


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

**TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE *Rhizobium*
HUESPED DE *Leucaena leucocephala***

T E S I S :

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

MA. DE LOS ANGELES AQUIAHUATL RAMOS

MEXICO, D. F.

1982



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.

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES.....	5
2.1. Descripción y distribución de la <u>Leucaena leucocephala</u>	
2.2. Formas y Tamaños	
2.3. Usos	
2.3.1. En la agricultura	
a) Fertilizante orgánico	
b) Arbol de sombra	
c) Control de la erosión	
2.3.2. En la producción animal	
a) Forraje	
2.3.3. Usos forestales	
a) Repoblación forestal	
b) Madera	
c) Combustible	
d) Otros	
2.4. Antecedentes de inoculación en <u>Leucaena leucocephala</u>	
2.5. Problemas relacionados con la asociación <u>Rhizobium</u> - leguminosas y efectos sobre el establecimiento de <u>L. leucocephala</u> en suelos tropicales	
2.5.1. Especificidad <u>Rhizobium</u> huésped	
2.5.2. Efecto de la acidez sobre la simbiosis <u>Rhizobium</u> - leguminosas	
2.5.3. Efecto del aluminio sobre el sistema simbiótico <u>Rhizobium</u> -leguminosas	

III. MATERIAL Y METODOS	26
3.1. Recolección de nódulos, aislamiento y purificación de cepas	
3.2. Caracterización de las cepas de <u>Rhizobium</u>	
3.3. Efecto del pH, fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento del rizobio específico de <u>L. leucocephala</u>	
3.4. Pruebas de infectividad en jarras de Leonard de las cepas de <u>Rhizobium</u> en condiciones de invernadero	
3.5. Pruebas de adaptación de las cepas de <u>Rhizobium</u> a concentraciones crecientes de aluminio en medio de pH ácido	
3.6. Comportamiento de las cepas de <u>Rhizobium</u> con mayor tolerancia al aluminio en pruebas de inoculación con <u>L. leucocephala</u> en un suelo de pH ácido y niveles elevados de aluminio	
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSION	41
VI. CONCLUSIONES	48
VII. BIBLIOGRAFIA	50

1. INTRODUCCION

Actualmente son del conocimiento general los datos sobre la cada vez mayor crisis energética y por lo tanto los costos crecientes para la elaboración de fertilizantes nitrogenados, por ejemplo se sabe que los campesinos de países desarrollados invierten cada año aproximadamente 120 billones de pesos para comprar fertilizantes nitrogenados, por lo que se cree que para 1985 deberán invertir por lo menos 175 billones de pesos/año en fertilizantes si la inflación presenta continúa(1).

También se estima que para el año 2000 la cantidad de fertilizantes nitrogenados necesarios para la producción de alimentos suficientes para toda la gente del mundo, se incrementará de 50 a 135 millones de toneladas métricas/año, con un costo aproximado de 575 billones de pesos por año (1).

Por lo anteriormente expuesto, hay un creciente interés en la búsqueda de otro tipo de sistemas que proporcionen sustancias nitrogenadas a los suelos del mundo, y ésta se ha dirigido principalmente hacia la fijación biológica de nitrógeno.

Existen varios sistemas biológicos fijadores de nitrógeno, como: el sistema Rhizobium-leguminosa, el sistema Azolla, el sistema Frankia, el sistema de bacterias asociadas a cereales (Azospirillum), el de algas azul-verdes, y bacterias de vida libre o a-

simbióticas, de todos ellos tal vez un 80-90% de las investigaciones realizadas se refieren al sistema Rhizobium-leguminosa, de ahí que los otros sistemas sean aún poco estudiados y sólo investigados en pocas instituciones.

En el sistema fijador de nitrógeno Rhizobium-leguminosa las bacterias reciben de la planta hospedera los nutrientes necesarios para su desarrollo y la leguminosa obtiene de la bacteria nitrógeno aprovechable para la síntesis de proteínas necesarias para su crecimiento; con este proceso que consume sólo energía derivada de la fotosíntesis se aprovechan agrícolamente el 40% de las aproximadamente 150 mil toneladas de nitrógeno que se fijan en el mundo por vías biológicas (2).

Investigaciones recientes indican que de los 47 millones de hectáreas de trópico mexicano, 11 millones corresponden a praderas de gramíneas, las que a corto o largo plazo demandarán fertilizantes nitrogenados para sostener su productividad, dada la creciente población nacional y la demanda de alimentos básicos, lo que representará un costo aproximado de 17 600 millones de pesos/año, considerando una aplicación de 200 Kg de N/Ha a un costo de 8.00 el kg de fertilizante, por lo que será difícil que se puedan seguir utilizando fertilizantes químicos en esas praderas (3).

Además la desnutrición en las zonas tropicales y subtropicales de México es frecuente, debido a una deficiencia de proteínas de

buena calidad en los alimentos, lo que hace necesario realizar investigaciones para aumentar la producción de alimentos básicos y a la búsqueda de nuevas fuentes alimenticias. La producción de leche y proteínas de origen animal, en las zonas antes mencionadas es baja, por lo que los estudios que ahora se están llevando a cabo se han dirigido a los alimentos de origen vegetal, ricos en proteínas y de bajo costo como las leguminosas. Las leguminosas son ricas en proteínas, en un porcentaje que varía de 17 a 30 y que en algunos casos como el de la soya es hasta de 40% (4).

Existen actualmente varias especies de leguminosas tropicales que pueden ser establecidas en esas regiones como fuente de proteína buena y barata, de estas la Leucaena leucocephala ha despertado un gran interés ya que esta leguminosa puede aumentar la disponibilidad de carne y leche de esas zonas debido a sus múltiples usos tales como: forraje nutritivo para la alimentación animal, madera, combustible, leña e incluso en la alimentación humana; tiene además la capacidad de asociarse con microorganismos del género Rhizobium lo cual hace que tenga una gran potencialidad en la producción forestal y pecuaria debido a su elevado contenido proteico y a que se adapta fácilmente a diferentes climas y suelos. Sin embargo existen ciertos tipos de suelos en los que no puede sobrevivir con facilidad, por ejemplo se adapta mal a los suelos ácidos; la adición de cal y de una cepa especial de Rhizobium así como de fertilizantes

fosfatados que contengan molibdeno son necesarios para lograr que se establezca en este tipo de suelos. Las bajas tasas de crecimiento en esos suelos se atribuyen a deficiencias de calcio y fósforo, y al efecto depresor de la acidez sobre la nodulación; así como también al efecto tóxico del aluminio y manganeso para la planta, los que se encuentran en concentraciones elevadas en suelos de pH ácido.

• Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fué orientado hacia el estudio del efecto de la acidez y altas concentraciones de aluminio tanto en medios de cultivo de laboratorio como en un suelo del trópico con características ya mencionadas, sobre el crecimiento del Rhizobium de Leucaena leucocephala y su interacción con la planta mediante los siguientes procedimientos:

- a) Selección de cepas de Rhizobium tolerantes a la acidez y altos niveles de aluminio.
- b) Relacionar la tolerancia de las cepas aisladas en medios de cultivo de pH ácido y altas concentraciones de aluminio con el comportamiento de éstas al hacer pruebas de infectividad en invernadero.
- c) Comparar el comportamiento de las cepas adaptadas a pH ácido y cantidades crecientes de aluminio con cepas sin adaptar, en el efecto de nodulación de la leguminosa huésped.
- d) Determinar si este tipo de selección y adaptación tiene algún efecto benéfico en el establecimiento de esta leguminosa en suelos tropicales con la problemática ya mencionada.

11. GENERALIDADES

2.1. Descripción y distribución de la Leucaena leucocephala.

La leucaena o guaje pertenece al género Leucaena de la familia Leguminosae y sub-familia Mimosoideae, originaria de México y Centroamérica.

La leucaena ha tenido relación y trascendencia histórica en la vida de algunas culturas mexicanas, así la cita más antigua donde se hace referencia al guaje aparece en el Códice Mendoza y se relaciona con la fundación de la ciudad de Oaxaca, entre 1440-1469 años D.C., durante el reinado de Moctezuma Ilhucamina, cuando guerreros mexicas se establecieron en un extenso bosque de guajes que existían en el lugar donde se estableció la ciudad de Oaxaca que deriva de la palabra nahoa " Huaxyacac " que significa en la nariz de los guajes (5).

Después de la conquista de México en 1565 los conquistadores españoles organizaron el comercio con las Filipinas, vía por la que probablemente la leucaena se distribuyó a esos lugares.

2.2. Formas y tamaños.

La Leucaena leucocephala es la especie más importante y estudiada del género Leucaena, por su gran versatilidad, amplia distribución y fácil propagación. Investigadores australianos y hawaianos la han clasificado en tres tipos, de acuerdo a su madurez,

vigor y producción como sigue:

- a) Tipo Hawaiano.- arbusto de floración temprana (4-6 meses), con rendimientos bajos de forraje, de aproximadamente 5 m. de altura, debido a su continua floración puede llegar a convertirse en maleza, es originario de México pero naturalizado en la región del Pacífico y norte de Australia.
- b) Tipo Salvadoreño.- arbusto de floración tardía, con altos rendimientos de materia seca y ramas muy esparcidas en todo el tallo, altura aproximada de 20 m. Varias variedades introducidas a Australia procedentes de El Salvador y Guatemala son de este tipo.
- c) Tipo Peruano.- árbol de floración tardía, con altos rendimientos de materia seca, con el tallo muy ramificado desde su base, de aproximadamente 15 m. de altura.

También existen nuevas variedades de Leucaena leucocephala, llamadas " Hawaianas Gigantes " introducidas a las Filipinas de una colección de variedades de la Estación Experimental de la Universidad de Hawaii, siendo responsable el Dr. Brewbaker (6), las variedades más comunes de este tipo son la K-6 de Perú, la K-8 originaria de México y la K-28 de El Salvador.

2.3. Usos

2.3.1. En la Agricultura

Los usos de la leucaena en la agricultura son amplios y va-

riados, destacándose la utilidad de esta planta como fertilizante orgánico, como sombra de cultivos y en programas de control de la erosión.

a) Fertilizante orgánico

Desde 1900 en Indonesia se ha reconocido a la leucaena como un fertilizante orgánico y mejorador de suelos en cultivos de café y té. El incremento en el precio de los fertilizantes químicos, principalmente de los nitrogenados, y la relativa baja disponibilidad de éstos, creó la necesidad de buscar otras fuentes de aprovisionamiento, ya que son de gran importancia para la agricultura intensiva.

Algunos trabajos sugieren que la leucaena puede convertirse en una de las fuentes renovables de nitrógeno más baratas del mundo (7). La fijación de nitrógeno a través de los nódulos de las raíces de la leucaena y la capacidad de éstas para romper capas compactas y penetrar en estratos profundos del suelo, les permiten extraer nutrimentos como nitrógeno, fósforo, potasio y calcio los cuales son movilizadas hacia las hojas en donde se acumulan (Cuadro No. 1). Las hojas al caer e incorporarse al suelo se descomponen en humus, fertilizando y mejorando sus condiciones físicas y biológicas.

Existen dos formas en que la leucaena puede ser utilizada en el mejoramiento permanente de los suelos; una es dejar crecer a la planta sin perturbarla durante un largo período de tiempo para que la caída de las hojas aumente la materia orgánica del suelo, y por

consiguiente su fertilidad; este sistema es útil para mejorar los suelos de pastizales o predios agotados por un manejo irracional. El otro sistema es utilizado en las plantaciones de frutales, té y maíz el cual consiste en intercalar plantas de leucaena a las que se poda su follaje, incorporándolo al suelo donde se encuentran las plantaciones mencionadas. Bajo este sistema la leucaena es capaz de proveer a los cultivos un considerable volumen de nitrógeno y algo de fósforo, pudiendo de esta manera sustituirse o al menos reducirse la aplicación de fertilizantes químicos.

En los experimentos realizados por Guevarra y Brewbaker en la Universidad de Hawaii con dos variedades de leucaena, sembradas en surcos de 1.0 X 3.0 m. y cortadas a un metro de altura durante un año, se obtuvieron más de 550 Kg de N, 225 Kg de P_2O_5 y 550 Kg de K_2O por Ha / año, en el follaje cosechado, lo cual demuestra su valioso potencial (8). En otros experimentos realizados por Guevarra, se sembró leucaena en surcos a una distancia de 1.5 m. intercalando un surco de maíz por cada dos de leucaena, con lo cual cosechó más grano que en un lote fertilizado con 75 Kg de N. (9)

El uso de la leucaena como fertilizante y mejoradora del suelo puede ser importante en el trópico mexicano, principalmente en las grandes extensiones cerriles de temporal, en donde no es posible el uso de maquinaria y la aplicación de fertilizantes comerciales puede resultar antieconómico.

b) Arbol de sombra

Los primeros informes agronómicos sobre la leucaena, aparecieron a principios de siglo y se refieren a su utilización como árbol de sombra en plantaciones de café en la Isla de Java (10). Este uso ha venido extendiéndose en varios países asiáticos, gracias a las características de la leucaena como un árbol ideal para dar sombra a los cultivos que la requieran.

La compatibilidad de la leucaena con otros cultivos, se debe en gran parte a las características de crecimiento de su raíz, la cual penetra profundamente en el suelo, evitando con esto la competencia por nutrimentos con las raíces superficiales de los cultivos a los que dá sombra. La leucaena proporciona bastante sombra, minimizándose el número de árboles requeridos para este propósito en cultivos de café, té, cacao y fibras cuya producción suele ser mayor cuando son sombreados por leucaena; además dada la resistencia de esta planta a enfermedades y ataque de insectos, así como el hecho de no servir como huésped de plagas y enfermedades que atacan a los cultivos que dá sombra, se disminuyen los riesgos de pérdidas.

En México, solamente en algunas plantaciones de café del sur de la República se utilizan plantas de leucaena como sombra, las cuales siempre han sido parte de la vegetación nativa, no existiendo ejemplos de cultivos de leucaena como árbol de sombra, no obstante la importancia que esta planta puede tener en México para este propósito.

c) Control de la erosión

La leucaena es una planta valiosa en programas de control de la erosión por las características de su raíz, a su rápido crecimiento y adaptación en terrenos accidentados y rocosos. El humus formado por la defoliación de la planta así como el profundo y extenso sistema radicular de ésta, contribuyen a reducir la erosión causada por el agua en suelos sin vegetación, disminuyendo al mismo tiempo la evaporación y conservando más la humedad del suelo (11).

Las variedades conocidas como " Gigantes Hawaianas", son las que más ampliamente se utilizan para este fin. Se considera que esta planta es altamente resistente al viento debido a que su sistema radicular le proporciona buen anclaje, sobre todo en suelos porosos, por lo que para controlar la erosión por la acción del viento puede cultivarse esta planta y así formar cortinas rompevientos (10).

