Mol. Plant - Microbe Interact. 9: 523-531.
- Corby, H.D.L. 1988. Types of rhizobial nodule and their distribution among the leguminosae. Kirkia 13: 53-123.
- Danso S K A , Bowen G D and Sanginga N. 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. Plant and soil 141, 177-196.

Davis R J, Cady F B, Wood C L and Chan C P Y. 1985. Design and analysis of an International Experimental Network: legume inoculation trials in the NIFTAL project. INLIT experiences. Research series 042, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Honolulu.

Dazzo F B, Hrabek E M, Urbano M R, Sherwood J E and Truchet G. (1981). Regulation of recognition in the Rhizobium-clover symbiosis. In current perspectives in Nitrogen Fixation. Eds. A H Gibson and W E Newton. Pp 292-295. Aust Acad. Sci., Canberra.

De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kesters K, and Gillis M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 44: 715-733.

Debelle F, Plazanet C, Roche P, Pujol C, Savagnac A, Rosenberg C, Promé J-C, Dénarié J. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of nod factors by different fatty acids. Mol Microbiol 22: 303-314.

Dobereiner J. (1984). Nodulation and nitrogen fixation in legume trees. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 19, 83-90.

Donald C M and Williams C H. (1954). Fertility and productivity of a podsollic soil as influenced by subterranean clover (*Trifolium subterranean* L.) and superphosphate. Aust. J. Agric. Res. 5, 664-687.

Fahraeus G. 1957. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. J Gen Microbiol 16: 374-381.

Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Schultze, M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. Plant J. 7: 939-947.

Firmin, J.L., Wilkson, K.E., Carlson, R.W., Davis, A.E., and Downie, J.A. 1993. Resistance to nodulation of cv Afghanistan peas is overcome by nodX which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. Mol. Microbiol. 10: 351-360.

Francisco G. y Hernández I. 1998. *Gliricidia sepium* (JACQ) KUNT. Y WALP., Árbol multipropósito para una ganadería sostenible. Pastos y Forrajes 21: 191- 204.

García F.M. 1997. Respuesta a la sequía de plántulas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp., de distintas procedencias. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo México. 81 pp.

Gibson A. H. 1967. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. IV. Factors affecting the early stages of nodulation. Aust. J. Biol. Sci. 20: 1087-1104.

Glover N.N. 1989. *Gliricidia* production and use. Nitrogen Fixing Tree Association. Waimanalo, USA. 44 p.

González-Pasayo R, Martínez-Romero E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 572-577.

Graham PH. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* 38: 475-484.

Harrington J.F. 1972. Seed storage and longevity. In: Kozlowski, T.T. (ed.) *Seed Biology*. New York, Academic Press, 145-245, vol.3.

Haukka K, Lindström K, and Young JPW. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous tree growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* 64: 419-426.

Hernández-Lucas I, Segovia L, Martínez-Romero E and Pueppke S G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl Environ Microbiol* 61: 2775-2779.

Hirsch A.M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 230-326.

Hughes, C. 1987. Biological considerations in designing a seed collection strategy for *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (Leguminosae). *Commonwealth Forestry Review* 66: 31-48.

Hungria M, Andrade DD, Chueire LMD. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* 32: 1515- 1528.

Hynes M F, and McGregor N F. 1990. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* 4: 567-574.

Jabbouiri, S., Relic, B., Hanin, M., Kamalaprija, P., Burger, U., Promé, D., Promé, J.C., and Broughton, W.J. 1998. *noI*O and *noI*E (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of nod factors. *J. Biol. Chem.* 273: 12047-12055.

Kouchi, H., and Hata, S. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development, *Mol. Gen. Genet.* 238: 106-119.

Kulkarni J.H. and Joshi P K. 1988. *Rhizobium* inoculation studies in groundnut: Problems and prospects. In *Biofertilizers Potencialities and Problems*. Eds. S.P. Sen and P. Palit. Pp 51-56. Naya Prakash, Calcutta.

Laeremans T; Vanderleyden J. 1998. Review. Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J Microbiol and Biotechnol* 14: 787-808.

Laguerre G, Allard M-R, Revoy F and Amarger N. (1994). Rapid identification Of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1), 56-63.

Lavin, M., Mathews, S. And Hughes, C.E. (1991). Intraspecific chloroplast DNA variation in *G. Sepium* (Leguminosae): intraspecific phylogetokogeny. American Journal of 78: 1576-1585.

Lavin, M. And Sousa, M. (1995). Phylogenetic systematic and biogeography of the tribe Robinia (Leguminosae). Systematic Botany Monography 45: 1-160.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchett, G., Promé, J.C. and Dénarié, J. 1990. Symbiotic host especificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature (London) 344: 781-784.

Liyanage L V K and Jayasundara H P S. 1988. *Gliricidia* as a multi-purpose tree for coconut plantations. Coconut Bull. 5, 1-4.

Liyanage M de S, Jayasundara H P S and Fernando W S M A. 1990. *Gliricidia sepium* as a supplementary fodder for dairy cattle. Nitrogen Fixin Tree Research Reports 8, 138-139.

Liyanage M de S, Danso S K A and Jayasundara H P S. 1994. Biological nitrogen fixation in four *Gliricidia sepium* genotypes. Plant and soil 161, 267-274.

López-Lara, I.M., van der Berg, J.D.J., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Lugtenberg, B.J.J., and Spaank, H.P. 1995. Estructural identification of the lipochitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. Mol. Microbiol. 15: 627-638.

MacDiken K.G. 1994. Selection and management of nitrogen fixing trees. Winrock International, Morrilton, Arkansas, USA and FAO, Bangkok, Thailand. 118 pp.

Martínez E, Palacios R, Sánchez F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harborin *Rhizobium phaseoli* plasmids. J. Bacteriol 169: 2828-2834.

Martínez-Romero, E, Rosenblueth M. 1991. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. Appl Environ Microbiol 56: 2384-2388.

Martínez-Romero, E, Hernández -Lucas I, Peña-Cabriaes JJ, Castellanos JZ. 1998. Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N₂. Plant Soil 204: 89-94.

Mavingui P, Flores M, Romero D, Martínez-Romero E, Palacios R. 1997. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). Nature Biotechnol 15: 564-569.

McLaughlin M J, Malik K A, Memon K S and Idris M. (1990). Thr role of Phosphorus in nitrogen fixation in upland crops. Proc. Workshop Phosphorus Requeriments for Sustainable Agriculture in Asia and Oceania. Pp 295-305. IRRI, Los Banos, Phillipines.

Melchor-Marroquin JI, Vargas-Hernández JJ, Ferrara-Cerrato R, Krishnamurthy L. 1999. Screening *Rhizobium* spp. associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, México. Agroforestry Systems 46: 25-38.

Mergaert, P., D'Haese, W., Fernandez-López, M., Huelen, D., Goethals, K., Promé, J.C. van Montagu, M., and Holsters, M., 1996. Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolK* as well as *noeC* and/or downstream genes. *Mol. Microbiol.* 21: 409-419.

Miller JH. 1972 *Experiments in molecular genetics*, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Mondragon C. M.G. 1999. *Caracterización de 8 ecotipos de Gliricidia sepium bajo condiciones de invernadero*. Tesis Profesional. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 53 pp.

Munns D N. (1968). Nodulation in *Medicago sativa* in solution culture. II. Compensating effects of nitrate and of prior nodulation. *Plant and soil* 28: 246-257.

Nambiar P T C, Rupela O P and Kumar Rao J V D K. 1988. Nodulation and nitrogen fixation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.), chick-pea (*Cicer arietinum*) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) In *Biological Nitrogen Fixation: Recent Developments*. Ed. N.S. Subba Rao. Pp 53-70. Oxford and IBH Publishers, New Delhi.

Onwuka. C.F.I. 1984. *Gliricidia sepium* as dry season feed for goat production in Nigeria. *Proceedings of the first AABNF Meeting, Nairobi, The Nairobi Rhizobium MIRCEN Nairobi*, pp 533-539.

Otarola A. 1995. Cercas vivas de madero negro: práctica agroforestal para sitios con estación seca marcada. *Agroforestería en las Américas* 2: 24.

Palma G. J. M., Perez-Guerrero J., Galina M. Y Galina I. 1997. Effect of the height and pruning date on forage production of *Gliricidia sepium*. *Cuban J Agric. Sci.* 31:91-97.