En México la leucaena no ha sido utilizada en programas de control de la erosión, aunque su ocurrencia en forma natural ha contribuido a este propósito. Debido a esto, la leucaena debería aprovecharse racionalmente para obtener los grandes beneficios que proporcionaría para el control de la erosión en México.

2.3.2. En la producción animal

a) Forraje

La Leucaena leucocephala es una de las leguminosas tropi-

cales que bajo buenas condiciones tiene una productividad forrajera comparable o superior a la alfalfa (Cuadro No. 2). Los rendimientos que se han reportado van de 12 a 20 toneladas de materia seca/hectárea, que es equivalente a una producción anual de 800 a 4300 Kg de proteínas/hectárea, cultivada en suelos con buen desagüe y fértiles, mientras que la producción de alfalfa es de 8 a 9 toneladas de materia seca/hectárea en las mismas condiciones. Pero en los suelos tropicales los rendimientos de ambos cultivos se reducen debido a los largos períodos de sequía que se llegan a presentar, sin embargo las buenas variedades forrajeras de leucaena dan rendimientos anuales de aproximadamente 8 toneladas de materia seca/hectárea, mientras que la producción de alfalfa se reduce hasta 2 a 3 toneladas/hectárea (12).

El follaje de la leucaena es de gran valor nutritivo como se muestra en los cuadros Nos. 3 y 4, por lo que es un ingrediente valioso en raciones para ganado y aves. Sin embargo, esta planta contiene en su follaje un aminoácido poco común que es la mimosina, la cual se encuentra en todas las partes de la planta en una concentración aproximada de 2-5% y tiene efectos tóxicos sobre los animales que la ingieren. Las ovejas que no están acostumbradas a comer leucaena pierden su lana en 7 o 14 días después de haber empezado a alimentarse con leucaena, y si continúa la alimentación en fuertes dosis se puede producir la muerte (13).

En aves, una dieta con más de 20% de leucaena afecta el emplume, disminuye el crecimiento y retarda su madurez sexual (14); en borregos, caballos, conejos y cerdos ocasiona alopecia (15).

Cuando se introduce a los ruminantes poco a poco en las praderas de leucaena, aumentan los microorganismos del rumen capaces de descomponer la mimosina, de forma que ésta deja de ser un problema para el animal pastante. El principal síntoma de la toxicidad en el ruminante es la alopecia, además de pérdida del apetito, salivación excesiva, falta de coordinación del paso, engrosamiento de las glándulas tiroides, mal rendimiento reproductor y producción de terneros con bocio que mueren en el momento de nacer (16). Los efectos tóxicos anteriormente mencionados se presentan cuando el ganado consume más de un 30% de leucaena en su dieta, por lo que eliminando la leucaena los animales intoxicados se recuperan, así se sugiere que para eliminar el efecto tóxico de ésta planta se dé a los animales combinado con otros forrajes en una proporción menor de 30%.

El producto de la descomposición de la mimosina en el rumen de los bovinos es el 3,4 dihidroxi piridina (DHP) el cual se ha demostrado como bociógeno (17), ya que impide la iodinación de la tirosina que es el primer paso de la síntesis de la tiroxina que conduce al bocio y a efectos secundarios como pérdida del apetito, mareo e incluso la alopecia que se observa en bovinos alimentados sólo con leucaena.

Por lo anterior, novillos alimentados con rastrojo de maíz suplementado con salvado de maíz y hojas secas de leucaena manifestaron aumentos diarios de peso de 1.0 a 1.7 Kg cuando los niveles de leucaena fueron de 50 y 20% respectivamente (18). También la utilización de leucaena como suplemento de la paja de arroz, permitió ganancias diarias de peso de 0.53, 0.38, y 0.36 Kg/día, suministrando un 60% de paja de arroz mas 40% de concentrado; 60% de paja de arroz mas 40% de hojas de leucaena secas, y 10% de paja de arroz con 90% de hojas de leucaena secas, respectivamente (19).

El alto contenido de proteína de la leucaena, la constituye en un valioso alimento para la producción de leche, ya sea asociada con gramíneas o complementada con concentrados (20). La utilización de leucaena como sustituto de las fuentes tradicionales de proteína, reduce los costos de alimentación del ganado. Los experimentos llevados a cabo en el sudeste de Queensland, con vacas pastantes en praderas mixtas de leucaena y panizo verde (Panicum maximum var. trichoglume) demostraron el potencial de leucaena, ya que durante un periodo de nueve meses se obtuvo un rendimiento de 6 290 Kg de leche/ hectárea con un contenido de 272 Kg de grasa y 215 Kg de proteína (21).

Es de gran importancia realizar una mayor investigación de los aspectos mencionados anteriormente, puesto que la determinación del manejo más adecuado de la leucaena, hará posible su mejor utilización.

2.3.3. Usos forestales

Como especie forestal la leucaena es una planta sumamente útil y puede ser utilizada en programas de reforestación, así como para la producción de madera y sus derivados.

a) Repoblación forestal

Actualmente hay una gran necesidad de proteger las áreas forestales y de reforestar las áreas devastadas, pero la mayoría de especies nativas tardan de 50 a 70 años para madurar, por lo que se ha visto la posibilidad de utilizar la leucaena en programas de reforestación debido a que es una planta de rápido crecimiento, además de que puede crecer en laderas inclinadas, en suelos marginados, en zonas con estaciones secas prolongadas y a que presenta una gran persistencia una vez establecida. Pero existe el inconveniente de que crece vigorosamente solo a bajas altitudes, siendo que grandes extensiones que necesitan reforestación se encuentran a elevadas altitudes, recomendándose su utilización en zonas que se encuentren a alturas menores de 1000 m. (3000 ft.). La hibridación con otras especies de leucaena tales como Leucaena diversifolia y Leucaena pulverulenta, representa una alternativa para lograr su adaptación en estas zonas.

b) Madera

Las variedades de leucaena arbórea recientemente descubiertas, crecen rápidamente (en 6 a 8 años alcanzan alturas de hasta 18 m)

por lo que proporcionan madera que puede ser utilizada para fines de construcción, además las pruebas iniciales que se han reportado acerca de la calidad de la madera son muy alentadoras por lo que tiene buenas posibilidades para convertirse en una fuente importante de pulpa y papel. Dentro de estos tipos se encuentra un gran número de ecotipos mexicanos, de los cuales una variedad recolectada en la costa de Guerrero denominada " K-8 " en Hawaii es la más sobresaliente; en Filipinas se reportan rendimientos de madera para esta variedad de 24 a 100 metros cúbicos anuales por hectárea (22).

La madera de leucaena se considera como semidura, fácil de trabajar que puede ser utilizada para pisos de parquet, postes y vigas para construcciones a bajo costo. Los árboles jóvenes de leucaena pueden ser utilizados para la fabricación de pulpa para papel, la cual es de alto contenido en holocelulosa y bajo en sílice, utilizable cuando se requiera de pulpa de fibra corta como componente de la mezcla de pulpas, con rendimiento aproximado de 50%.

Los tallos y las ramas de la leucaena han sido utilizadas como leña desde tiempos muy remotos en México, y a pesar de la forma irracional en que se ha explotado, su capacidad de regeneración la mantiene como una de las especies invasoras dominantes en grandes extensiones del trópico sub-húmedo.

c) Combustible

El valor calorífico de la madera de L. leucocephala de tres

años, se estima en 16 438.4 BTU/Kg y se incrementa con la edad del árbol, lo cual significa que menos de 2.75 Kg de leña de leucaena son equivalentes a un kilogramo de gas licuado de petróleo (23).

La madera de leucaena constituye un excelente material para la producción de carbón, ya que la edad del árbol está relacionada directamente con la calidad. El valor calorífico del carbón de leucaena es de 25 949 BTU/Kg que resulta inferior en 43% al del gas líquido de petróleo (22). En Filipinas se han plantado cientos de hectáreas de leucaena para combustible que se usarán para generar electricidad en caso de presentarse escasez de petróleo y para producir carbón.

d) Otros usos

Otro aspecto de interés es la posibilidad de hidrolizar la madera de leucaena para producir azúcar, que fermentada se transforma en alcohol, el cual puede ser usado solo o mezclado con gasolina como combustible en motores de combustión interna.

Uno de los usos dados a la leucaena en México desde antes de la conquista, es como hierba medicinal; las cualidades medicinales que tienen las semillas de la leucaena sobre parásitos intestinales es de bastante crédito, su utilización más generalizada es para la prevención o tratamiento de amibiasis. Recientes investigaciones han demostrado que la mimosina inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como E. coli y Salmonella thyphimurium (24).

El aprovechamiento de la leucaena como alimento humano en México, comprende los retoños de las hojas, los tallos jóvenes, las yemas florales y las semillas. Los retoños de las hojas y los tallos jóvenes son usados como condimento en los frijoles o en los "tacos".

Las semillas verdes es la forma más usual de consumo, ya sea desprendiéndolas directamente de las vainas con la boca, o utilizadas en la elaboración de salsas y entremeses.

En la población zapoteca de Teotitlán del Valle a pocos kilómetros de la ciudad de Oaxaca, se conserva una de las más antiguas tradiciones, consistente en el uso de algunos productos naturales, entre los que se encuentra el guaje para la coloración de sarapes.

Para este fin se hierven cortezas y vainas junto con las madejas a colorear y la tonalidad obtenida que varía de café a rojo, está determinada por el tiempo en ebullición y la madurez de la corteza y las vainas.

Finalmente las semillas maduras son utilizadas en México y en las Filipinas en la manufactura de artesanías, como son collares y pulseras, combinándose para este fin con otras semillas silvestres.

2.4. Antecedentes de Inoculación en Leucaena leucocephala

La leucaena pertenece a la familia Leguminosae, y al igual que las otras leguminosas se asocia con bacterias benéficas del suelo del género Rhizobium. Estos microorganismos penetran en las

raicillas jóvenes y se multiplican en su interior dando lugar a la formación de nódulos, así las bacterias absorben grandes cantidades de nitrógeno del aire de las capas superiores del suelo y lo combinan químicamente con el hidrógeno (obtenido de carbohidratos proporcionados por la planta) para producir compuestos nitrogenados que la planta necesita para su desarrollo.

Se ha reportado que la asociación simbiótica Leucaena-Rhizobium es capaz de fijar anualmente más de 500 Kg de N/Ha/año, que es equivalente a 2500 Kg de sulfato de amonio/Ha/año (25). Sin embargo la fijación de nitrógeno ocurre solamente si la especie de Rhizobium correcta está presente en el suelo, ya que ésta leguminosa en particular muestra una gran especificidad por la cepa de Rhizobium que pueda infectarla efectivamente, lo cual se explica con detalles mas adelante.

En lugares donde la leucaena crece en forma natural, la bacteria se encuentra ampliamente distribuida, mientras que en áreas donde la leucaena no ha crecido antes, la semilla debe ser inoculada con la especie de Rhizobium apropiada antes de la siembra. Las plantas de leucaena cuando no se encuentran noduladas efectivamente son por lo general poco desarrolladas, improproductivas, de color verde pálido o amarillo en su follaje y un contenido bajo de proteínas en el mismo.

El uso de inoculantes en la siembra de leucaena, aunque no es determinante para su establecimiento, representa un incremento en

productividad, especialmente cuando se trata de establecer en praderas, por lo que se recomienda ampliamente la inoculación como un paso de gran importancia para asegurar el establecimiento de esta leguminosa.

La utilización de inoculantes en el trópico mexicano, se ve impedida por la poca existencia de éstos en el mercado, y por los problemas asociados a estos tipos de suelos que son la de ser generalmente ácidos con bajos niveles de fósforo y calcio, además de contener dosis elevadas de aluminio y manganeso, los cuales se han reportado como factores tóxicos que afectan la nodulación (26).

Los problemas asociados al establecimiento de esta planta en los suelos del trópico mexicano se explican con más detalle en la siguiente sección.

2.5. Problemas relacionados con la asociación Rhizobium-legumino-sa y efectos sobre el establecimiento de Leucaena leucocephala en suelos tropicales.

2.5.1. Especificidad Rhizobium-huésped

La especificidad entre la bacteria de los nódulos radiculares y las leguminosas, puede manifestarse a todos niveles en la asociación entre los simblotes, pero las etapas más importantes son la infección por Rhizobium y la efectividad en la fijación de nitrógeno.

Esas especificidades empiezan con diferencias en la estimumu

lación de las poblaciones rizosféricas iniciales, de inóculo aplicado a la semilla o de cepas nativas en el suelo, colonización de la superficie radicular, las fases de infección y desarrollo nodular y finalmente las respuestas de efectividad en la fijación de nitrógeno. También el ambiente puede afectar a cada uno de los simblontes y obrar entre sí o recíprocamente a todos los niveles de asociación.

Para tratar de explicar este aspecto de la asociación, haremos una breve revisión acerca del origen de la simbiosis. Las leguminosas se dividen en tres subfamilias que son: Caesalpinaceae, Mimosaceae y Papilionaceae que contienen aproximadamente de 500 a 700 géneros con 12000 a 17800 especies, según Norris (27) la simbiosis se originó antes de la división en subfamilias y no fue una simbiosis especializada, así el componente bacterial también se ha especializado y evolucionado con el fin de que las plantas adaptadas a los suelos más fértiles requieran un rizobio de crecimiento rápido productor de acidez, mientras que aquellas especies que conservan características de las plantas primitivas también retienen rizobios de crecimiento lento productores de alcalinidad, por lo que la separación de los rizobios en los de crecimiento lento productores de alcalinidad y de crecimiento rápido productores de acidez ha sido el resultado de un proceso de selección debido al medio ambiente.

Mientras que las leguminosas se adaptaron a las condiciones neutras y alcalinas, su rizobio también desarrolló una habilidad

para producir acidez como mecanismo de supervivencia. Debido a las variaciones de clima y suelo durante el proceso de evolución, no todas las leguminosas tropicales actuales están adaptadas a su baja fertilidad y rizobios de crecimiento lento, por ejemplo se considera la Leucaena leucocephala como una leguminosa tropical, pero viene de suelos fértiles alcalinos y nodula efectivamente con rizobios de crecimiento rápido, productores de acidez. Por lo anterior, se puede criticar la idea muy común de que todas las leguminosas tropicales del grupo "caupi" requieren de rizobio no especializado de crecimiento lento.

De acuerdo a lo anterior, el mismo Norris (41) considera que las leguminosas más primitivas (Caesalpinaceae) tienen un tipo de asociación promiscua, es decir tienen una amplia capacidad de inoculación cruzada, y que a medida que se aumenta la especialización del huésped se va perdiendo esta capacidad, llegando a adquirir una gran especificidad por la cepa de Rhizobium originándose así el concepto de grupo de inoculación cruzada, dando por resultado la actual clasificación de los rizobios en grupos de inoculación tales como: grupo Trébol, grupo Pisum, grupo Phaseoli, grupo Soya, etc.

Lo anteriormente explicado concuerda con los resultados reportados por Trinick (28) ya que encontró respuesta a la inoculación de leucaena en áreas donde otras leguminosas crecían y nodulaban vigorosamente sin inoculación.

También las pruebas de inoculación cruzada realizadas en Brasil por Galli (29) con bacterias aisladas de los nódulos de varias leguminosas tropicales, mostraron que Leucaena leucocephala presenta una gran especificidad por la cepa de Rhizobium que puede infectarla, ya que únicamente nodula efectivamente cuando se inocula con bacterias aisladas de la misma especie, pero falla cuando se inocula con bacterias aisladas de otra especie de leguminosa.

2.5.2. Efecto de la acidez sobre la simbiosis Rhizobium-leguminosa

Se sabe que el pH del suelo tiene un marcado efecto sobre la iniciación de la nodulación y la eficiencia de la simbiosis, ya que existen diversos estudios acerca del efecto de la acidez sobre los eventos antes mencionados, por ejemplo: Van Schreven (30) indica que el rizobio sufre alteraciones morfológicas en perjuicio de su infectividad y efectividad bajo condiciones de acidez; Kornelius y Stammel (31) reportan que el efecto de la acidez sobre la nodulación es en forma indirecta, impidiendo la absorción de nutrimentos como fósforo, calcio y molibdeno por la planta, Ming-Huei (32) indica que el efecto de la acidez sobre la nodulación es por la solubilización de elementos tóxicos como aluminio y manganeso, los cuales interfieren en la asimilación de fósforo.

Munns (33) tratando de estudiar el mismo efecto, logró la

sobrevivencia del rizobio aislado de Medicago sativa en solución nutritiva ácida, mediante la adición de inóculos masivos del rizobio, sin embargo observó que la acidez del medio impedía el encurvamiento de los pelos radicales de la planta y que solo se lograba el encurvamiento cambiando el pH de 4.4 a 5.4, posteriormente volvió a bajar el pH del medio y observó que el proceso de encurvamiento y nodulación ya no se detenía, lo cual sugiere que la prevención de nodulación por efecto de acidez en soluciones nutritivas puede atribuirse a la prevención de una etapa ácido sensitiva que coincide con el encurvamiento de los pelos radicales y no ser la etapa de multiplicación de los rizobios la etapa inhibida como se piensa.

Aunque el mecanismo de la nodulación de las leguminosas tropicales es menos conocido, ésta puede ser la forma en que se afecta la nodulación debido a la acidez del suelo, además también se sabe que las cepas de Rhizobium difieren en su resistencia al pH, siendo más tolerantes los pertenecientes al grupo "caupi" (34).

2.5.3. Efecto del aluminio soluble sobre el sistema simbiótico Rhizobium-leguminosas.

Aunque los efectos de pH bajo de un suelo, implica generalmente niveles elevados de aluminio, no hay evidencias de que la tolerancia del rizobio a la acidez implique también tolerancia a concentraciones elevadas de aluminio, lo cual indica que la forma en que afecta

la acidez sobre el rizobio es diferente a la forma en que afecta el aluminio. Los resultados reportados por Keyser y Munns (35) muestran que aún las cepas tolerantes a la acidez son sensibles al aluminio, manifestándose esto en la reducción de su velocidad de crecimiento y en el retardo de la fase lag. Aproximadamente el 40% de las cepas probadas tolerantes a pH 4.5 no pudieron resistir la toxicidad al aluminio que normalmente se asocia con la acidez del suelo.

Por otro lado también se sabe que el aluminio tiene efectos sobre las células radiculares de las plantas a nivel de división celular, ya que hay evidencias de que en éstas células se altera la síntesis de DNA, hay anafases incompletas y separación deficiente de las células aún cuando la réplica del genoma se ha efectuado; por lo que se puede ver impedida la penetración de la raíz en el suelo y la posterior utilización de nutrimentos y humedad, fallando el proceso de infección y nodulación aún cuando la población de la rizósfera pueda ser suficientemente grande para propiciarla (36).

Finalmente, C.S. Andrew (37) indica que los suelos ácidos se relacionan con la baja disponibilidad de calcio y fósforo así como altos niveles de aluminio, y la combinación de estos factores dá por resultado interacciones nutricionales complejas, que resume como sigue:

- a) Un incremento en la concentración de iones hidrógeno en el suelo, provoca un incremento de aluminio en solución y re-

- ducción de calcio y fósforo en solución del suelo.
- b) el aumento de iones hidrógeno y aluminio dañan el sistema radicular de la planta y reduce la incorporación y traslocación de calcio y fósforo por la planta.
 - c) los bajos niveles de calcio en la planta nuevamente reducen la incorporación de fósforo y ésto acentúa la fijación del fósforo en el suelo.
 - d) el efecto combinado de éstos factores inhiben o minimizan el inicio de la nodulación, resultando una baja eficiencia de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.
 - e) los bajos niveles de nitrógeno en la planta, reducen los fotosíntatos y la posibilidad de otro proceso de nodulación y crecimiento.

De lo antes descrito, partió nuestro interés de orientar este trabajo hacia el estudio de la adaptación, selección y nodulación de cepas de Rhizobium específico de Leucaena leucocephala en condiciones de acidez y de altos niveles de aluminio, tanto en pruebas de laboratorio como de invernadero.

CUADRO No.1. Elementos fertilizantes en follaje de leucaena seca **

Elemento Nutriente	Por ciento de peso seco
Nitrógeno	2.2 - 4.3
*Fósforo	0.2 - 0.4
*Potasio	1.3 - 4.0
Calcio	0.8 - 2.0
Magnesio	0.4 - 1.0

*Proporcionado principalmente por la formación de micorrizas con hongos del suelo.

CUADRO No. 2. Producción comparativa entre leucaena y alfalfa bajo condiciones favorables. **

	Leucaena	Alfalfa
Materia seca comestible (Ton/Ha)	10 - 20	8 - 9
Producción anual de proteína (Kg/Ha)	600 - 4300	400 - 600

** Tomados de referencia 23

CUADRO No. 3. Composición química del follaje de alfalfa y leucaena en base seca.*

	Leucaena	Alfalfa
Cenizas Totales (%)	11.0	16.6
Nitrógeno total (%)	4.2	4.3
Proteína cruda (%)	25.9	26.9
Calcio (%)	2.36	3.15
Fósforo (%)	0.23	0.36
Beta carotenos (mg/kg)	536.0	253.0
Energía bruta (KJ/kg)	20.1	18.5
Taninos (mg/g)	10.15	0.13

* Tomado de referencia 23

CUADRO No.4. Composición en aminoácidos de la proteína de alfalfa y Leucaena (mg de aminoácido/ g de N) *

	Leucaena	Alfalfa
Arginina	294	357
Cistina	88	77
Histidina	125	139
Isoleucina	563	290
Leucina	469	494
Lisina	313	368
Metionina	100	96
Fenilalanina	294	307
Treonina	231	290
Tirosina	263	232
Valina	338	356

* Tomado de referencia 23

III. MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental realizado se efectuó en varias etapas de la manera siguiente:

3.1. Recolección de nódulos, aislamiento y purificación de cepas.

Se realizó un recorrido de campo para buscar plantas de leucaena nativas en los estados de Morelos y Veracruz, con el fin de localizar y recolectar nódulos característicos de la asociación Rhizobium-leguminosa. Una vez localizadas las plantas se hicieron excavaciones para localizar los nódulos presentes en las raíces laterales, escogtiéndose los más grandes que presentaran una coloración rosada, enseguida se recolectaron en un frasco de solución isotónica estéril, los cuales posteriormente se trasladaron al laboratorio, para iniciar el aislamiento de la bacteria.

Para efectuar el aislamiento se lavó el nódulo con agua corriente, con el fin de eliminar el grueso de la superficie contaminada, después se coloca el nódulo por un instante en etanol al 95% y luego se sumerge en una solución de $HgCl_2$ al 0.1% acidificado durante 5 minutos, después se lava con agua destilada estéril por lo menos durante 6 veces.

Una vez realizada la desinfección, el nódulo se presiona asépticamente con dos portaobjetos previamente esterilizados para liberar el jugo nodular de aspecto lechoso, el cual se toma con una asa y se extiende sobre placas de agar extracto de levadura, manitol rojo congo

(AELMR) cuya composición se muestra en el cuadro No. 5.

Las placas sembradas se incuban a 28°C durante 24-28 horas y se buscan colonias aisladas a lo largo de las estrías, que correspondan al desarrollo esperado de *Rhizobium*, a las colonias seleccionadas se les hace tinción de Gram para comprobar las características morfológicas del rizobio y su pureza, enseguida se siembran en tubos conteniendo el mismo medio de aislamiento inclinados, se incuban a 28°C durante 24-28 horas y se guardan en refrigeración para su posterior uso. El lugar de recolección de las cepas, y características del suelo se muestran en el cuadro No. 6.

3.2 Caracterización de las cepas de Rhizobium.

Las siguientes pruebas realizadas son las que se recomiendan para caracterizar a *Rhizobium* en forma presuntiva, además de que proporcionan información acerca del comportamiento ácido, alcalino o neutro de los rizobios. Al mismo tiempo se probaron dos cepas proporcionadas por el CIAT y la FM-721 originaria de Tabasco*, llevándose a cabo todas las pruebas por triplicado como se describen a continuación.

3.2.1 Crecimiento en medio Glucosa-peptona agar.

Aunque este medio no es específico para *Rhizobium*, su utili -

*Proporcionada por el laboratorio de Microbiología de Suelos de FER TIMEX.

dad radica en que permite diferenciar a Rhizobium de otros microorganismos semejantes, que por observación microscópica pudieran confundirse con él. En este medio se desarrollan más rápidamente los microorganismos contaminantes que los rizobios, además se detectan cambios de pH del medio por el virre del indicador, el cual vira a amarillo en presencia de acidez y a púrpura intenso en presencia de álcali. La composición de este medio se muestra en el cuadro No. 7.

3.2.2 Crecimiento en medio de Norris*

Este medio permite caracterizar a los rizobios como productores de acidez, productores de alcalinidad o de comportamiento neutro. La composición de este medio de cultivo se muestra en el cuadro No. 8.

La siembra se hizo en tubos de cultivo con medio inclinado mediante el método de estría, enseguida se incubaron a 28°C durante 28 días. Después se adicionó 10 ml de agua destilada estéril a cada uno de los tubos y se dejan reposar durante 24 horas, enseguida se determina el pH con el potenciómetro Corning 125.

3.2.3. Crecimiento en medio de Extracto de levadura, manitol agar adicionado de azul de bromotimol.

Este medio cuya composición se muestra en el cuadro No. 9,

*Tomado de referencia 41.

se utiliza también para observar si las cepas producen ácido o álcali en el medio, ya que el indicador adicionado proporciona un color verde esmeralda a pH neutro, si el desarrollo del rizobio da reacción ácida el color vira a verde claro o amarillento, mientras que si da reacción alcalina lo cambia hacia azul, permaneciendo sin cambio cuando es de comportamiento neutro .

3.3. Efecto del pH, fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento del rizobio específico de L. leucocephala.

Estas pruebas se llevaron a cabo con las cepas aisladas de Morelos, Veracruz y la FM-721, las cuales se siembran en diferentes medios de cultivo. La metodología y composición de los medios de cultivo se describen a continuación.

3.3.1 Preparación del Inóculo de Rhizobium e Inoculación de los medios prueba.

Las tres cepas se sembraron en tubos con medio de cultivo líquido de ELMR (Cuadro No. 5), sin CaCO_3 ni rojo congo para evitar problemas de turbiedad y color en el medio a inocular; se incubaron a 28°C durante 48 horas en agitador Shaker Model G 2 a 180 rpm.

Después se inocularon los medios con cada una de las cepas propagadas, se homogenizó la suspensión y se tomaron muestras de 10 ml en condiciones asépticas, con las que se determina número

de células viables por cuenta en placa, turbiedad y variación de pH.

Se incubaron los matraces inoculados a 28°C durante 10 días en agitación constante (180 rpm) tomándose muestras cada 24 horas - en las que se llevan a cabo las determinaciones antes mencionadas.

3.3.2 Medio de cultivo líquido de Extracto de levadura, manitol pH 7

Se preparó el medio de cultivo como se indica en la sección anterior, se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos 170 ml aproximadamente los cuales se esterilizan a 15 lb de presión durante 15 minutos.

3.3.3. Medio de cultivo líquido para adaptar cepas de Rhizobium a la acidez de pH 4.2*.

La composición de este medio se muestra en el cuadro No. 7 . El medio de cultivo se prepara sin tiamina y biotina, se ajusta el pH a 4.2 con HCl 0.1 N y se vacía un volumen aproximado de 170 ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se esterilizan y una vez fríos se les agrega la tiamina y biotina en solución previamente esterilizadas por filtración.

3.3.4. Medios de cultivo modificados para adaptar cepas de Rhizobium a la acidez.

La composición basal de estos medios es la misma que el anterior,

* Tomado de referencia 44.

solo que la fuente de carbono varía, en uno de ellos se utiliza manitol y en otro galactosa. El pH de ambos medios se ajusta a 4.2 con HCl 0.1 N sin tiamina y biotina; se esterilizan en matraces Erlenmeyer de 250 ml y cuando se enfrían se les adiciona la solución de tiamina y biotina previamente esterilizada.

3.4. Pruebas de infectividad de las cepas de Rhizobium en jarras de Leonard en condiciones de invernadero.

Para realizar estas pruebas se utilizó como soporte arena de río tamizada y lavada, con la que se empaca cada una de las jarras tal como se recomienda en el manual de Vincent (38), se les adiciona agua destilada para humedecerlas y se esterilizan a 15 lb de presión durante 3 horas, enseguida se montan las jarras con la solución de Norris para plántulas cuya composición se muestra en el cuadro No. 11. Las semillas de leucaena que se utilizaron para realizar estas pruebas son variedad peruana, las cuales se escarifican con ácido sulfúrico concentrado durante 17 minutos y se lavan inmediatamente con abundante agua destilada estéril, después se siembran cuatro semillas en cada jarra.

Cuando aparecen las primeras hojas verdaderas (aproximadamente 14 días después de la siembra), se seleccionan las dos plantas mejor desarrolladas, las cuales se inoculan con 1 ml de inóculo el cual contenía 10^9 rizobios viables/ml. Al mismo tiempo se hicieron

non pruebas testigo con plantas sin inocular, la aplicación de nitrógeno a los testigos positivos se hizo adicionando 70 ppm de nitrato de potasio a la solución de Norris, después de la inoculación se agregó una capa de arena estéril alrededor de la planta para evitar la contaminación. La duración del experimento fué de 12 semanas, después de las cuales se procedió a evaluar la infectividad de las cepas por la nodulación de las plantas, comparándolas con las plantas sin inocular.

3.5. Pruebas de adaptación de las cepas de Rhizobium a concentraciones crecientes de aluminio en medio de pH ácido.

Debido a los resultados de crecimiento obtenidos en las pruebas de la sección 3.3. se seleccionó el medio de cultivo líquido arabinosa-glutamato de sodio de pH 4.2 (Cuadro No. 7) para llevar a cabo estas pruebas por duplicado.

Se sembraron las cepas aisladas de Morelos y Veracruz, la Tabasco (FM-721), CIAT-1923 y CIAT-1931, se incubaron a 28 °C durante 72 horas en agitación constante (180 rpm) y se determinó el número de rizobios viables/ml. También se tomaron muestras de 10 ml que se inocularon a otra serie de matraces con el mismo medio de cultivo pero con 5 ppm de aluminio, una vez inoculados los matraces, éstos se incubaron nuevamente en las condiciones ya mencionadas, determinando cuenta viable al final de la incubación de cada

uno de los cultivos. Así se lleva a cabo, por pases sucesivos la adaptación de las cepas a concentraciones crecientes de aluminio -- (10, 20, 30, 40, 60 ppm de aluminio).

La adición del aluminio se realizó después de esterilizar -- el medio de cultivo, en forma de solución acuosa de $Al_2(SO)_4$ esterilizada por filtración; para controlar el descenso de pH al adicionar la solución de aluminio se agregó al medio verde de bromocresol -- al 0.5% con el fin de observar la variación del pH y reajustar el --- mismo a pH 4.2 con solución estéril de NaOH 0.1 N .

En cada adición de solución de aluminio a los medios de --- cultivo, se hizo la cuantificación del aluminio soluble por el método de Aluminón (39), ya que podría precipitar como fosfato de aluminio y disminuir su toxicidad.

3.6. Comportamiento de las cepas de Rhizobium con mayor tolerancia al aluminio en pruebas de inoculación con L. leucocephala en en un suelo de pH ácido y niveles elevados de aluminio.

Este experimento se llevó a cabo con las cepas que presentaron más tolerancia al aluminio en el experimento anterior, siendo seleccionadas la cepa Tabasco, CIAT-1923 y CIAT-1931, para lo --- cual se utilizaron macetas con capacidad de 1.2 Kg de suelo, con un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. El objetivo de este experimento es el de probar la nodulación de plantas de leucaena con

cepas adaptadas a niveles crecientes de aluminio (C A), y cepas -
sin adaptar (S A), utilizándose un suelo ácido proveniente de Tierra
Colorada, situada a 35 Km del puerto de Acapulco cuyas caracterís--
ticas físicas y químicas se muestran en el cuadro No. 12.

Dadas las características del suelo, se establecieron los si-
guientes tratamientos:

- i) Suelo sin tratar o natural (N) .
- ii) Suelo encalado y fertilizado con fósforo (P C a).

Para ésto se calculó la cantidad de CaCO_3 necesaria siguiendo el
procedimiento de Mc Keague (40) que se resume en el cuadro -
No. 13 El suelo de cada maceta se mezcló individualmente con -
el calcio y se llevaron a capacidad de campo dejándolas en reposo
durante dos semanas, después se verifica que el pH del suelo se -
encuentre cercano a la neutralidad. Antes de la siembra se adicio-
na a cada maceta 0.0205 g de KH_2PO_4 , que equivalen a 200 Kg de
 P_2O_5 / Ha aproximadamente.

- iii) Suelo fertilizado con fósforo, adicionado de aluminio (P Al).

El suelo de cada maceta se mezcla con 0.205 g de KH_2PO_4 y 0.148
de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ equivalente a 200 Kg de P_2O_5 / Ha y 10 ppm de -
aluminio respectivamente.

- iv) Controles nitrogenados.

En este experimento se incluyeron controles nitrogenados corres-
pondientes a cada uno de los tratamientos antes mencionados. Se

utilizó sulfato de amonio en solución para fertilizar los controles positivos, dosificando la solución 2 semanas después de la inoculación de los tratamientos. El nivel de nitrógeno adicional do fué equivalente a 100 Kg de N / Ha.

3.6.1 Preparación de la semilla, siembra e inoculación.

Las semillas de leucaena variedad peruana se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado y se sembraron 5 semillas por maceta, se dejaron durante dos semanas hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas en que se seleccionaron las dos plantas mas vigorosas para efectuar la inoculación.

El inóculo de las cepas se preparó en medio de cultivo líquido ELMR (Cuadro No. 5), sembrándose las tres cepas adaptadas (C A) de la sección 3.5. (Tabasco, CIAT-1923 y CIAT-1931) en matraces Erlenmeyer de 125 ml con medio de cultivo, y, en otros matraces con el mismo medio se sembraron las mismas cepas, pero sin adaptar (S A) es decir cepas que se conservaron en refrigeración desde su aislamiento y que no han estado sometidas al efecto del aluminio, los matraces se incubaron durante 72 horas en agitación constante a 28°C y se determinó el número de rizobios viables a cada cultivo.

Cada maceta se inoculó con 5 ml del cultivo del Rhizobium correspondiente sobre la superficie del suelo y al pie de la raíz de -

las plantas, tapándolas inmediatamente con una capa de suelo. Los riegos se efectuaron cada tercer día a partir del cuarto día después de la inoculación, con agua de la llave dadas las características del suelo, el experimento duró 12 semanas en invernadero a 28 °C, después de las cuales se procedió a evaluar el efecto de inoculación.

3.6.2. Recuperación del rizobio de plantas noduladas.

De las plantas noduladas, se procedió a realizar el aislamiento del rizobio siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.1. posteriormente se sembraron las cepas aisladas en matraces con medio de cultivo líquido arabinosa-glutamato de sodio de pH 4.2 conteniendo 30 ppm de aluminio, los matraces se incubaron a 28 °C durante 72 horas en agitación constante y se determinó el número de rizobios viables/ml de cada uno de los cultivos.

IV. RESULTADOS.

Los resultados se presentarán de acuerdo al orden en que se realizó la parte experimental.

4.1. Aislamiento y purificación de cepas de *Rhizobium*.

Se aislaron dos cepas, una del estado de Morelos y otra del estado de Veracruz, las cuales al crecer en medio AELMR formaron colonias convexas, de 5mm de diámetro aproximadamente, de color rosa claro, transparentes, brillantes y de aspecto gomoso.

La observación microscópica de ambas cepas correspondió a bacilos Gram negativos, pequeños con extremos redondeados, no mostraron esporas o cápsulas.

4.2 Caracterización de las cepas de *Rhizobium*.

Los resultados de esta parte experimental se resumen en el cuadro No. 14, donde se muestra que las cinco cepas probadas crecieron en el medio de glucosa-peptona agar después de 24 horas de incubación. La cepa Tabasco se caracterizó como de reacción neutra y la cepa de Morelos como productora de acidez en todos los medios probados, mientras que el comportamiento de las otras cepas es variable en cada uno de los medios.

4.3. Efecto del pH, fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento del rizobio específico de *L. leucocephala*.

Las mediciones turbidimétricas de los cultivos se muestran en las figuras No. 1, 2 y 3 en las que se observa que se obtuvieron mayores valores de D.O. en el medio de ELMR de pH 7 que en los medios de pH 4.2 a partir de las 24 horas de incubación con todas las cepas probadas. La determinación del número de rizobios viables por ml en los medios de pH 4.2 fué de 10^{12} aproximadamente, mientras que en los medios de ELMR fué de 10^8 al cuarto día de incubación, como se muestra en las figuras 4, 5 y 6. En las mismas figuras se observa la variación del pH de los medios de cultivo durante el experimento, notándose que el pH del medio ELMR pH 7 se mantuvo -- cercano a la neutralidad durante los primeros cinco días de incubación y aumentó a pH 8 después con las tres cepas probadas.

En los medios de pH 4.2 donde se utilizó arabinosa o galactosa como fuente de carbono, se presentó un descenso del pH, llegando a valores de 2.8 con galactosa y 3.3 con arabinosa a partir del tercer día de incubación. Sin embargo con manitol como fuente de carbono se observó la alcalinización de los medios a valores de pH 6.8 al tercer día de incubación, estabilizándose el pH en valores de 6.5, 6.0 y 6.2 con las cepas Morelos, Veracruz y Tabasco respectivamente a partir del octavo día de incubación.

4.4. Pruebas de infectividad en jarras de Leonard a nivel de invernadero.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la figura -

No. 7, donde se observan los efectos de nodulación en las plantas de leucaena inoculadas con las cepas probadas, obteniéndose mejor efecto de nodulación con la cepa Morelos. No se observó nodulación en los tratamientos control.

4.5. Pruebas de adaptación de las cepas de Rhizobium a concentraciones crecientes de aluminio en medio de pH ácido.

Los resultados se muestran en la figura No. 8, en la que se observa el efecto del aluminio sobre la viabilidad del rizobio a medida que se aumenta la cantidad del aluminio soluble en el medio. Se observaron diferencias en la tolerancia de las cepas al aluminio, siendo las más sensibles las cepas Morelos y Veracruz, afectándose su viabilidad a concentraciones mayores de 30 ppm de aluminio en el medio, mientras que con las cepas Tabasco, CIAT-1923 y CIAT-1931 se observó un descenso gradual en la población de rizobios hasta el intervalo de 30-45 ppm en que el número se mantiene constante en valores de $10^8 - 10^9$ rizobios viables / ml, impidiéndose su sobrevivencia al someterlas a 60 ppm de aluminio.

4.6. Comportamiento de las cepas de Rhizobium con mayor tolerancia al aluminio en pruebas de inoculación con leucaena, en un suelo ácido con niveles elevados de aluminio.

El número de rizobios inoculados a las plantas se muestra en el cuadro No. 15. Los resultados de nodulación en suelo natural fueron

negativos tanto en plantas inoculadas con cepas sin adaptar, como con cepas adaptadas. El crecimiento de las plantas se observó - muy raquítico llegándose a presentar efectos claros de clorosis - en ellas, además de que presentaron poco desarrollo de raíces.

En suelo encalado y fertilizado con fósforo (P Ca) las - pruebas de inoculación con cepas sin adaptar dieron resultados - negativos con todas las cepas, mientras que con cepas adaptadas si se observó efecto de nodulación en plantas inoculadas con las cepas Tabasco y CIAT-1923 como se muestra en las figuras Nos. 9- y 10. En estas plantas se observó un desarrollo normal de raíces laterales y de raíz principal, además de que no se observan efectos de clorosis.

En las pruebas con suelo fertilizado con fósforo y niveles elevados de aluminio (P Al) no se observó efecto de nodulación - en ninguna de las plantas inoculadas tanto con cepas sin adaptar - como con cepas adaptadas. La característica principal que presentaban todas las plantas incluyendo los controles nitrogenados es que presentaban alteraciones en la raíz, la cual se observó poco desarrollada, sin raicillas laterales y muy engrosadas como se observa en las figuras Nos. 11 y 12.

Las cepas que se aislaron de las plantas noduladas fueron las de Tabasco y CIAT-1923 con las que se obtuvieron 10^9 rizobios viables / ml en el medio de cultivo líquido arabinosa-glutamato de sodio con 30 ppm de aluminio.

**CUADRO No.5. Medio de Cultivo Extracto de Levadura Manitol
Rojo Congo (ELMR)**

Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
$CaCO_3$	3.0 g
Rojo congo dil (1:400)	10.0 ml
H_2O destilada	1000 ml

Se ajusta el pH del medio a 6.9 - 7.0 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El medio sólido (AELMR) contiene 15 g de agar por litro.

CUADRO No. 6. Sitios de aislamiento de las cepas de Rhizobium huésped de L. leucocephala y análisis físicoquímico de esos suelos.

I. Sitio de aislamiento

Axochiapan,
Morelos

Jalapa,
Veracruz

II. Determinación

Metodología*

Color (base seca)	10 YR 5/1 gris	10 YR 3/2 café oscuro	Tablas Munsell
Color (base húmeda)	10 YR 3/1 gris oscuro	10 YR 2/2 café oscuro	"
pH agua (1:2.5)	8.0	5.2	Potenciométrica
Textura	franco arenosa	franco arcillo-arenosa	Bouyucos
M.O. (%)	2.17	24.8	Walkley-Black
Nitrógeno Total (%)	0.127	1.234	Macrokjeldahl
C.I.C.T. (meq/100 g)	12.0	39.1	Calcio-Magnesio Verseno
Fósforo (ppm)	28.6	28.0	Bray P-1
Aluminio extraíble (ppm)	-	16.0	Aluminón

* Tomada de referencia 45

CUADRO No.7. Medio de Cultivo Glucosa - Peptona Agar (GPA)

Glucosa	10.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Sol. alcohólica de púrpura de bromocresol al 1 %	10.0 ml
H ₂ O destilada	1000 ml

-
- Disolver el agar y la peptona en el agua y calentar a ebullición durante 1 minuto.
 - Agregar la glucosa y el indicador, esterilizar a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

CUADRO No. 8. Medio de Cultivo de Norris

Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.8 g
$FeCl_3$	0.01g.
Sol. alcohólica de azul de bromotimol al 0.4 %	5.0 ml
Agar	20.0 g
H_2O destilada	1000 ml

Ajustar el pH del medio a 7.2 y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

**CUADRO No. 9. Medio de Cultivo Agar Extracto de levadura
Manitol adicionado de Azul de Bromotimol
(AELMA_b)**

Manitol	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Sol. alcohólica de azul de bromotimol al 0.5 %	5.0 ml
Agar	15.0 g
H ₂ O destilada	1000 ml

Ajustar el pH del medio a 7.0 y esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

CUADRO No. 10. Medio de Cultivo para adaptar cepas de Rhizobium a la acidez (Date-Halliday)

KH_2PO_4	68.0 mg
K_2HPO_4	87.0 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	39.4 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	74.0 mg
FeNaEDTA	38.8 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.49mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.29mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	43.0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	12.0 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.2 ug
Glutamato de sodio	220.0 mg
* Tiamina	100.0 ug
* Biotina	250.0 ug
Arabinosa	10.0 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH del medio a 4.2 con HCl 0.1 N

* Esterilizar por filtración

CUADRO No. 11. Solución de Nutrientes de Norris

KCl	0.141 g
K_2HPO_4	0.236 g
$CaSO_4 \cdot 2 H_2O$	0.687 g
$MgSO_4 \cdot 2 H_2O$	0.380 g
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.100 mg
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.200 mg
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	2.000 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.100 mg
$Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$	2.200 mg
$CoSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.020 mg
*FeNaEDTA	1.000 ml
Agua destionizada	1.000 l

* Preparación de FeNaEDTA

- 1.- Disolver 8.9 g de EDTA ácida en 90 ml de NaOH 1 N
- 2.- Disolver 8.34 g de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ en 100 ml de agua
- 3.- Agregar lentamente la sol 1 a la sol 2 y mezclar
- 4.- Aforar a 300 ml y guardar en frasco ámbar

CUADRO No. 12. Análisis fisicoquímico del suelo de Tierra Colorada, municipio de Acapulco, Gro.

Determinación	Valor	Metodología*
Color (base seca)	5 YR 5/8 rojo amarillento	Tablas de Munsell
Color (base húmeda)	5 YR 4/6 rojo amarillento	"
pH agua (1 :2.5)	5.3	Potenciométrica
Textura	franco arcillo-arenosa	Bouyucos
M.O. (%)	0.27	Walkley-Black
C.I.C.T. (meq/100 g)	7.85	Calcio-Magnesio Versano
Nitrógeno Total (%)	0.03	Macro Hjeldhal
Fósforo (ppm)	1.57	Bray P-1
Aluminio extraíble (ppm)	30	Aluminón

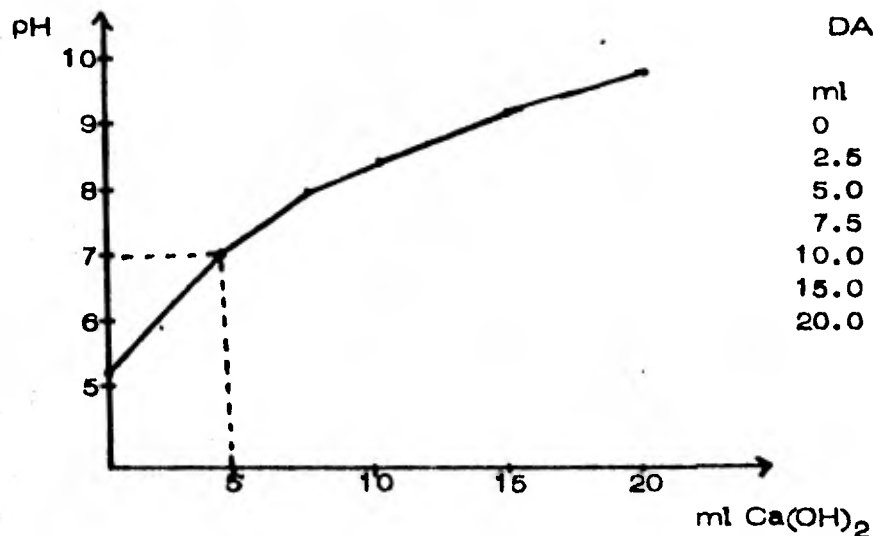
* Tomada de referencia 45

CUADRO No. 13. Cálculos de requerimientos de encalado del suelo ácido de Tierra Colorada, municipio de Acapulco Gro.

- 1.- Se hacen pesadas de 10 g de suelo seco y se colocan en siete matraces Erlenmeyer de 50 ml.
- 2.- Se adiciona solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.02 M y agua desionizada a los matraces de la siguiente manera:

Matraz	1	2	3	4	5	6	7
ml H_2O	25	22.5	20	17.5	15	10	5
ml $\text{Ca}(\text{OH})_2$	0	2.5	5	7.5	10	15	20

- 3.- Se tapan herméticamente los matraces y se ponen en agitación durante una hora.
- 4.- Se dejan reposar 5 minutos y se determina el pH de cada una de las suspensiones.
- 5.- Se grafican las lecturas de pH vs. las cantidades de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ adicionadas, y se selecciona el nivel en que el pH del suelo se neutraliza.
- 6.- Se calcula el poder neutralizante de la cantidad agregada de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como sigue:



a) Obtención del factor de conversión de poder neutralizante de Ca(OH)_2 y CaCO_3

$$\begin{aligned} \text{P.M. de } \text{Ca(OH)}_2 &= 74 \text{ g} \\ \text{P.M. de } \text{CaCO}_3 &= 100 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{array}{r} 74 - 100 \\ 100 - X \end{array} \quad X = 1.35$$

Para neutralizar los 10 g de suelo se utilizaron 5 ml de solución de Ca(OH)_2 0.02 M por lo que :

$$\begin{array}{r} 74\text{g} - 1 \text{ M} - 1000 \text{ ml} \\ X - 0.2\text{M} - 1000 \text{ ml} \end{array}$$

$$X = 1.48 \text{ g}$$

$$\begin{array}{r} 1.48 \text{ g} - 1000 \text{ ml} \\ X - 5 \text{ ml} \end{array}$$

$$X = 0.0074 \text{ g de } \text{Ca(OH)}_2$$

b) Conversión de Ca(OH)_2 a CaCO_3

$$0.0074 \text{ g} (1.35) = 0.0092 \text{ g de } \text{CaCO}_3 / 10 \text{ g de suelo}$$

c) Para nuestro experimento se utilizan 1200 g de suelo, de aquí que:

$$\begin{array}{r} 0.0092 \text{ g } \text{CaCO}_3 - 10 \text{ g de suelo} \\ X - 1200 \text{ g} \end{array}$$

$$X = 1.104 \text{ g de } \text{CaCO}_3 / \text{másceta.}$$

CUADRO No. 14. Caracterización de cepas de Rhizobium huésped de Leucaena leucocephala.

MEDIO DE CULTIVO

CEPA	GPA		Medio de Norris reacción	AELMA _b reacción
	crec.	reacción		
	24 h	48 h		
Tabasco	-	+	neutra	neutra
Veracruz	-	+	neutra	neutra
Morelos	-	+	ácida	ácida
CIAT-1923	-	+	neutra	neutra
CIAT-1931	-	+	neutra	ácida

CUADRO No. 15. Número de rizobios/ml inoculados a plántulas de Leucaena leucocephala, en condiciones de invernadero.

CEPA	rizobios/ml
Tabasco Adaptada	2.5×10^{10}
Tabasco Sin Adaptar	2.0×10^{10}
CIAT-1923 Adaptada	2.0×10^{10}
CIAT-1923 Sin Adaptar	1.8×10^{10}
CIAT-1931 Adaptada	1.0×10^{10}
CIAT-1931 Sin Adaptar	2.5×10^{10}

Cepa Morelos

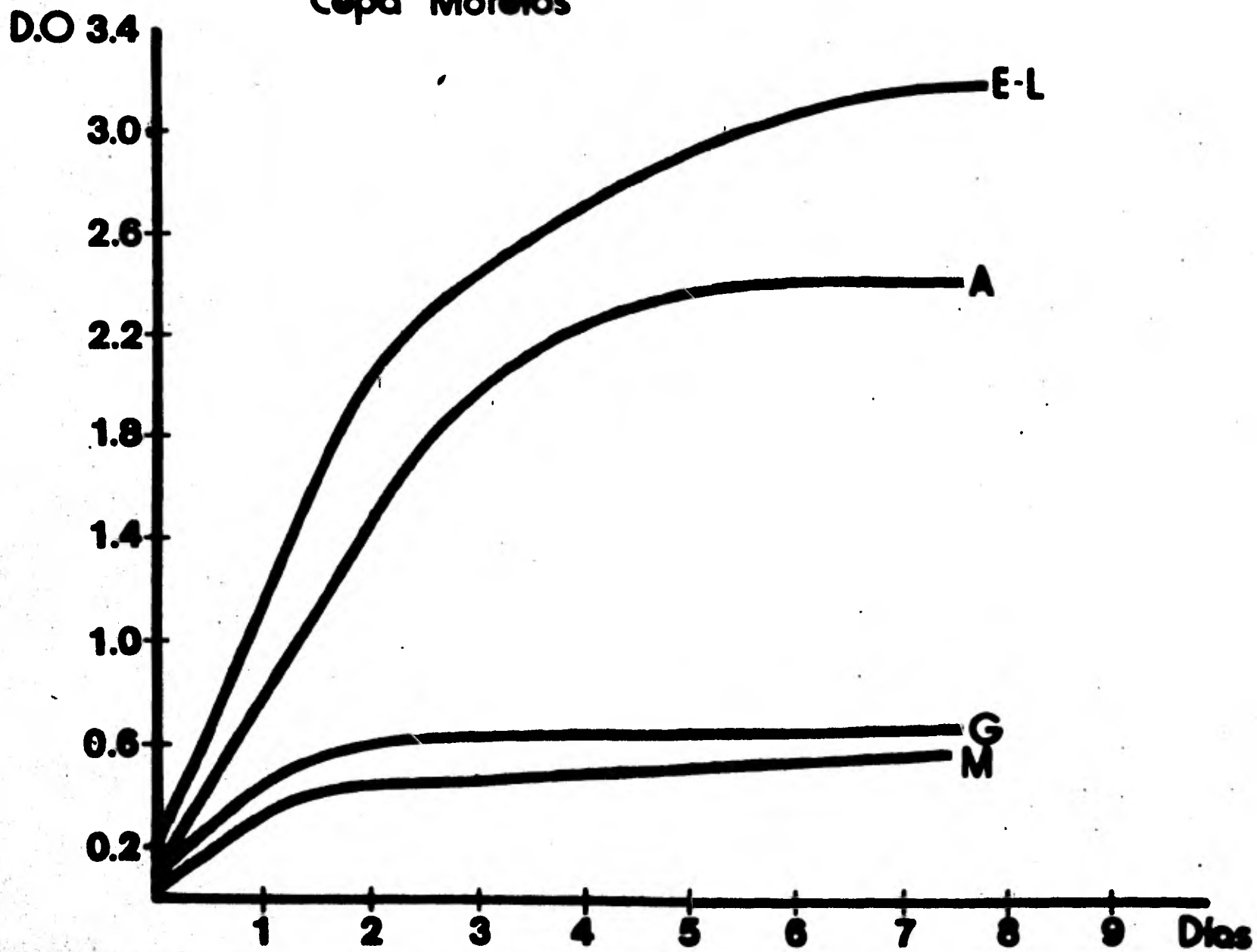


Figura No. 1. Curvas de crecimiento de la cepa Morelos, en diferentes medios de cultivo (Mediciones turbidimétricas). EL = Extracto de levadura manitol pH 7, A = arabinosa glutamato pH 4.2, G = galactosa glutamato pH 4.2 y M = manitol glutamato pH 4.2

Cepa Tabasco

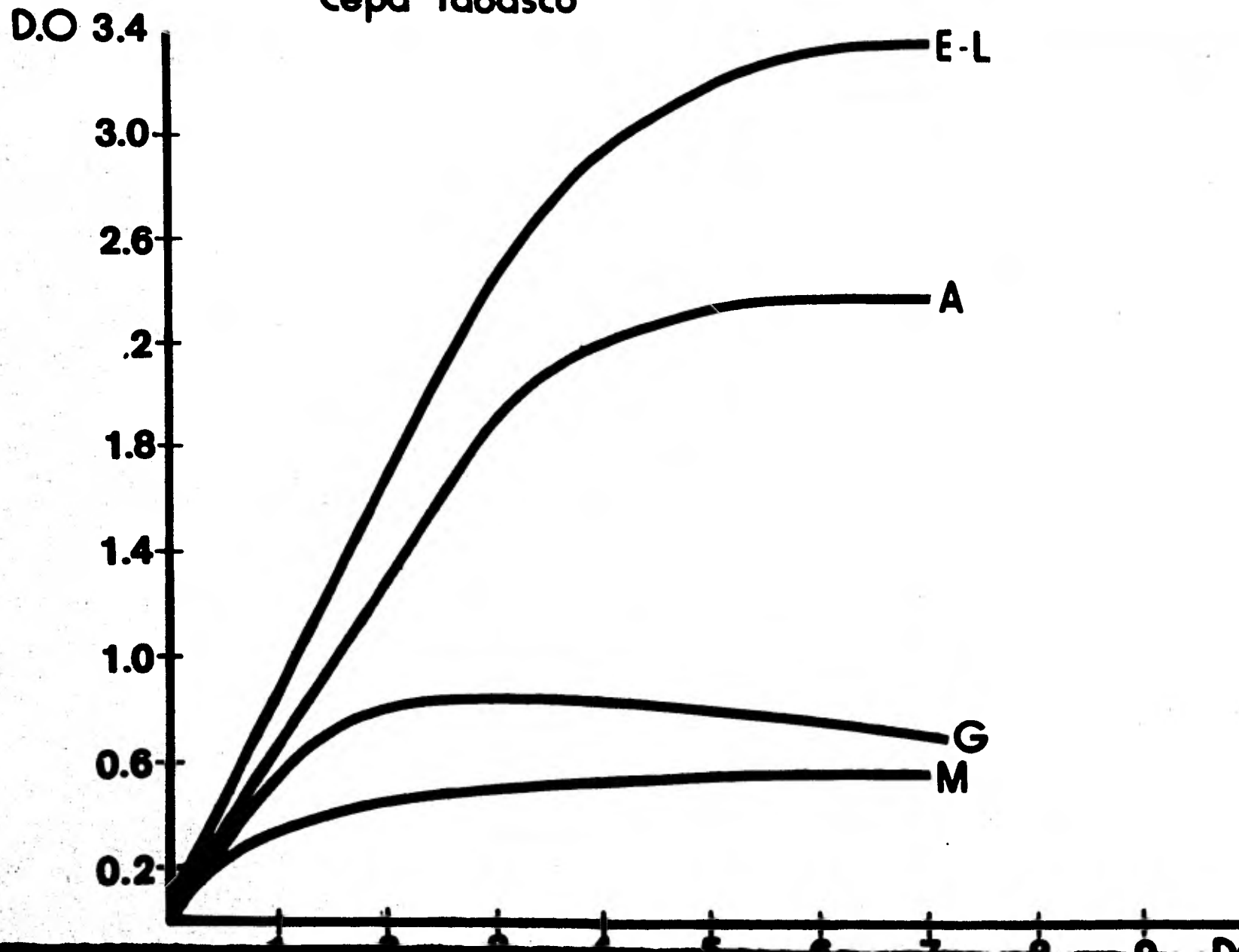


Figura No.2. Curvas de crecimiento de la cepa Tabasco en diferentes medios de cultivo (Mediciones turbidimétricas) La notación es igual que la figura anterior.

Cepa Veracruz

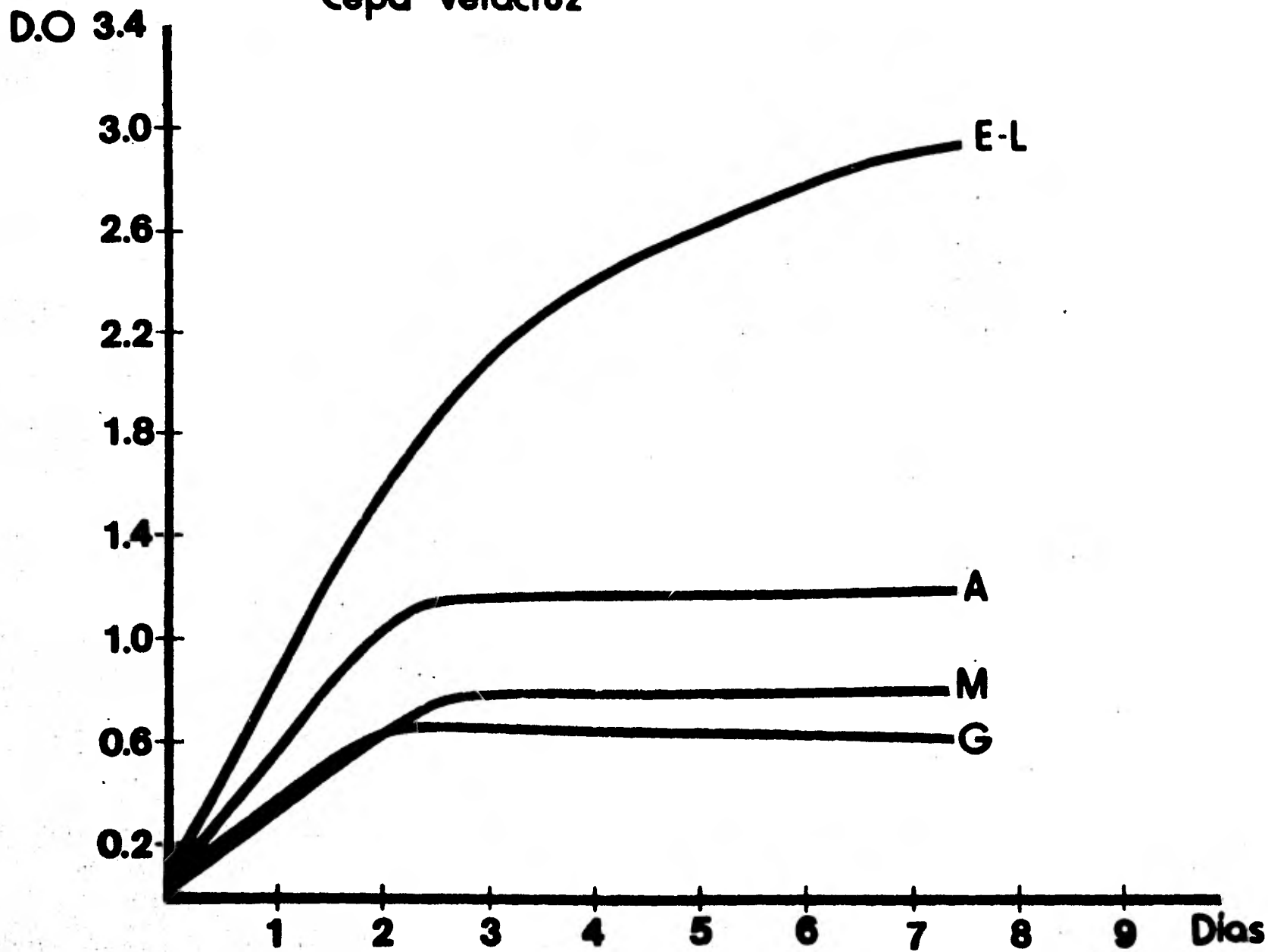


Figura No. 3. Curvas de crecimiento de la cepa Veracruz en diferentes medios de cultivo (Mediciones turbidimétricas). La notación es igual que la figura anterior.

pH del medio
(-)

Cepa Morelos

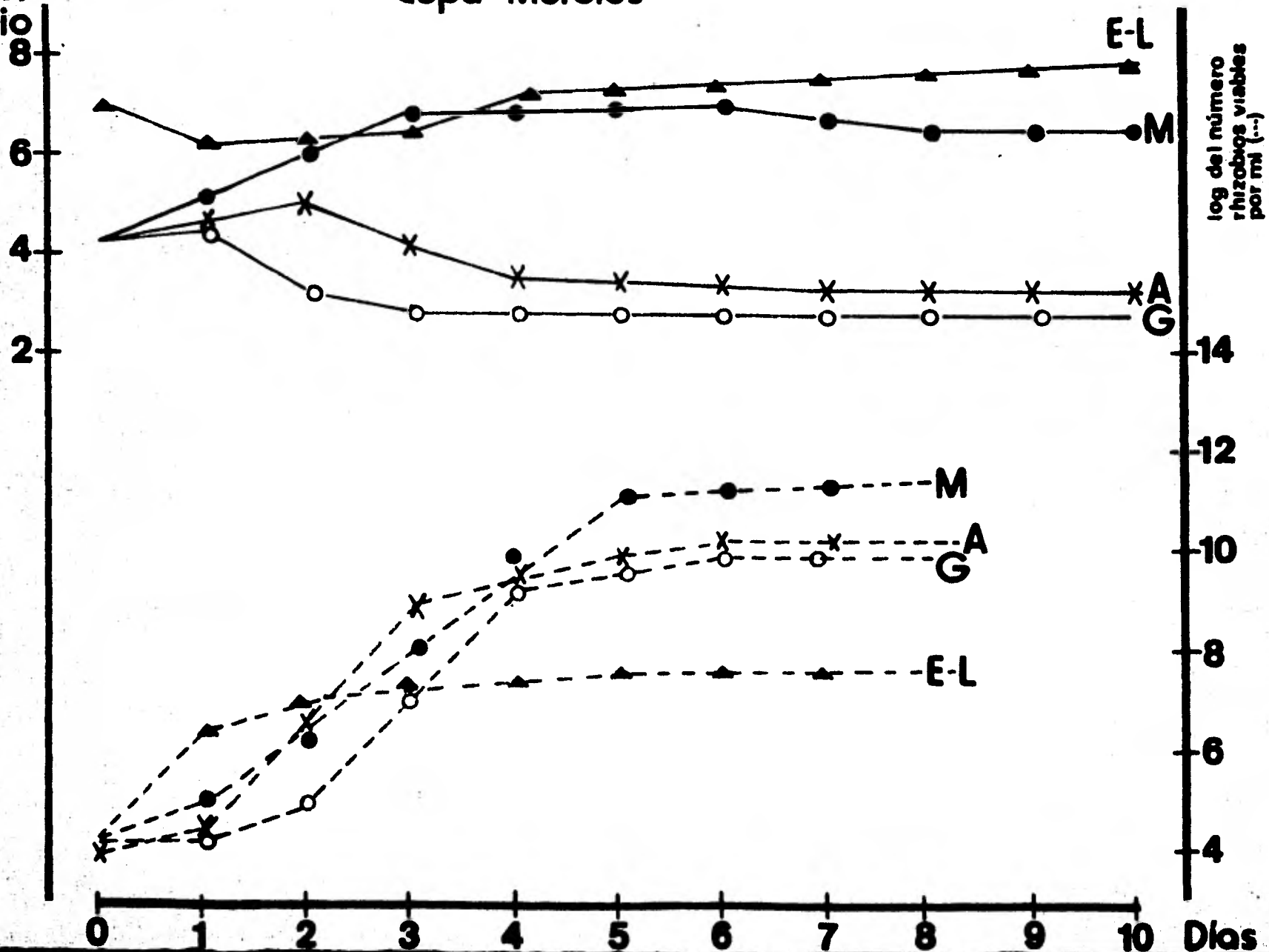
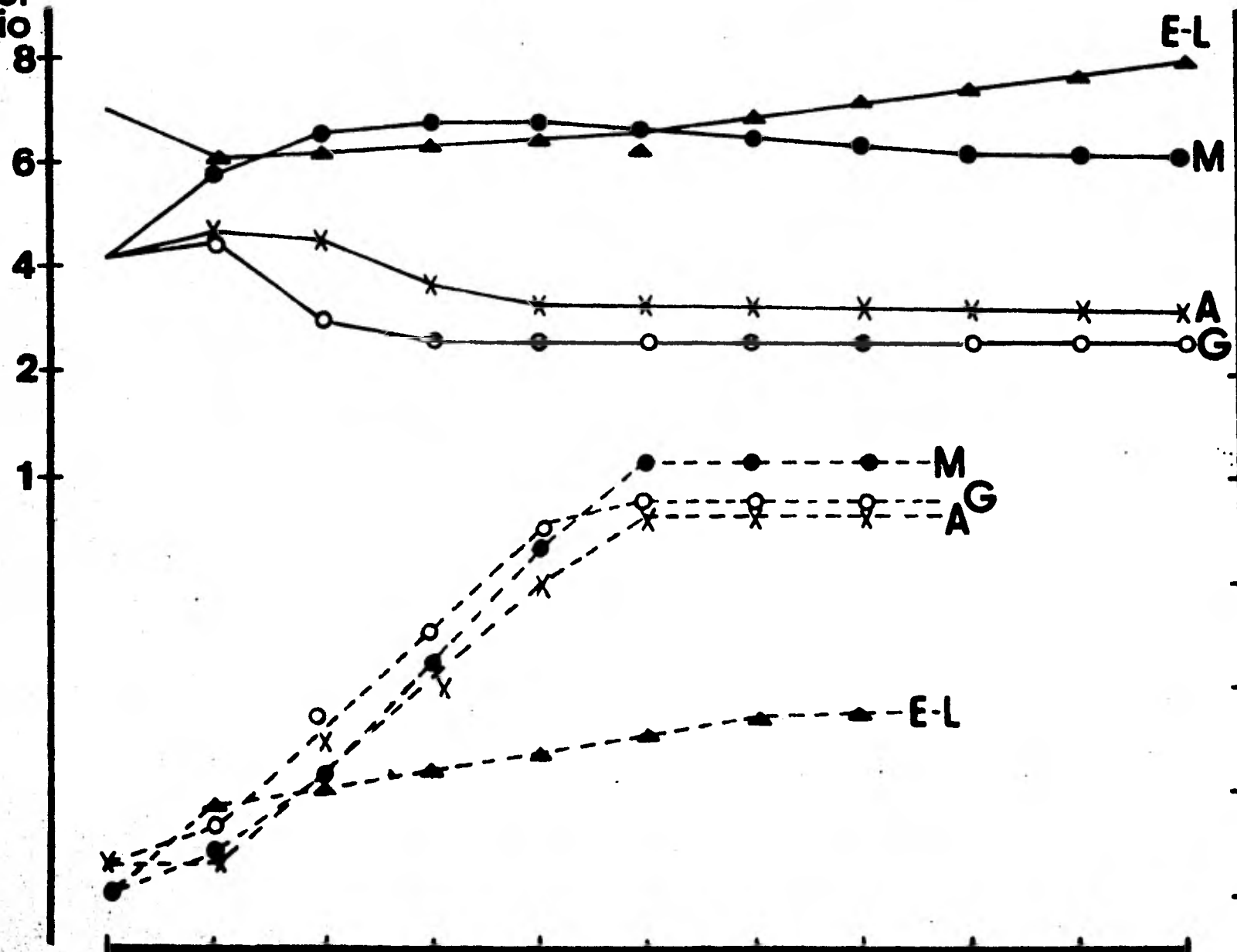


Figura No. 4. Variaciones de pH en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y cuenta viable de rizobios de la cepa Morelos en esos medios.

Cepa Tabasco

pH del medio
(-) 8



log del número de
rhizobios viables
por ml (...)

14
12
10
8
6
4

E-L
M
A
G

M
A
G
E-L

Figura No. 5. Variaciones de pH en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y cuenta viable de rizobios de la cepa Tabasco en esos medios.

Cepa Veracruz

pH del medio
(-) 8

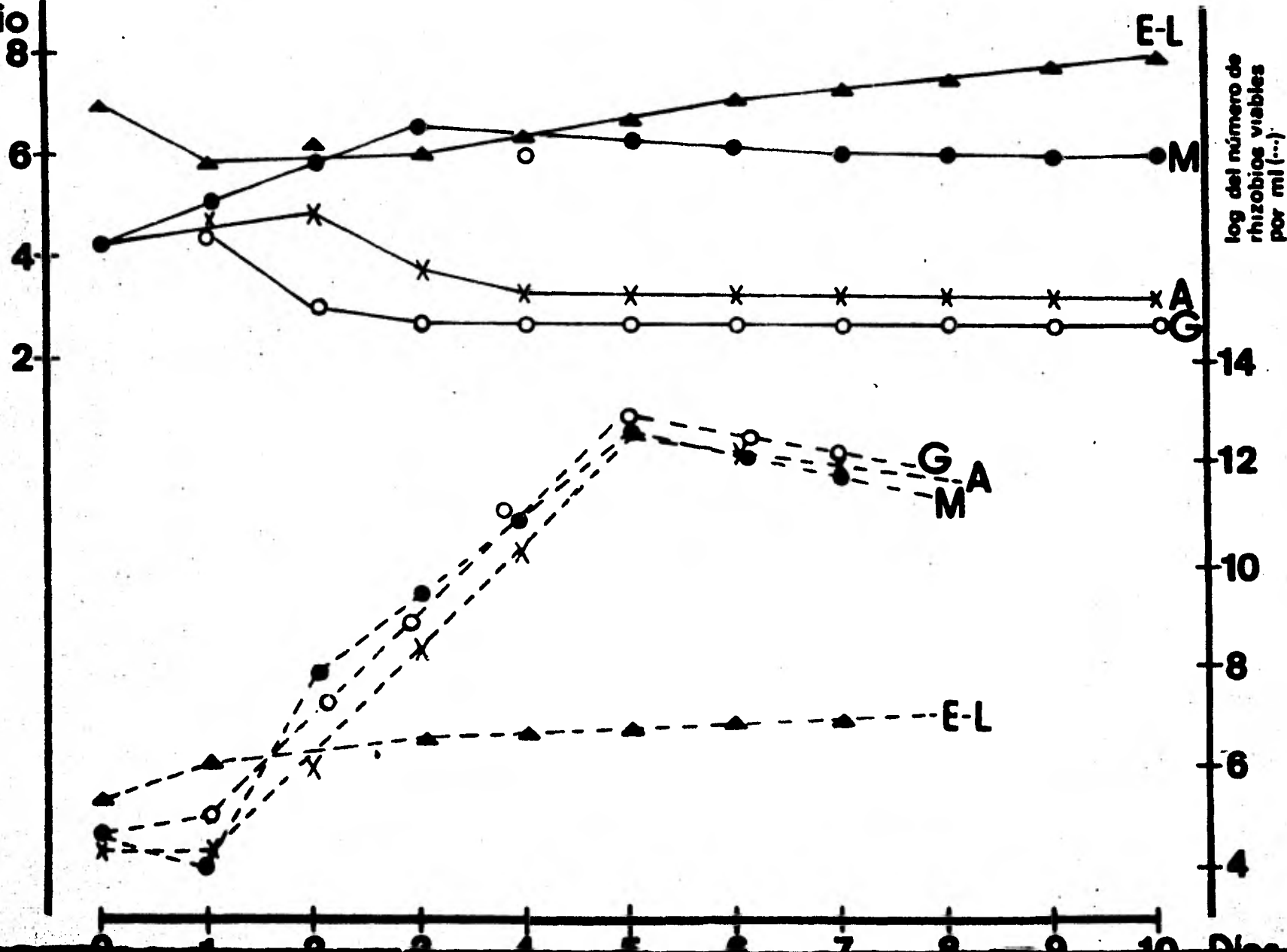


Figura No. 6. Variaciones de pH en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y cuenta viable de rizobios de la cepa Veracruz en esos medios.



- Figura No. 7. Resultados de pruebas de inoculación en Jarras de Leonard con cepas de Rhizobium huésped de L. leucocephala .**
- a) Plantas inoculadas con cepas Veracruz y Morelos
 - b) Plantas inoculadas con cepas CIAT-1923, Tabasco y CIAT-1931
 - c) Planta inoculada con cepa CIAT-1923 comparada con los testigos con nitrógeno y sin nitrógeno.

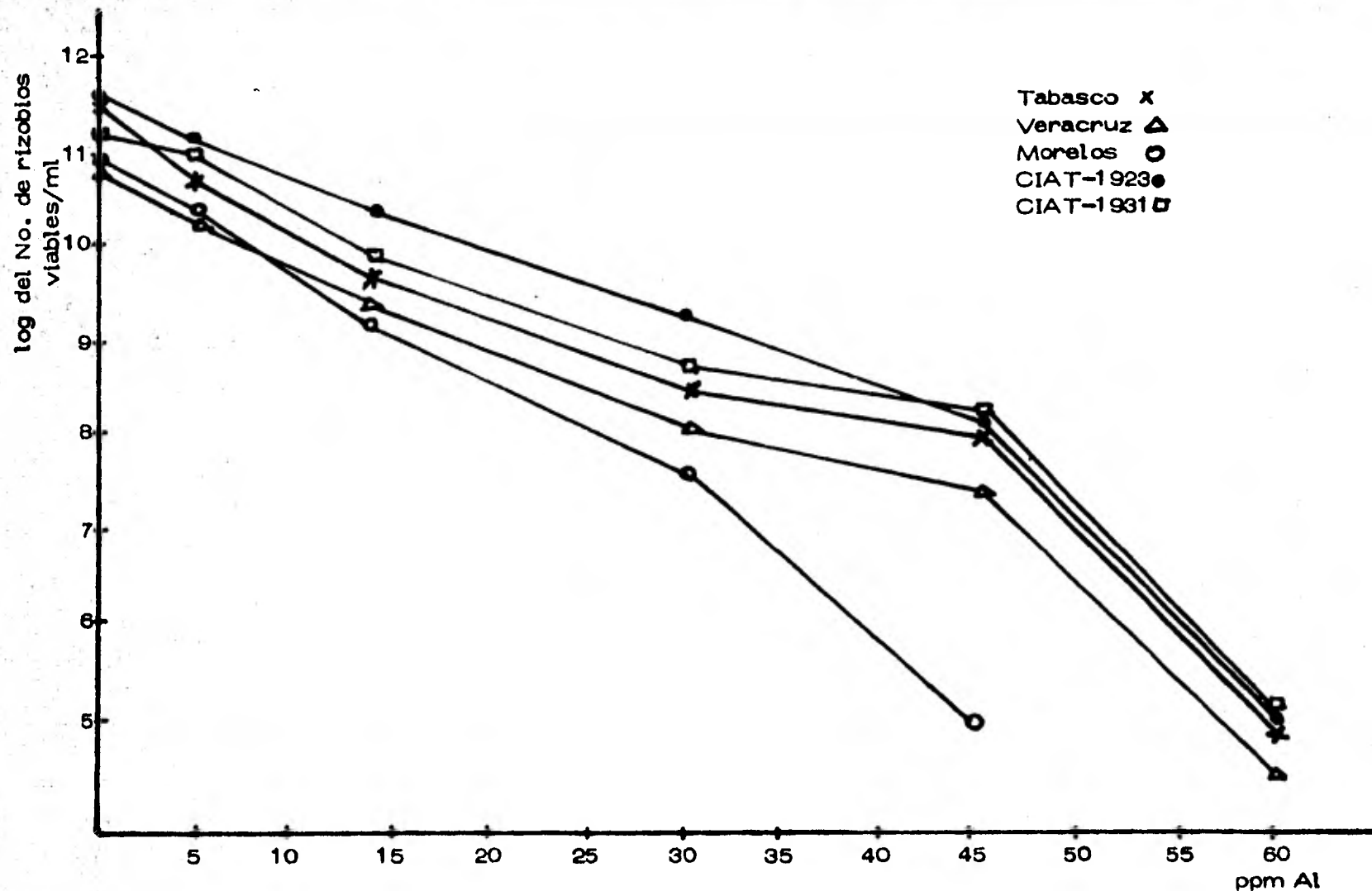
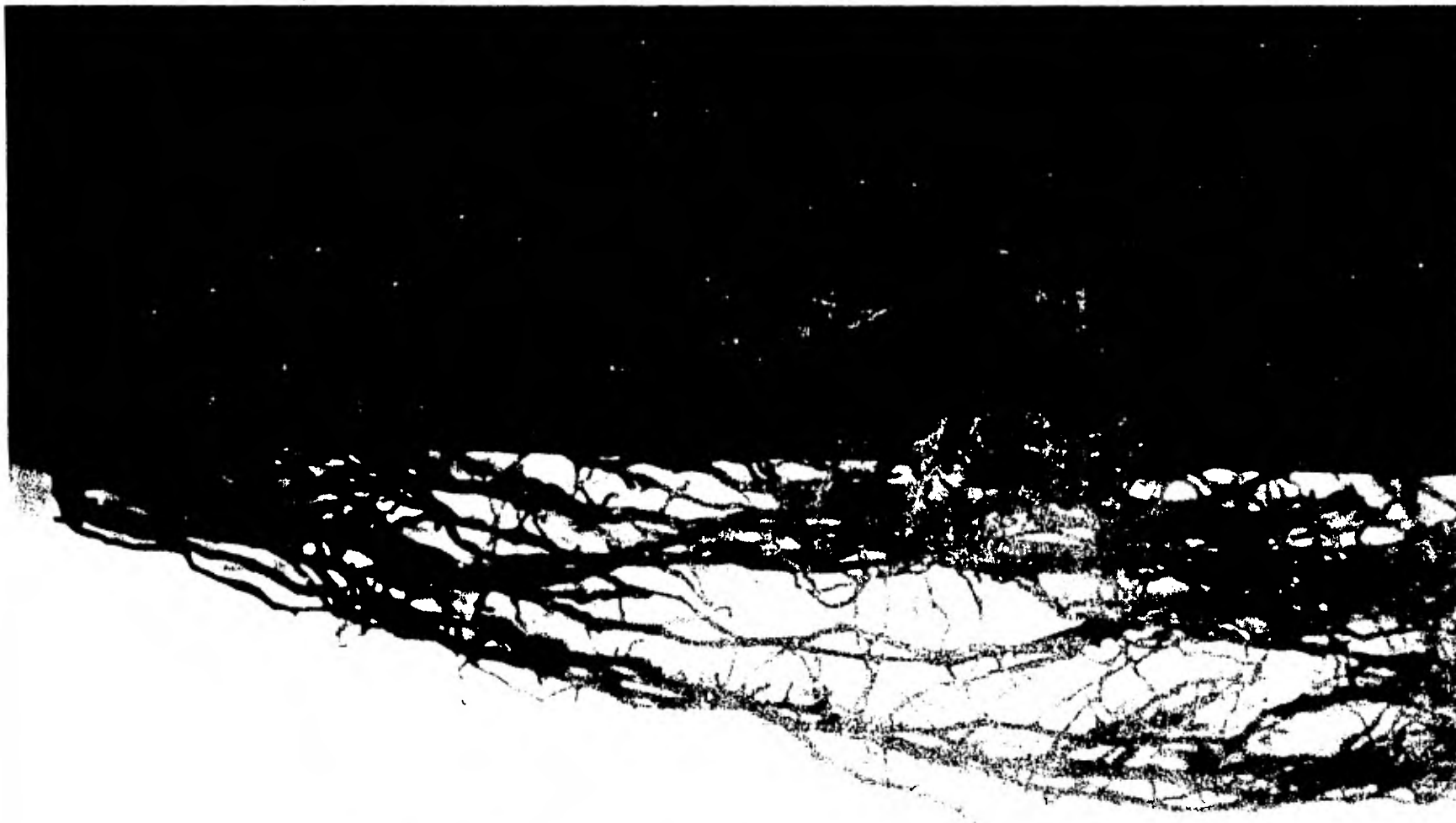


Figura No. 8. Efecto del aluminio sobre el Rhizobium huésped de Leucaena leucocephala en medio de cultivo arabinosa glutamato de sodio de pH 4.2

Figura 110. 9



TABASCO
PCa - A

Figura No. 9. Nodulación de plantas de L. leucocephala inoculadas con cepa Tabasco adaptada a la acidez y aluminio, en suelo encalado y fertilizado con fósforo.



CIAT-1923
PCa-A

Figura No. 10. Nodulación de plantas de L. leucocephala inoculadas con cepa CIAT-1923 adaptada a la acidez y aluminio en suelo encalado y fertilizado con fósforo.



TABASCO
PAI - SA

Figura No. 11. Efecto del aluminio sobre plantas de L. leucocephala inoculadas con cepa Tabasco sin adaptar a la acidez y aluminio, en suelo con fósforo y aluminio. No se observa efecto de nodulación.



CIAT - 1931
PAI - A

Figura No. 12. Efecto del aluminio sobre plantas de L. leucocephala inoculadas con cepa CIAT-1931 adaptada a la acidaz y aluminio, en suelo con fósforo y aluminio. No se observa efecto de nodulación.

V. DISCUSION

El criterio hasta ahora establecido de clasificación de los rizobios en productores de acidez, productores de alcalinidad o de comportamiento neutro mediante el crecimiento y reacción que produzcan en medio de cultivo a base de manitol, no coincide al emplear medios de cultivo con fuente de carbono diferente en este tipo de rizobios, ya que en los resultados del cuadro No. 14 se observa que las cepas Veracruz, CIAT-1923 y CIAT-1931 tienen diferente reacción en los medios probados, por lo que no se pueden clasificar dentro de los grupos antes mencionados.

El mismo fenómeno se manifiesta al observar las figuras Nos. 4, 5 y 6 en las que al utilizar arabinosa o galactosa como fuente de carbono en un medio de pH ácido se produce acidez por las tres cepas probadas; sin embargo con el mismo medio con manitol como fuente de carbono se observa un efecto alcalinizador con las tres cepas.

Por lo anterior surge la pregunta de que tan válidas sean este tipo de pruebas para la clasificación de los rizobios y si estas representen el comportamiento original de las cepas o sean producto de mutaciones en los cultivos, tal como lo indicó Norris en 1965 (41) ya que según él, un estudio de éste tipo debe realizarse con cultivos recientemente aislados, lo cual es poco práctico dada la amplia varie

dad y distribución de éstos microorganismos.

Aunque no se sabe si la reacción de los rizobios sobre manitol tenga alguna relación con su comportamiento en la rizósfera de la leguminosa, Norris asume que ésta realmente ocurre para poder formular sus criterios de clasificación de los rizobios y sus hipótesis acerca de la importancia ecológica y evolutiva de este comportamiento mencionadas anteriormente.

Las mediciones de crecimiento de estos rizobios por turbidimetría no representan el crecimiento real de los microorganismos, siendo necesario realizar la determinación de cuenta viable en placa para asegurar los resultados, tal como se muestra en las figuras Nos. 1 a 6, esto podría explicarse por la producción de sustancias de naturaleza polisacárida por parte de los rizobios en los medios de cultivo con fuentes de nutrimentos complejos tales como extracto de levadura, lo que dá lugar a una gran turbiedad en el medio como lo reportó Dudman, W.F. (42) y Kennedy, L.D. (43). En este aspecto también pueden influir las variaciones de pH del medio para precipitar o solubilizar componentes del medio de cultivo.

Dado que en los medios de cultivo de pH ácido el número de rizobios viables/ml fué de aproximadamente 10^{12} con todas las cepas, y en los medios de ELMR tradicionalmente usado fué de 10^8 , se sugiere una gran resistencia de éstos microorganismos a la acidez incluso puede ser un mejor medio de cultivo para la propagación,

lo cual es contrario al punto de vista comunmente aceptado de que Rhizobium tiene un pH óptimo de crecimiento cercano a la neutralidad. Lo anterior expuesto puede explicar porque los intentos realizados para aislar Rhizobium de nódulos de Stylosanthes (especialmente capitata) crecida en suelos de pH 4.5-5.5 han sido inútiles al utilizar el medio de cultivo tradicional de pH 6.8-7.0 (44).

En las pruebas de nodulación en jarras de Leonard, se observó que todas las plantas inoculadas con las cepas presentaron abundantes nódulos de coloración rosácea, así como efectos benéficos al comparar el tamaño y aspecto de las plantas noduladas con los tratamientos testigo, por lo que se puede asegurar que las cepas de Rhizobium probadas son específicas de L. leucocephala dadas sus características de gran especificidad reportadas (28).

Los rizobios de ésta leguminosa toleran grandes niveles de aluminio soluble en medios de cultivo, comparados con los reportes que existen acerca de éste efecto sobre otros rizobios así: Munns en 1979 (35) reportó que niveles mayores de 50 μM de aluminio (1.3 ppm de aluminio) inhiben considerablemente a Rhizobium japonicum mientras que los rizobios del tipo "caupi" son más tolerantes a esos niveles. Por otro lado P. Graham (45) reportó que niveles mayores de 6 ppm de aluminio soluble tienen un gran efecto inhibitorio sobre Rhizobium phaseoli.

Con el procedimiento de adaptación de cepas a la acidez y el aluminio se seleccionaron las cepas Tabasco, CIAT-1923 y CIAT-1931 como las más tolerantes a esas condiciones. Lo anterior se hizo considerando lo que Munns (35) sugiere acerca de que muchas cepas simbióticamente sensibles a la acidez fallan en suelos ácidos debido a que no pueden crecer y colonizar la rizósfera del huésped, lo que puede predecirse por la incapacidad de las cepas para crecer en medios de cultivo definido de pH ácido con cantidades elevadas de aluminio, de tal manera que se puede hacer una preselección de cepas en el laboratorio para eliminar las cepas sensibles a esas condiciones y trabajar con las cepas que si toleren pH ácido y aluminio asociado, con las que se pueden proseguir los futuros trabajos de establecimiento de la simbiosis en suelos ácidos.

Aunque las cepas de Morelos y Veracruz desarrollaron favorablemente en condiciones de acidez, fueron más sensibles al tratamiento con aluminio, lo cual coincide con lo reportado por Munns en 1979 acerca de que la tolerancia a la acidez que presentan algunos rizobios no necesariamente implica tolerancia al aluminio(35).

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de invernadero empleando un suelo ácido, se observó que a pesar de que el número de rizobios inoculados fué grande para poder poblar la rizósfera y dado que estos rizobios resistieron la acidez y el aluminio a nivel de laboratorio, hubo fallas en la nodulación de las plantas

crecidas en el suelo natural o sin tratamiento, debido probablemente a deficiencias nutricionales de fósforo dada la pobreza del suelo en ese elemento, además de un marcado efecto del aluminio sobre las raíces por lo que probablemente no se formaron sitios de infección y la nodulación falló.

El efecto del aluminio sobre las raíces es mas claro en las plantas desarrolladas en el suelo fertilizado con fósforo y aluminio, en el cual las raíces de las plantas se observan muy afectadas, presentándose en ellas poco desarrollo de raíces laterales con la raíz principal engrosada y poco desarrollada; aunque se adicionó fósforo al suelo, las plantas presentaban síntomas de deficiencias de fósforo y estaban poco desarrolladas, lo que pudo ser debido a que el aluminio interfiere en la incorporación y asimilación del fósforo por la planta tal como lo reportó Andrew, C.S. (37) donde indica que el efecto puede ser atribuido a varios eventos que son: a) precipitación interna de fósforo y aluminio en o sobre las raíces de la planta, b) captación aumentada de fósforo por las raíces sin asimilación por la planta (46) y c) un efecto dual, en el cual ocurre primero una fijación de fósforo por una reacción de adsorción-precipitación en la superficie celular y después una reacción dentro de la célula posiblemente dentro de la mitocondria (47). Por lo anterior, no se formaron sitios de infección y no se inició el proceso de infección y nodulación.

El efecto de nodulación se observó únicamente en las plantas crecidas en el suelo encalado y fertilizado con fósforo, inoculadas con las cepas Tabasco y CIAT-1923, debido a que el efecto tóxico del aluminio se elimina al encalar el suelo, por lo que hubo buen desarrollo de raíces y se llevó a cabo el proceso de infección y nodulación lo cual coincide con lo reportado por Norris en 1967 (48) acerca de que esta planta da una gran respuesta a la inoculación en suelos encalados.

Por lo anterior, se sugiere que aunque es recomendable llevar a cabo un proceso de selección de cepas en el laboratorio en cuanto a su tolerancia a la acidez y al aluminio, es de esperarse posibles fallas en las pruebas de nodulación en campo debido a que los medios de cultivo son medios artificiales de tal manera que el crecimiento de los rizobios en estos medios no representa totalmente el comportamiento de los mismos en el suelo, además de que en el proceso de nodulación hay varias etapas sensibles a la acidez y la población adecuada de la rizósfera es sólo uno de los eventos sensibles, debiendo considerarse también los efectos de la acidez y el aluminio en el desarrollo de la planta huésped, con el fin de lograr el establecimiento de la simbiosis en los suelos ácidos.

Al realizar el aislamiento de las cepas de las plantas noduladas y crecerlas en el medio de arabinosa-glutamato de sodio de pH 4.2 con 30 ppm de aluminio se obtuvieron 10^9 rizobios viables/ml en

los cultivos de las dos cepas aisladas, por lo que se considera que no perdieron la tolerancia a esos niveles de aluminio, ya que el número determinado coincide con lo que se obtuvo al realizar la adaptación de las cepas. Esto puede relacionarse con lo reportado por Keyser y Munns (49) en 1979, acerca de que la tolerancia a la acidez y al aluminio de los rizobios no implica una variación genética dentro de una población dada, que es una característica estable que permitirá una adecuada selección de cepas que presenten gran tolerancia a esas condiciones.

VI. CONCLUSIONES

- a) Los criterios hasta ahora establecidos sobre la clasificación de los rizobios en productores de acidez, productores de alcalinidad o de comportamiento neutro no se aplican confiablemente a los rizobios de esta leguminosa tropical, observándose variaciones en su comportamiento dependiendo de la fuente de carbono y nitrógeno que contenga el medio de cultivo, por lo que surge la interrogante de que tan representativo sea el comportamiento de estos rizobios en los medios de cultivo al compararlo con la actividad que desarrollan en el suelo, y la verdadera importancia del papel ecológico que se ha atribuido a éste comportamiento.
- b) Los rizobios de esta leguminosa presentan una gran tolerancia a la acidez de los medios de cultivo de pH 4.2 probados, obteniéndose un mejor desarrollo de los microorganismos con respecto al usado tradicionalmente a base de manitol y extracto de levadura de pH 7.0.
- c) La tolerancia que presentan estos rizobios a la acidez no implica que sean tolerantes al aluminio, observándose variabilidad en la tolerancia de las cepas probadas.
- d) Para evaluar futuros establecimientos de leguminosas en sue-

los ácidos es necesario realizar un minucioso diagnóstico de las características fisicoquímicas del suelo, considerando principalmente el pH, contenido de fósforo y aluminio como ya se ha hecho tradicionalmente al encalar los suelos.

- e) Debe determinarse el efecto de la acidez y aluminio sobre la planta que nos interese establecer en suelos ácidos y no solo considerar al microorganismo simblonte como determinante para que se lleve a cabo la nodulación y fijación de nitrógeno, por lo tanto también es conveniente seleccionar una variedad de leucaena que resista más los efectos antes mencionados.

- f) El procedimiento de preselección de cepas resistentes a la acidez y aluminio, mediante pases sucesivos en medios de cultivo que contengan cantidades crecientes de este elemento, puede ser un método adecuado para aumentar la capacidad de infección y nodulación de estos rizobios, en suelos ácidos y de esta manera traducirse en una simbiosis altamente benéfica o efectiva.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lloyd, R.F. (1979). Current Research on Biological Nitrogen Fixation in the U.S.A. Planning an international network of legume inoculation trials. Edited by College of Tropical Agriculture and Human Resources University of Hawaii. p. 88
- 2.- Brill, W.J. (1977). Biological Nitrogen Fixation. Scientific American. September p. 68-81
- 3.- De Alba, J. (1976). Panorama actual de la ganadería mexicana. Seminario Internacional sobre ganadería tropical. FIRA Banco de México. p. 41-62
- 4.- Sotelo, Angela (1981). Leguminosas silvestres, reserva de proteínas para la alimentación del futuro. Información Científica y Tecnológica CONACyT. 54, 3 : 28-32
- 5.- Bradomín, J.M. (1972). Monografía del Estado de Oaxaca. México D.F. p. 289
- 6.- Brewbaker, J.L. (1976). The woody legume, *Leucaena*; promising source of feed, fertilizer and fuel in the tropics. Mem. SIGT. Producción de forrajes, FIRA Banco de México. p. 13-27
- 7.- Brewbaker, J.L. (1972). Giant Ipil-Ipil promising source of fertilizer, feed and energy for the Philippines. Agric. Seminar Series, U.S.A.I.D. Manila, Philippines.
- 8.- Brewbaker, J.L. (1975). "Hawaiian Giant" *Koa haole*, College of

Tropical Agriculture Hawaii. Agricultural Experiment Station,
Miscellaneous Publication 125, Honolulu.

- 9.- Guevarra, A.B. (1976). Management of Leucaena leucocephala for maximum yield and nitrogen contribution to corn in polycrop systems. Ph. D. Thesis, Dept. Agronomy and Soil Sci. Univ. Hawaii.
- 10.- Dijkman, M.J. (1950). Leucaena: a promising soil erosion control plant. Econ. Bot. 4:337-349
- 11.- Oakes, A.J. (1968). Leucaena leucocephala: description, culture, utilization. Adv. Front. Pl. Sci. New Delhi, India 20:1-114
- 12.- Vielmeyer, N.D. (1979). Leucaena: New Hope for the Tropics. In Yearbook of Science and the Future. Encyclopaedia Britannica Inc. Chicago p. 238-247
- 13.- Reis, P.J., Tunks, D.A. & Hegarty, M.P. (1975). Fate of mimosine administered as a defleccing agent. Aust. J. Biol. Sci. 28: 495-501
- 14.- Springhall, J.A., and Ross, E. (1965). Preliminary studies with poultry rations for the territory of Papua and New Guinea. 1. Grower rations with copra, sago and Leucaena leucocephala. Papua and New Guinea. Agr. J. 17 (3): 117-121
- 15.- Gray, S.G. (1968). A review of research on Leucaena leucocephala. Trop. Grasslands. 2 (1): 19-30
- 16.- Jones, R.J., Blunt, C.G. & Holmes, J.H. G. (1976). Enlarged

thyroid glands in cattle grazing *Leucaena* pastures. Trop.

Grasslands. 10(2): 113-116

17.- Hegarty, M.P., Court, R.D., Christie M.D. & Lfe, C.P. (1976).

Mimosine in *Leucaena leucocephala* is metabolized to a goitrogen
in ruminants. Aust. vet. J. 52 (10): 490

18.- Addy, B.L., and Thomas, D. (1977). Intensive fattening of buf

cattle by stall feeding on the Lilongwe plain, Malawi 2. - Utili-
zation of crops residues, crop by-products and *Leucaena*. Trop.

An. Health Prod. 9 (4): 191-196

19.- Pérez, J.R, C.B. (1976). Fattening cattle on farm by-products.

ASPAC. Food & Fertilizer Technology Centre Extension Bulletin
83: 1-11

20.- Pérez-Guerrero, Z.J. (1976). Avances del centro de demostra-

ción para la producción comercial de leche en zonas tropicales
"El Tamarindo". Mem. SIGT. Producción de leche. FIRA Ban-
co de México, Acapulco. p. 159-170

21.- Stobbs, T.H. (1972). Suitability of tropical pastures for milk

production. Trop. Grassland. 6: 67-69

22.- Bengé, D.M., and Curran, H. (1976). Bayani (Giant Ipil-Ipil)

Leucaena leucocephala. A source of fertilizer, feed and energy .
for the Philippines, U.S.A.I.D. Agric. Dev. Series p.1-22

23.- *Leucaena*: Promising Forage and Tree Crop for the tropics.

National Academy of Sciences. Washington, D.C. 1977

- 24.- Suda, S. (1960). On the physiological properties of mimosine.
Bot. Mag Tokyo. 73: 142-148
- 25.- Leucaena, la multifacética. Agricultura de las Americas.
Abril 1979, p. 18-20
- 26.- Hewitt, E.J. (1952). Trans 2nd and 4th Comm. Int. Soc. Soil
Sci. Dublin, vol 1: 107-118
- 27.- Norris, D.O. (1956). Legumes and the Rhizobium symbiosis.
Empire J. Exp. Agr. 24: 247-270
- 28.- Trinick, M.J. (1968). Nodulation of tropical legumes. 1. Spe-
cificity in the Rhizobium symbiosis of Leucaena leucocephala
Expl. Agric. 4: 243-253
- 29.- Galli, F. (1958). Inoculacoes cruzadas con bacterias dos nódulos de leguminosas tropicales. Rev. Agr. Brasil 33(3): 139-150
- 30.- Van Schreven, D.A. (1958). Methods used in the Netherlands for the production of legume inoculants In: Nutrition of the legumes. Butterworths, Scientific Publications. p. 328-333
- 31.- Kornelius, E. y Stammel, J.G. (1973). Respostas de duas leguminosas tropicais a foaforo e calcario em um solo acido do Rio Grande do Sul. Agron. Sulriograndense. Porto Alegre 9 (2): 177-190
- 32.- Ming-Huel, W.V. (1964). Effect of lime, molybdenum and inoculation of rhizobia on the growth of Leucaena glauca on acid soils. Journal of the Agricultural Association of China. 47: 57

33. - Munns, D. N. (1968). Nodulation of Medicago sativa in solution culture. I. Acid-sensitive steps. Plant and Soil 28:129-145
34. - Loneragan, J. F. (1972). The soil chemical environment in relation to simbiotic nitrogen fixation. I.A.E.A. Tech. Rept. 149: 17-54
35. - Munns, D.N., H.H. Keyser (1979). Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. Soil Sci. Am. J. 43: 519-523
36. - Munns, D.N., H.H. Keyser (1981). Response of Rhizobium strains to acid and aluminum stress. Soil Biol. Biochem. 13: 115-118
37. - Andrew C.S. (1977). Legumes and acid soils. Basic Life Sciences. Vol 10. Edited by Johanna Döbereiner, Robert H. Burris and Alexander Hollaender. Plenum Press, New York, U.S.A.
38. - Vincent, J.M. (1975). Manual práctico de Rhizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.
39. - Jackson M.L. (1964). Análisis Químico de suelos. Ediciones Omega S.A. 3a. Ed., Barcelona.
40. - Mc. Keague, J.A. (1978). Manual on Soil Sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science.
41. - Norris, D.O. (1965). Acid production by Rhizobium a unifying concept. Plant and Soil 22: 143-166
42. - Dudman, W.F. (1976). The extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum. Carbohyd. Res. 46(1): 97-110

43. - Kennedy, L.D. (1976). Isolation of 3-o-methyl D-ribose from a Rhizobium polysaccharide. Carbohyd. Res. 52: 259-261
44. - Date, R.A. and Halliday, J. (1979). Selecting Rhizobium for acid infertile soils of the tropics. Nature. 277: 62-64
45. - Graham, P.H. (1981). Some problems of nodulation in nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. Field Crops Res. 4. In press
46. - Clarkson, D.T. (1965). Ann. Bot. 29: 309
47. - Clarkson, D.T. (1966 b). Plant Physiol 41: 165
48. - Norris, D.O. (1967). The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. Tropical Grasslands 1: 107
49. - Keyser, H.H., D.N. Munns, and J.S. Hohenberg. (1979). Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea. Soil Sci. Soc. Am. J. 43: 719-722