Palma, G.J.M. 1999. *Experiencias en la utilización de la leguminosa arborea Gliricidia sepium*. Sistemas silvopastoriles, una opción para la producción animal sostenible. Ed. Universidad de Colima. Memoria de curso. Mexico. 86 pp.

Peoples, M.B. Herridge, D.F. and Ladha, J.K. 1995a. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant and soil* 174: 3-28.

Peoples, M.B. Ladha, J.K. and Herridge, D.F. 1995b. Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant and soil* 174: 83-101.

Ricillo PM, Muglia CL, de Bruijn FJ, Roe AJ, Boot IR, Aguilar OM. 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J Bacteriol* 182: 1748-1753.

Rogel M A, Hernández-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L, and Martínez-Romero E. 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adherens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl Environ Microbiol* 67: 3264-3268.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Sanguinga N., Danso S.K.A., Mulongoy K. and Ojeifo A.A. 1994. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in Southwestern Nigeria. *Plant and Soil* 159: 199-204.

Sanguinga N., Manrique K and Hardarson G. 1991. Variation in nodulation and N₂ fixation by the *Gliricidia sepium/Rhizobium* spp. Symbiosis in calcareous. *Soil Biol. Ferti. Soils* 11, 273-278.

Sanguinga N., Vanlawe B. and Danso S.K.A. 1995. Management of biological N₂ Fixation in alley cropping systems: Estimation and contribution to N balance. *Plant and Soil* 174: 119-141.

Scott, D.B., Yonug, C.A., Collins-Emerson, J.M., Terzaghi, E.A., Rockman, E.S., Lewis, P.E., and Pankhurst, C.E. 1996. Novel and complex Chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 187-197.

Schlaman, H.R.M., Philips, D.A., and Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. p. 361-386.

Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van der Wiel, C., van Kammen, A., and Bisseling, T. 1990a. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*. 2: 687-700.

Scheres, B., van der Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H.P. Van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A.M., Gloudemans, T., van Kammen, A., and Bisseling, T. 1990b. The *ENOD12* gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*. 60: 281-294.

Selander R K, Caugant D A, Ochman H, Musser J M, Gilmour M N and Whittam T S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetic and systematics. *Appl Environ Microbiol* 51: 873-884.

Singleton P W, AbdelMagid H M and Tavares J W. (1985). Effect of Phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49,613-616.

Spaink, H.P. and Lugtenberg, B.J.J. 1991a. Function of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulation genes involved in the determination of host specificity. In: *Molecular Biology of the Rhizobium-legume symbiosis*. T. Ruiz-Argueso, ed. Fundación Juan March, Madrid. P. 15-18.

Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., and Lugtenberg, B.J.J. 1991b. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature (London)*. 354: 125-130.

Spaink, H.P. and Lugtenberg, B.J.J. 1994. Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1413-1422.

Sprent J.I. 2001. Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens. Cromwell Press Ltd. Great Britain. 139 pp.

Sprent J.I. and Raven J.A. 1992. Evolution de nitrogen-fixingsymbioses. In: Stacey G. Burris R.H. and Evans H.J. (eds) Biological Nitrogen Fixation, pp 461-496. Chapman and Hall, New York.

Subba Rao N.S. 1976. Field response of legumes in India to inoculation and fertilizer applications. In Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Ed. P.S. Nutman. Pp 265-288. Cambridge University press, London.

Sutton, J.M., Lea, E.J.A., and Downie, J.A. 1994. The nodulation-signaling protein nodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 9990-9994.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C., and Dénarié, J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of the symbiotic procaryote *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis on the host plant *Medicago sativa*. Nature(London) 351: 670-673.

Turk D and Keiser H.H. 1992. Rhizobia that nodulate tree legumes: especificity of the host for nodulation and effectiveness. Can. J. Microbiol. 38, 451-460.

Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spanik, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. Science 257: 70-72.

Vincent J.M. (1965). Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume. In Soil Nitrogen. Eds. W.V. Bartolomew and F.C. Clark. Pp 384-435. Am. Soc. Agron., Madison, WI.

Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Burgess and Son LTD. Great Britain.

Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX and Martínez-Romero E. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. Nov. a Symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galagae*. Int J Syst Bacteriol 48: 687- 699.

Wani S.P., Rupela O.P. and Lee K.K. 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant and Soil 174: 29-49.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173: 697- 703.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN